

**T.C
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MARKETLERDE VE ATTARLARDA SATILAN BALLARIN
ANTİOKSİDAN VE OKSİDAN KAPASİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET DOĞAN

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Özcan EREL**

**ŞANLIURFA
2007**

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalındaki gerek yüksek lisans eğitimim boyunca gerekse tez çalışmalarımın tüm aşamalarında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli danışmanım, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özcan EREL'e Tez dönemi boyunca bilgi ve becerilerinden yararlandığımız değerli hocalarım Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e, Doç. Dr. Nurten AKSOY'a, Arş. Gör. Dr. Şahbettin SELEK'e, Arş. Gör. Dr. Ali Rıza OCAK'a, Arş. Gör. Dr. Hale ÇAKIR'a ve her türlü desteği sağlayan değerli arkadaşım Öğr. Gör. Hakim ÇELİK'e çalışmalarımda bana yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Biyolog Abdullah TAŞKIN'a, Necla ÇELİK'e balların toplanmasında bana yardımcı olan M.Emin SAKLIM'a, manevi desteklerini esirgemeyen tüm Biyokimya çalışanlarına, yüksek lisans dönemi boyunca bize her konuda yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne ve değerli çalışanlarına, tez projemi destekleyen HÜBAK'a, desteğini esirgemeyen eşime ve biricik kızım Aliye'ye sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Arılar	3
2.1.1.Temizlik.....	5
2.1.2 .Larva Bakıcılığı.....	5
2.1.3. Petek İnşası ve Onarım.....	6
2.1.4. Kovan Bekçileri.....	6
2.1.5. Bal Yapımı.....	6
2.2. Bal	7
2.2.1. Balın Tanımı.....	7
2.2.2. Balın Sınıflandırılması ve Bal Çeşitleri	7
2.2.2.1. Arıların Yararlandığı Kaynaklara Göre Ballar.....	7
2.2.2.2.Tüketime Sunuş Şekillerine Göre Ballar.....	8
2.2.3 .Balın Fiziksel Özellikleri.....	9
2.2.3.1.Balın Rengi.....	9
2.2.3.2.Balın Lezzet ve Aroması.....	9
2.2.3.3.Balın Kokusu.....	10
2.2.3.4.Balın Vizkozitesi.....	10
2.2.3.5.Balın Kıvamı.....	10
2.2.3.6.Balın Özgül Ağırlığı.....	10
2.2.3.7. Balın Kırılma indisi	11
2.2.3.8.Balın Hidroskopik Özelliği.....	12
2.2.3.9 .Balın Işığı Döndürmesi (polarizasyon).....	12
2.2.3.10. Balın Kristalizasyonuna Etki Eden Faktörler.....	13
2.2.4. Balın Kimyasal Özelliği.....	15
2.2.4.1.Balda Rutubet Miktarı.....	16
2.2.4.2..Baldaki Karbonhidratlar.....	17
2.2.4.3. Baldaki Enzimler.....	18

2.2.4.4. Baldaki Asitler.....	19
2.2.4.5. Baldaki Proteinler.....	19
2.2.4.6. Baldaki Vitaminler.....	20
2.2.4.7. Baldaki Mineral Maddeler.....	20
2.2.4.8. Balda Bulunan Diğ er Maddeler.....	21
2.2.5. Hidroksimetilfurfural.....	21
2.2.5.1. Hidroksimetilfurfuralın Tanımı (HMF).....	21
2.2.5.2. Hidroksimetilfurfuralın Oluş umu ve Önemi.....	23
2.2.5.3. Balda HMF Oluş umunu Hızlandıran Etkenler.....	24
2.2.6. Balın Besin Değ eri ve Sağlık Üzerine Etkileri.....	24
2.2.6.1 Balın Beslenmedeki Önemi.....	24
2.2.6.2. Bal Zehirlenmesi.....	27
2.2.6.3. Bal Hasadı.....	27
2.2.6.4. Balın Kullanım Alanları.....	28
2.2.7. Arı Ürünleri.....	28
2.2.7.1 Balmumu.....	28
2.2.7.2. Polen.....	29
2.2.7.3. Arı Zehri ve Kimyasal Bileş imi.....	33
2.2.7.4. Arı Sütü.....	32
2.2.7.5. Propolis ve Yapısı.....	34
2.3. Serbest Radikaller	36
2.3.1 Reaktif Oksijen Türleri.....	37
2.3.1.1. Süperoksid Radikali.....	38
2.3.1.2. H ₂ O ₂ (Hidrojen Peroksid).....	39
2.3.1.3. Hidroksil Radikali.....	40
2.3.1.4. Singlet Oksijen.....	42
2.3.1.5. Nitrik Oksit ve Türevleri.....	42
2.3.1.6. Hipoklöröz Asit.....	43
2.3.1.7. Ozon.....	44
2.3.2. Serbest Radikal Kaynakları.....	44
2.3.2.1. Endojen Kaynaklar.....	45
2.3.2.2. Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları.....	49
2.3.3. Serbest Radikallerin Hücre Düzeyinde Etkileri.....	50
2.3.3.1. Serbest Radikallerin Enzimlere Etkileri.....	50

2.3.3.2.Serbest Radikallerin DNA ya Etkileri	51
2.3.3.3.Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri.....	53
2.3.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi.....	54
2.3.3.5.Nükleik Asit'lere Etkileri.....	54
2.3.3.6. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	55
2.4. Antioksidan Savunma	56
2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	58
2.4.1.1.Superoksid Dismutaz.....	58
2.4.1.2. Glutasyon Peroksidaz.....	58
2.4.1.3.Katalaz	59
2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	59
2.4.2.1. β -Karoten (Vitamin A Ön Maddesi).....	59
2.4.2.2. C Vitamini.....	59
2.4.2.3.Vitamin E (α -Tokoferol).....	60
2.4.2.4. Glutasyon (GSH).....	60
2.4.2.5. Melatonin.....	61
3. MATERYAL METOD.....	61
3.1.Gereçler.....	62
3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	62
3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	62
3.2. Yöntem.....	63
3.2.1. Örneklerin Hazırlanması.....	63
3.2.1.1.Total Antioksidan Kapasite (TAK).....	64
3.2.1.2.Total Oksidant Seviye (TOS).....	64
3.2.1.3.. Fenol Bileşikleri Ölçümü.....	65
3.2.2.Yapılan İstatistiksel Analizler.....	65
4.BULGULAR.....	66
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	72
6. KAYNAKLAR.....	74

TABLolar**SAYFA**

Tablo-1: Balın 20°C sıcaklıktaki Kırılma indisi ile % Rutubet Oranları Arasında İlişki.....	12
Tablo-2: Nektar ve Salgı Kaynaklı Balın Ortalama Kimyasal Bileşimi.....	16
Tablo-3: Polen Kimyasal Oran.....	30
Tablo-4: Arı Sütünün Bileşimi.....	33
Tablo-5: Aerobik Metabolizması Olan Canlılarda Oksijen Kaynaklı Reaktif Oksijen Türleri.....	39
Tablo-6: Fagositlerin Ürettiği Reaktif Oksidan Ürünler.....	47
Tablo-7: Doğal ballar ile işlenmiş market ballarının parametre değerleri	66

ŞEKİLLER

	SAYFA
Şekil-1: Hidroksimetilfurfural	22
Şekil-2 : HMF Ballarda Oluşumu Genel Olarak.....	23
Şekil-3: Oksijenin Normal Metabolizması Sonucu Oluşan Radikaller.....	38
Şekil-4: Doğal ballar ile Market ballarının Total Antioksidan Kapasiteleri.....	67
Şekil-5: Doğal ballar ile Market ballarının Total Oksidan Seviye	68
Şekil-6: Doğal ballar ile Market ballarının Amilaz Aktiviteleri.....	69
Şekil-7: Doğal Ballar ile Market Ballarının Total fenolik bileşikler içerikleri	70
Şekil-8: Doğal Ballar ile Market Ballarının protein düzeyleri	71

KISALTMALAR

TOS: Total Oksidatif Status

TAK: Total Antioksidan Kapasite

HMF:Hidroksimetilfurfural

ROS:Reaktif oksigen radikali

NO : Nitrik oksit

ÖZET
Marketlerde ve Attarlarda Satılan Balların Antioksidan ve Oksidan
Kapasitelerinin Araştırılması

Mehmet DOĞAN
Biyokimya, Yüksek Lisans Tezi

Yeryüzündeki 11.500'ü aşan bitki türünden yaklaşık 10.000 türü ülkemizde bulunmakta olup büyük bir çoğunluğu endemiktir. Ülkemizin bitki florasının çok zengin olması balımızı dünyada kıymetli kılmaktadır. Ülkemizin değişik bölgelerinde, sahip oldukları flora ya bağlı olarak, çeşitli ballar üretilmektedir (pamuk, çiçek, geven, maydanoz, kekik, sardal, narenciye ve üçgül gibi).

Bu çalışmada, doğrudan bal üreticisinden temin ettiğimiz, doğal olduğunu bildiğimiz farklı yöre balları ile piyasada marketlerde satılan çeşitli ticari marka balların toplam antioksidan kapasitelerini (TAK), toplam oksidan durumlarını (TOS), fenol içeriklerini, protein düzeylerini ve amilaz aktivitelerini araştırdık ve her iki grubun değerlerini birbirleriyle karşılaştırdık. TAK ve TOS testleri Erel yöntemleriyle, protein düzeyi Brillant mavisi ayracı ile, Fenol içeriği Folin-Ciocalteu ayracı kullanılarak çalışıldı. Amilaz aktivitesi ticari kit kullanılarak ölçüldü.

Doğal bal olduğunu bildiğimiz grubun amilaz aktiviteleri, TOS ve protein düzeyleri marketlerde satılan bal grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek, TAK düzeyi düşük bulundu. Fenol içerikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamadı. Amilaz ile TOS ve fenol düzeyleri arasında önemli korelasyonlar saptandı.

Balların amilaz aktivitelerinin ölçülmesi balların doğallığı ve tazeliği hakkında önemli değere sahip bilgi vermektedir. Balların TAK, TOS, protein ve fenol düzeylerinin belirlenmesi amilazın anlamını daha da artırabileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler : Antioksidan , Bal, Oksidan

ABSTRACT

Investigation Of Antioxidant and Oxidant Capacities Of Honeys Sold in Herbalists and Markets

Mehmet DOĞAN
Biochemistry, Master Thesis

Approximately 10.000 species of over 11.500 plant species in the world present in our country and a big majority is endemic. Honey of our country because of richness of plant flora in Turkey have been valuable. Different honeys depending on flora in different areas of our country have been produced. (such as cotton, flower, astragalus, parsley, thyme and citrus fruits)

In this study, we investigated total antioxidant capacities (TAC), total oxidant status (TOS), phenol levels, protein levels and amylase activities of different trademark honeys to be sold in markets and different regions honeys which we know to be natural and which we collected from direct honey producer, and we compared the values of both two groups with each other. TAC and TOS tests were measured with EREL methods, protein levels were measured with Brilliant blue reagent, phenol levels were studied using the Folin Ciocalteu reagent. Amylase activities were measured using the commercial reagent.

We found significantly higher values of amylase activities, TOS and protein levels of natural group from honeys to be sold in markets, whereas we found significantly lower TAC levels. Between the phenol levels in both groups have not been obtained statistically significant difference. Between amylase activities with TOS and phenol levels in both groups have been obtained important correlations.

Measurement of amylase activities of honeys has given the information to have important value about naturalness and freshness of honeys. We have thought that determination of TAC, TOS, protein and phenol levels of honeys can increase the mean of amylase activity more and more.

Keywords: Antioxidant, Honey, Oxidant

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üretimi M.Ö. 4000 yıllarına ve tüketimi daha eskilere dayanan bal, tarih boyunca insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemini almış, mağara resimlerine konu olmuş ve keşfedildiği günden bugüne değin besinler arasında belki de en gizemlisi olarak dikkatleri üzerinde toplamayı başarmıştır. Küçük bir canlının binlerce çiçeği dolaşarak insana sunduğu balın insan sağlığı için yine yadsınamaz öneme sahip olduğu kabul edilen bitkilerin ve özellikle de onlara ait çiçeklerin öz suyundan oluşturulması insanların ilgisinin artmasına neden olmuştur.

Çeşitli bitki türlerinden elde edilen ballar genel olarak içeriğindeki maddeler nedeniyle insan bünyesinde sağlık ve enerji kaynağı olarak önem kazanırken her bir çeşidinin daha yararlı olduğu bazı özel durumlar da bulunmaktadır. Örneğin Rize'nin Anzer yaylasında üretilen ballar insan sağlığı bakımından genel olarak tıbbi bal olarak değer kazanırken çam balı sindirim sistemi rahatsızlıklarında, okaliptüs balı ise solunum sistemi rahatsızlıklarında daha büyük bir öneme sahip olabilmektedir. Balın tıbbi değerinin artırılması amacı ile son zamanlarda farklı katkıları içeren şuruplarla arıların beslenmesi sonucu elde edilen ve "Expres Bal" olarak adlandırılan ballar tedavi amacı ile kullanılabilir. Balın tıbbi değerinin artırılması amacı ile son zamanlarda farklı katkıları içeren şuruplarla arıların beslenmesi sonucu elde edilen ve "Expres Bal" olarak adlandırılan ballar tedavi amacı ile kullanılabilir.

Arıların yutak üstü salgı bezlerinden salgılanan glikozoksidaz enziminin glikozu okside etmesi ile balın içerisinde oluşan glukonik asit ve H₂O₂ (hidrojen peroksit) balın antibakteriyel bir etkiye sahip olmasını sağladıkları gibi kaynağını oluşturan bitki türüne bağlı olarak değişen oranda balın antibakteriyel etkisi artabilmektedir. Bala uygulanan ısı ve ışık bu etkilerin azalmasına neden olmaktadır.

İnsan beslenmesinde alınması zorunlu görülen enerjinin çay şekeri olarak bilinen sakkaroz yerine balla alınması insan sağlığı açısından ayrı bir öneme sahip bulunmaktadır.

Sakkarozun organizmada emilebilmesi için enzimlerle monosakkaritlere indirgenmesi gerekmektedir. Baldaki şekerler ise doğrudan organ ve sistemler içerisine girerek hazır enerji olarak kullanılırlar. Bu nedenle gelişme bozukluklarında, hastalık ve nekahet sırasında alınması organizmanın daha çabuk toparlanmasında yardımcı olur.

Dünya üzerinde sayısı 11.500'ü aşan bitki türünden yaklaşık olarak 10.000 türü ülkemizde bulunmakta olup bunların büyük bir çoğunluğu endemiktir. Türkiye'de bitki florasının çok zengin olması ülkemizin balını dünyada kıymetli kılmaktadır. Ülkemizin değişik bölgelerinde sahip oldukları floraya bağlı olarak farklı ballar üretilmektedir (pamuk, çiçek, geven, maydanoz, kekik, sardal, narenciye ve üçgül gibi).

Bala olan talebin artması nedeniyle çeşitli biçimlerde üretim, pazarlama ve arz teknikleri geliştirilmiş bulunmaktadır. Ticari ürünlerin hazırlanması sırasında ısıl işlemler gibi bazı fizikokimyasal işlemler uygulanmakta olup, bu durum balın doğal yapısına zarar verebilmektedir.

Çalışmamızda bal üreticilerinden doğrudan, veya atarlar aracılığıyla sağlanan doğal balların ve marketlerde satılan ticari ürün ballarının toplam antioksidan kapasiteleri, toplam oksidan seviyeleri, fenol bileşiği içerikleri, protein miktarları ve amilaz aktivitelerini saptamayı ve her iki grubun değerlerini birbiriyle karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.ARILAR

Arılar tarihin çok eski devirlerinden bu yana insanlara bal üretmek için hizmet etmektedirler. Öyle ki arıcılık tarihi milattan önce 3500 yıllarına kadar dayanmaktadır.(1) Yirmi bin türden oluşan geniş bir familyaya sahip olan arılar, hayvanlar dünyasındaki en çarpıcı mühendislik ve mimarlık bilgisine sahip, sosyal hayatları ile diğer pek çok canlıdan ayrılan, aralarındaki iletişim ile kendilerini inceleyen bilim adamlarını hayretler içinde bırakan canlılardır.

Bal arıları diğerlerinden farklı özelliklere sahiptirler. Koloniler halinde yaşarlar. Bir arı kolonisi bir kraliçe, birkaç yüz erkek ve 10-80 bin arıdan oluşur. Görünüş olarak birbirinden farklı olan bu üç arıdan kraliçe arı ve işçi arılar dışıdır. Her kolonide sadece bir kraliçe bulunur ve diğer dişilere göre daha büyüktür. Kraliçenin temel görevi yumurtlamaktır. Bunun haricinde koloninin bütünlüğünü ve kovadaki sistemin işleyişini sağlayan önemli maddeler sağlar. Kraliçe bireyler arasında en uzun yaşayandır. Yaşam süresi 5-7 yıldır. Günde kendi ağırlığına eş ağırlıkta 2000-3000 adet çok iyi koşullarda ise 6 bin adet yumurta bırakabilir. Erkekler ise dişilerden iridirler ama ne iğneleri vardır, ne de kendileri için besin toplayabilecek organları. Tek fonksiyonları kraliçeyi dölemektir. Kovanda petek örme, yiyecek toplama, arı sütü üretme, kovan ısını düzenleme, temizlik, savunma gibi akla gelebilecek tüm işleri ise işçi arılar yaparlar.

Yapılan araştırmalar, bilgisayarın saniyede 16 milyon aritmetik işlem yaptığı ama doğadaki kıyaslanamaz rakibi bal arısının daha az enerji harcayarak 10 trilyonluk işlem yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Mühendislik harikası petek gözünün derinliği 12 mm, duvar kalınlığı ise 1/500 inç olup en az bal mumu harcayarak maksimum ölçüde bal depolamak için en uygun şekil, arıların inşa ettiği altıgen prizmadır. 450 gramlık saf balı elde edebilmek için yaklaşık olarak 17 bin bal arısının 10 milyon çiçeği ziyaret etmesi gereklidir. Arının yiyecek aramak için ihtiyaç duyduğu ortalama bir gezinti yaklaşık olarak beş çiçek ziyaretini gerektirir ve 25 dakika sürer. Bu yüzden 450 gram saf bal edebilmek için arıların 7

bin iş saati çalışmaları gereklidir (2). Arı kovanındaki hayatın her aşamasında bir düzen vardır. Larvaların bakımından, kovanın genel ihtiyaçlarının teminine kadar her görev hiç aksamadan yerine getirilir. Diğer canlılarda olduğu gibi arılarda farklı büyüme evrelerinden geçerler, arı yavruları, sırayla larva ve pupa evrelerini tamamlayarak erişkin hale gelirler. Kraliçe arının yumurtaları bırakmasıyla başlayan bu dönem boyunca arı yavrularına son derece özenli ve dikkatli bir bakım uygulanır. Yumurtaların gelişimi için gerekli olan şartların sağlanmasından yumurtadan çıkacak olan larvaların ihtiyaçları olan besin maddelerinin temin edilmesine, hücre sıcaklıklarının sabit tutulmasından, özel hücre kontrollerine kadar pek çok şey özel olarak ayarlanır. İşçi arılar, detaylı metotlar kullanarak larvalara çok dikkatli bir bakım uygularlar. Hücrelerdeki arı yumurtaları yaklaşık 3 gün içinde gelişirler. Ve büyüme dönemi boyunca işçi arıları tarafından yaklaşık 10.000 kere ziyaret edildikleri tespit edilmiştir (3).

Larvalar yumurtadan çıktıktan sonraki ilk üç günleri boyunca arı sütü ile beslenir. Arı larvaları bu dönemdeki düzenli beslenme sonucunda 6 gün içerisinde ilk ağırlıklarının 1500 katına kadar ulaşırlar (4).

Kovanda binlerce arı larvası olmasına ve bu larvaların besleme şekillerinin günlere göre değişiklik göstermesine rağmen hiç karışıklık çıkmaz. Larvaların hangisini kaç günlük olduğu hangisinin ne ile besleneceği gibi detaylar işçi arılar tarafından hiç atlanmaz.

Arı kovanındaki özel hazırlanmış peteklerde büyümeye devam eden larvaların yedinci günlerde şaşırtıcı bir olay gerçekleşir larva yemek yemeyi keser ve bakıcı arıları larvanın bulunduğu hücrenin ağzını mumdan yapılmış hafif kubbeli bir kapak ile tamamen kapatırlar. Bu sırada larvada kendi ürettiği bir madde ile bulunduğu odanın içinde etrafına koza öreerek kendini buraya adeta hapseder.

Larva artık Pupa dönemine girer ve bulunduğu hücre içinde 12 gün boyunca kalır. Arı yumurtası hücreye bırakıldıktan tam üç hafta sonra uçmaya hazır bal arısı çıkar ve yaklaşık 6

hafta sürececek ömrüne başlamış olur. Kraliçe gibi dişi olan işçi arılar hücrelerinden çıkmaz büyük bir hızla kovanın işlerine koyulurlar.

2.1.1. Temizlik

Bir işçi arının kovanındaki ilk görevi temizliktir. Pupadan çıkan arı hemen temizliğe başlar. Öncelikle kendi hücresinde başlayarak ilk iki gün boyunca kuluçka hücrelerini temizler.

2.1.2. Larva Bakıcılığı

Hayatlarının ilk 3.gününden itibaren larvaların beslenmesi için üstlenenler bu konuyla ilgili her türlü detayla özenli bir şekilde ilgilenirler.

2.1.3. Petek İnşası ve Onarım

10. günden itibaren arılar kovan dışına çıkarak çevreyi tanır. Bu arada işçilerin karnındaki balmumu bezleri gelişmeye başlar. 12. günlerinde olgunlaşarak balmumu üretecek hale gelirler. 12.günlük olan işçiler, arı yavrularını beslemeyi keserler ve birbirine eşit altıgenlerden oluşan peteğin inşasına koyulurlar.

2.1.4. Kovan Bekçileri

Bu dönemde arıların iğne bezleri gelişir ve zehir üretmeye başlar. İşte bu dönemdeki arılar kovan kapısında nöbet tutarak davetsiz misafirlerin içeri girmesini engellerler. Gelen

her canlı (arılar bile) kapıdaki nöbetçinin kontrolünden geçerek içeri girebilir. Nöbetçi arının yerinden ayrılması durumunda ise hemen başka bir işçi arı nöbeti devralır.

2.1.5. Bal Yapımı

İşçi bal arılarının hayatlarının son dönemindeki görevleri ihtiyaçları olan tüm besin maddelerini (Polen ve Nektar) toplamaktır. Arılar kışın besin bulamadıkları için kovanlarına bal depo ederler. Kış için ayrıca polen depo edilmez yalnız yağmurlu havalarda kullanılmak üzere yavru arılara yetecek kadar polen biriktirilir.

Canlı öldüğünde bedeninde bozulmaların olacağı ve ortaya çıkan maddelerin kovandaki canlılara zarar verebileceğini bildiklerinden bu bozulmayı önlemek için ölen canlıyı özel bir kimyasal işleme tabi tutarak içindeki bakteriyi barındırmama özelliğine sahip arı reçinesi de denilen propolis ile kaplarlar (5).

2.2.BAL

2.2.1. Balın Tanımı

Bal, bal arıları tarafından çiçeklerden ve meyve tomurcuklarından alınarak yutulan nektarın, arıların bal midesi denilen organlarında invertaz enzimi sayesinde kimyasal değişime uğramasıyla oluşan ve kovandaki petek hücrelerine yerleştirilen, çok faydalı bir besindir. Nektar bala çevrilirken arılar sağladıkları invertaz enzimi sayesinde sakkarozu inversiyona uğratarak fruktoz ve glikoz şeklinde basit şekerlere dönüştürür ve fermantasyonun meydana gelmesini önleyecek miktarda suyunu uçururlar. Kovandaki hücrelere yerleştirilen ve üzeri mumdan bir kapakla örtülen ürün, arılar tarafından sağlanan özel havalandırma sistemi sayesinde bildiğimiz tat ve kıvama gelir (6).

2.2.1. Balın Sınıflandırılması ve Bal Çeşitleri

2.2 .1.1 Arıların Yararlandığı Kaynaklara Göre Ballar

Çiçek balı (saf nektar balı), salgı balı ve beslenme balı olarak üçe ayrılır. Çiçek balında, bal arısının bitkilerin çiçeklerinden topladığı nektar veya bal özü denen tatlı suları vücutlarındaki özel bezlerden salgılanan maddelerle karıştırarak zenginleştirmesi ve peteklerde olgunlaştırması sonucu doğal bal veya çiçek balı elde edilir. Nektarın topladığı çiçeğin tadı balın aromasında hissedilir (portakal çiçeği balı, ıhlamur çiçeği, yonca balı, vb.) (7).

Salgı balı, ıhlamur, meşe, erik, çam ağacı gibi bitkilerin yapraklarının sızdırdıkları şekerli sıvı ile, yaprak bitleri kırmızı böceği gibi bazen ufak böceklerin yapraklar üzerine salgıladıkları tatlı sıvıdan meydana gelen ballardır. Bir başka tanıma göre salgı balı, geneli orman ağaçları üzerinde yaşayan böceklerin tatlı salgılarının arılar tarafından toplanmasıyla oluşan ballardır .

Beslenme ballarında ise bazı balcılar, fazla çiçek bulunmayan yerlerde kovanların çevresine kaplar içinde şerbet gibi tatlı çözeltileri dizerek arıları bunlarla beslerler. Bu şekilde beslenmiş arıların yaptıkları doğal olmayan ballara “beslenme bal” denilmektedir. Bu balların tadı yavan renkleri açıktır (beyaz uçuk sarı) sakkaroz miktarı yüksek (%10’ dan fazla) olur (8).

2.2.1.2.Tüketime Sunuş Şekillerine Göre Ballar

Petekli bal, süzme bal ve pres bal olmak üzere üç bölüme ayrılır. Petek içinde bulunan ve hiçbir yabancı madde içermeyen gümeç ağızları sırlanmış ve gümeçleri bozulmamış doğal bala “petekli bal” denilmektedir. Çeşitli yöntemlerle petek gözlerinden dışarıya çıkarılıp kaplara konduktan sonra dinlendirilip süzülerek çıkarılan bala “süzme bal” adı verilmektedir. Petekli balın oda sıcaklığında veya enzimlerini yitirmeyecek biçimde hafif

ısıtılarak basınç altında sızdırılmasıyla elde edilen bala “ pres balı” denilir .

Petekli ballarda kendi arasında üçe ayrılır. Bunlar: Çerçeveli petekli ballar, seksiyon petekli ballar, kesilmiş parça ballardır. Çerçeveli petekli ballar, fenni kovandan çıkarıldığı gibi çerçevesiyle piyasaya çıkarılan ballardır. Seksiyon petekli ballar, çerçeveler içerisine yerleştirilmiş özel seksiyonlar içerisinde elde edilen ve bu şekilde satılan ballardır. Seksiyon petekli ballar, çerçeveden kesilerek çıkarılmış çeşitli büyüklüklerde plastik veya teneke kutularla veya jelatinli kağıtlara sarılı durumda satılan ballardır.

2.2.3. Balın Fiziksel (Organoleptik) Özellikleri

2.2.3.1. Balın Rengi

Bal genellikle saydamdan başlayıp koyu kırmızıya kadar sarı, kehribar, kahverengi yeşilimsi ve kırmızımsı renkte olmaktadır. Ballar renklerine göre; su beyazı ,ekstra beyaz ekstra açık amber, koyu renk olmak üzerine dört gruba ayrılır. Bala renk veren maddeler; Klorofil, karoten, ksantofil bitki pigmentleridir.

1930 yılında Yeni Zelanda’da Thomson adlı araştırmacı balın rengi ile kimyasal bileşimi arasındaki ilişkiyi incelemiş ve koyu renkli ballarda amino asit ve şeker miktarını ile mineral maddelerden özellikle demir bakır, manganez miktarının fazla olduğunu ve baldaki mineral maddeler artıkça renginin koyulaştığını bildirmiştir.

Von Fellenberg ve Rusrecki balın rengini su ve lipitlerde çözülebilir fraksiyonlara ayırmış, karotenoidlerin balın renginden sorumlu olduğunu ama bunların karotininle özdeş olmadıklarını ortaya koymuşlardır (9).

2.2.3.2. Balın Lezzet ve Aroması

Her balın kendine özgü bir tadı vardır, dikkatle tadılırsa lezzetler hissedilir. Baldaki aromanın asıl maddeleri esterler, aldehitler, ketonlar, alkoller ve serbest asitlerdir. Bu maddeler arasında en geniş yeri alkoller almaktadır. Aroma maddeleri daha çok hammadde olan nektardan gelirken, nektar hangi bitkilerden toplanmış ise o bitkinin aromasını bu balda hissetmek mümkündür.

2.2.3.3. Balın Kokusu

Bal içindeki polene bağlı olarak özel bir kokuya sahiptir. Bala doğal kokusunu veren maddenin diketon gibi bir diasetol olabileceği ileri sürülmüştür. Balın kokusu ağza alınıp yenilirken hissedilir. Genellikle koyu renkli ballar açık renkli ballardan daha keskin kokulu ve daha asitlidirler.

2.2.3.4. Balın Viskozitesi

Viskozite akıcılığa karşı koyma özelliği olup arıcılıkta bünye kelimesi karşılığıdır. Ağır bünyeli bir balın akıcılığı yavaştır. Koyu renkli balların vizkozitesi yüksektir

2.2.3.5. Balın Kıvamı

Balın kıvamını nektarın alındığı bitki çeşidi etkilemektedir. Balın duru veya bulanık olması içindeki hava kabarcıkları, su oranı ve kolloid maddelerin fazla veya az olmasına bağlıdır. Bala uygulanan işlemler sırasında hava kabarcıkları az olursa bal daha berrak olur. Sıcak bölgelerde ve hafif kumlu topraklarda yetişen bitkiler koyu kıvamda bal meydana getirirken, yayla ve dağlık bölge çiçeklerinden yapılan ballar daha akıcı olup lezzet ve aroma bakımından da üstündürler.

2.2.3.6. Balın Özgül Ağırlığı

Balın özgül ağırlığı, içersindeki su miktarı ve sıcaklığa bağlı olup 1.41-145 g/cm³ arasında değişmektedir. Bal 20°C de ölçüldüğünde balın özgül ağırlığı 1.4225 g/m³ olarak bulunmuştur.

2.2.3.7 . Balın Kırılma İndisi

Bu değer 20°C de refraktometre ile ölçülen bir özelliktir. Balın bu özelliğinden faydalanarak içersindeki rutubet miktarı tayin edilmektedir. Yeteri kadar bal numunesi refraktometrenin prizma yüzeyleri arasına konur alet kullanma talimatına göre kapatılır. Gerekli su bağlantıları ile numunenin bulunduğu bölgenin sıcaklığı 20°C' ye ayarlanır ve balın optik kırılma indeksi okunur (10).

Tablo 1. Balın 20°C sıcaklıktaki kırılma indisi ile % rutubet oranları arasında ilişki.

Kırılma	Rutubet	Kırılma	Rutubet	Kırılma	Rutubet
İndisi 20°C	Miktarı%	İndisi 20°C	Miktarı%	İndisi 20°C	Miktarı%
1,5044	13,00	1,4940	17,00	1,4840	21,00
1,5038	13,20	1,4935	17,20	1,4835	21,20

1,5033	13,40	1,4930	17,40	1,4830	21,40
1,5028	13,60	1,4925	17,60	1,4825	21,60
1,5023	13,80	1,4920	17,80	1,4820	21,80
1,5018	14,00	1,4915	18,00	1,4815	22,00
1,5012	14,20	1,4910	18,20	1,4810	22,20
1,5009	14,40	1,4905	18,40	1,4805	22,40
1,5002	14,60	1,4900	18,60	1,4800	22,60
1,4997	14,80	1,4895	18,80	1,4795	22,80
1,4992	15,00	1,4890	19,00	1,4790	23,00
1,4987	15,20	1,4885	19,20	1,4785	23,20
1,4982	15,40	1,4880	19,40	1,4780	23,40
1,4976	15,60	1,4875	19,60	1,4775	23,60
1,4971	15,80	1,4870	19,80	1,4770	23,80
1,4966	16,00	1,4865	20,00	1,4765	24,00
1,4961	16,20	1,4860	20,20	1,4760	24,20
1,4956	16,40	1,4855	20,40	1,4755	24,40
1,4951	16,60	1,4850	20,60	1,4745	24,80
				1,4740	25,00

2.2.3.8. Balın Higroskopik Özelliği

Bal higroskopik bir madde olup bulunduğu ortamdaki havanın nemini çekme özelliğine sahiptir. Balın havadan nem alması onun özel yapısına, şeker oranına ve içersindeki su miktarına bağlı olarak değişmektedir.

2.2.3.9 . Balın Işığı Döndürmesi (Polarizasyonu)

Balın polarize ışığı çevirme yönü ve miktarı bal çeşitlerine göre değişmektedir. Çiçek balları polarize ışığı sola, salgı balları polarize ışığı sağa çevirdiğinden bu özellikten faydalanarak balın salgı balı mı yoksa çiçek balı mı olduğu anlaşılır .

Normal ve olgunlaşmış baldan hazırlanan taze solüsyonlar polarize ışığı sola çevirirken, sakkarozu fazla olgunlaşmamış veya temil ballarda, dekstrince zengin olan ballarda ışığı sağa çevirirler bu durum suni balın tespitinde kullanılır ve bu tespit sakametre ile yapılmaktadır.

2.2.3.10. Balın kristalizasyonu ve etki eden faktörler

Balların büyük bir kısmı kristallenmeye eğilimlidir. Bu eğilim balın içerdiği su, dekstroz ve levüloz şekeri oranlarına ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Kristalizasyona balın elde edildiği bitki kaynakları da etkili olmaktadır. Özellikle “hindiba” gibi bal çeşitlerinde dekstroz miktarı daha fazla olup, bal ekstraktörde kristallenirken dekstrozu çok düşük olan “tupelo” (Nysa) balı (fruktoz miktarı %48, glikoz miktarı %24 birkaç sene kristalize olmadan korunabilmektedir.

Kristallenme şeker bileşimine bağlı bir olaydır. Kristallenmeden sorumlu olan faktör, glikoz olup monohidrat halinde çökmektedir. Çoğu zaman balda diğer şekerlerin varlığı bu olayı etkileyebilirken sakaroz, maltoz ve melezitoz şekerleri için ispatlanmıştır. Sakkaroz ve maltoz fruktoza benzer davranış göstererek glikozun çözünürlüğü azaltırlar. Melezitoz ise kristallenmeyi hızlandırmakta kristallenme de fermantasyonu çabuklaştıran bir etkendir. Bal üreten, satan ve tüketen herkes tarafından balın zamanla kristalize olduğu yani akıcılığını kaybederek sertleştiği görülmüştür. Balın kristalize olması haline yanlış olarak “şekerlenmiş” deyimini kullanılmaktadır. Halkımız bal içersindeki çok çeşitli şekerleri bal olarak tanıdığı için bu ballara şeker katılmış veya şekerden yapılmış nazarıyla bir yanılgıya düşmektedir (11).

Bazı ballar üretildikten hemen sonra hatta bazıları petek gözü içerisinde iken kristalleştiği halde bazıları ise birkaç ay veya yıl sıvı kalabilir. İçerisinde bulunan ve ekşimeye sebep olan şekere dayanıklı mayaların tahrip edilmesi ve kristalleşmenin geciktirilmesi için ballar ısıtılarak pastörize edilmektedir. Pastörizasyon işleminde sıcaklık derecesi yükseltince süre kısaltmakta sıcaklık derecesi düşürülünce süre uzamaktadır. Ballar 68°C‘ de 1 dakika veya 54°C ‘de 3 saat ısı işlemine tabi tutulduklarında içerisindeki mayalar tahrip olmakta ve ekşime önlenmektedir. Isıtma çoğu zaman 60-65°C’ de 30 dakika süre ile de yapılmaktadır. Isıtma işleminin sonunda bal kısa süre içerisinde soğutulmalıdır.

Balın kristalizasyonuna etki eden faktörler baldaki şeker oranı, glikoz/su oranı, ısı etkisi ve alet ekipman etkisi olarak sıralanabilir.

Kristalizasyonun hızı baldaki glikoz, fruktoz oranına ve su miktarına bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak baldaki fruktoz miktarı glikozdan fazladır. Eğer glikoz miktarı fruktoz miktarına yaklaşırsa bal çabuk, aradaki fark büyürse geç kristalleşmektedir. Olgunlaşmamış balda sakkaroz fazla, glikoz daha az olduğu için kristalizasyon yavaş olurken olgunlaşmış ballarda ise daha az sakkaroz bulunmaktadır. Fruktozun glikoza oranı 1.0-1.2 arasıdayken kristallenme gecikmektedir. (12)

Glikoz / Su = 1,70 ve daha küçük değerlere sahip olan ballar hiç kristalize olmamakta “ Glikoz /su =2,10” ve üzeri değerler çabuk kristalize olurlar.

Ballar en fazla 14°C‘de kristalize olmakta, kristalizasyon 5-7 °C de başlamaktadır. Bu derecelerin dışında saklanıldığında kristalleşme gecikmektedir. Son yıllarda ultrasonik dalga ve homojenizasyon gibi metodlar uygulanmaktadır.

Kristal hücresi teşekkülünden sakınmak için pratikte kullanılan cihazların ve boru sistemlerinin, kullanım haricinde devamlı olarak bal kalıntılarında temizlenmiş halde tutulması dikkat edilmektedir. Cam kavanozların, kapakların veya özel ambalajlarında balın doldurulması sırasında tozsuz ve tamamen kuru olmaları gerekmektedir.

2.2.4. Balın Kimyasal Özellikleri

Balın kimyasal bileşimi birçok etkene bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu etkenlerin en önemlisi nektar ve salgının doğal bileşimidir. Ayrıca iklim koşulları ve arının bal yapma özelliği de balın kimyasal bileşiminde etkili olmaktadır. Kimyasal bileşimi bakımından bal, fruktoz, glikoz, sakkaroz, dekstrin, azotlu maddeler, enzimler, anorganik kokulu ve boyar maddeler, uçucu yağ, organik asitler, mumlar ve polen taneleri ihtiva etmektedir.

Tablo 2. Nektar Ve Salgı Kaynaklı Balın Ortalama Kimyasal Bileşimi

Özellikler	Nektar	Salgı
	kaynaklı Bal	Kaynaklı Bal
Nem (%)	17,20	16,30
Fruktoz (%)	38,19	31,80

Glikoz (%)	31,28	26,08
Sakkaroz (%)	1,31	0,80
Maltoz (%)	7,31	8,80
Yüksek Moleküllü Şekerler(%)	1,50	4,70
Diğer Maddeler (%)	3,10	10,10
Toplam Asitlik(meq/kg)	29,12	4,45
Kül (%)	0,169	0,736
Nitrojen (%)	0,041	0,100
Diastas Sayısı	20,8	31,9

2.2.4.1. Balda Rutubet Miktarı

Balın tipik tatlılık ve sağlığa uygunluğunu sağlayan şekerler yeteri kadar yüksek konsantrasyonda olduğunda fermantasyon başlamamaktadır. Su oranı % 18,5 ve daha yüksek olduğunda fermentasyon şekillenirken, bu değer in altında olduğunda normal şartlarda fermentasyon azalmaktadır. Fermantasyon sonucu oluşan asetik asit ve karbondioksit balın tadını ve rengini bozduğundan ballardaki maksimum su oranı %21 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak dağ balları, ova ballarından daha az nem içerirken fazla nem balın olgunlaşmadığını yada dışarıdan su katıldığını göstermekte bu durumda balın yüzey mayalanması tehlikesini doğurmaktadır .

2.2.4.2. Baldaki Karbonhidratlar

Bal karbonhidratlı bir madde olup katı maddesinin %95-99,9' unu şekerler teşkil etmektedir. Balda en fazla fruktoz ve glikoz bulunmakta ve bala tadını veren bu iki

monosakkaridin (basit şekerin) bitki özsularında fazla miktarda bulunan sakkarozun invertaz enzimi ile inversiyona uğraması sonucu meydana geldiği bilinmektedir.

Balın tatlılık, nem kapma, enerji değeri ve diğer fiziksel özellikleri bu iki şekerden ileri gelmektedir. Genelde bütün ballarda fruktoz miktarı fazla iken kolza (*Braspicanapus*) ve kara hindiba çiçeği (*Taraxacum afficinale*) gibi bazı bitkilerden elde edilen ballarda glikoz oranı daha yüksek olmaktadır. Diğer karbonhidratların büyük kısmını iki veya daha fazla fruktoz ve glikoz molekülünden oluşan oligosakkaritler ve az miktarda polisakkaridler oluşturmaktadır.Yapılan pek çok analizlerin ortalaması olarak çiçek balında %70-80 invert şeker, eser miktardan %5'e kadar varan oranlarda sakaroz, %7,3 indirgen disakkaritler (maltoz, izomaltoz ve diğerleri) ve % 1,5 oranında dekstrin bulunmaktadır. Salgı balı, çiçek balına göre daha düşük invert şeker (%60-70) ve daha yüksek oranda sakkaroz (%5-10) ihtiva ederken indirgen disakkarit ve dekstrin miktarları ise çiçek balıyla yaklaşık aynı orandadır.

Yüksek sakkaroz miktarı (%8 ve üzeri) arıların şekerle fazla beslenmesiyle ilgilidir. Bunun sonucunda, mat renkli, tanımlanamayan bir tatta ve kokuda bal oluşur. Sakkaroz miktarının belli bir limite tutulmasının ana amacı arıların şekerle beslenmesi ile bal üretiminden vazgeçirmek veya sonradan balın direk olarak sakaroz ile karıştırılmasını önlemektir (13).

2.2.4.3. Baldaki Enzimler

Bal enzimler bakımından oldukça zengindir. Enzimlerin bir kısmı nektardan ve yaprak bitlerinin yaprak üstünde bıraktıkları salgıdan, büyük bir kısmı ise arıların tükürük bezi salgılarından meydana gelmektedir.

- Amilaz (diastaz)

- İvertaz (sakaraz)
- Katalaz
- Fosfataz
- Glikozoksidaz

Baldaki amilazlar; alfa amilaz, beta amilazdır. Alfa amilaz; nişastaya etki ederek alfa 1,4 glikozit bağlarını parçalar, dekstrin ve çok az miktarda maltoz oluşur. Uzun süre sonunda dekstrin maltoza ve izomaltoza parçalanır. Alfa amilazın optimum aktivitesi 22-30 °C 'de pH 5,0'dır. Beta amilaz; Polisakkaritlerin indirgen olmayan ucundan her defasında bir maltoz birimini oluşturmak üzere alfa 1,4 glikozit bağlarını hidrolizler. Beta amilazın optimum aktivitesi 45-50°C pH 5,3'dür.

İvertaz (sakaraz) Enzimi; Nektarın bala dönüşmesindeki kimyasal değişikliklerin çoğundan sorumlu olup nektardaki sakarozun fruktoz ve glikoza çevrilmesini sağlamaktır. İvertazın fruktoinvertaz ve glikoinvertaz iki genel tipi vardır.

Önemli bal enzimlerinden olan glikozoksidaz, glikoz etki ederek hidrojen peroksit ve glikonolaktan oluşturmaktadır. Balın antibakteriyel etkisi de oluşan hidrojen peroksitten kaynaklanmaktadır. Isı, invertaz ve amilazın aktivitelerini olumsuz yönde etkilemektedir Isı ile bu enzimlerin etkinlikleri azalırken hidroksimetil furfural (HMF) içeriği artmaktadır.

Gıda maddeleri tüzüğüne göre amilaz sayısı (diastaz) sayısı) 8' den az olmakla birlikte diastaz sayısı 40°C'de 1 saatte 1gr baldaki enzim tarafından hidrolize edilebilen %1'lik nişasta çözeltisinin mililitresi olarak tanımlanmaktadır.

2.2.4.4. Baldaki Asitler

Balda en fazla bulunan asit komponenti glikozoksidaz enziminin faaliyeti sonucu meydana gelen glikonik asittir. Balın asitliği mikroorganizmalara karşı stabilitesini artırırken arılar bala formik asit ilave ederek balın olgunlaşmasına yardım ederler. Balın asitlik derecesi malik asit cinsinden hesaplanmış %0,1 – 0,4 arasında olup, asitliği %0,4 ‘ten fazla olan ballar şüpheli ballardır.

2.2.4.5. Baldaki Proteinler

Azotlu maddeler, çiçek ballarında %0,3 salgı ballarında ise %1 civarındadır. Çiçek ballarında azotlu maddelerin yüksek çıkması, salgı balı ile karıştırıldığını göstermektedir. Balda proteinlerin belirlenmesi doğal veya yapay olup olmadığı açısından ve beslenme yönünden önem taşımaktadır. Balda 15 çeşit amino asit tespit edilmiştir. Tirozin ve triptofan koyu renkli ballarda daha fazla bulunur .

Ballarda miktar olarak en fazla bulunan aminoasitler;

- Prolin
- Lisin
- Glutamik asit
- Histidin
- Arjinin
- Treonin
- Serin
- Glisin
- Valin
- Metionin
- Lösin

- Alanin
- Fenilalanin

2.2.4.6 . Baldaki Vitaminler

Son yıllarda yapılan kimyasal ve biyolojik araştırmalar sonucunda balda B grubu vitaminler B₁ ,B₂ ile C, E ve K vitaminlerinin varlığı gösterilmiştir.

2.2.4.7. Baldaki Mineral Maddeler

- Potasyum (K)
- Kalsiyum (Ca)
- Kükürt (S)
- Klor (Cl)
- Kalsiyum oksit (CaO)
- Fosfor (P)
- Magnezyum (Mg)
- Silisyum oksit (SiO)
- Bakır (Cu)

2.2.4.8.Balda bulunan Diğer Maddeler

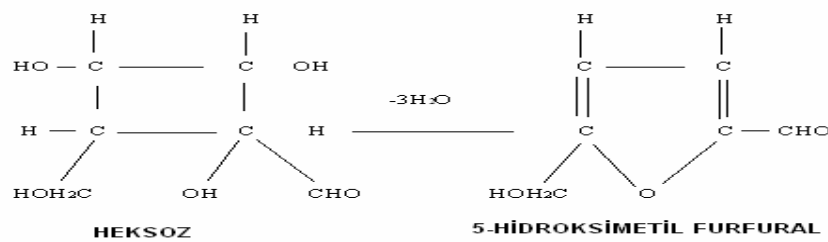
- Hidroksi Metil Furfural (HMF)
- Bazı toksik maddeler
- Lipidler
- Tokoferoller
- Alkoloidler

- Flavanoidler
- Fenolikler
- Karboniller
- Esterler
- Maya sporu gibi mikroorganizlar

2.2.5. Hidroksimetilfurfural

2.2.5.1. Hidroksimetilfurfuralın Tanımı (HMF)

Hidroksimetilfurfural, ısıl işlem sonucu indirgen şekerler ve amino asitler arasındaki tepkimeyle oluşan ve birçok mamulde aşırı ısı uygulamasını önlemek için miktarı sınırlanan bir bileşiktir. Bu sınır balda en çok 40mg/kg'dır. Heksozların asidik ortamda ısıtılması da hidroksimetilfurfural oluşumuna yol açmaktadır (14).



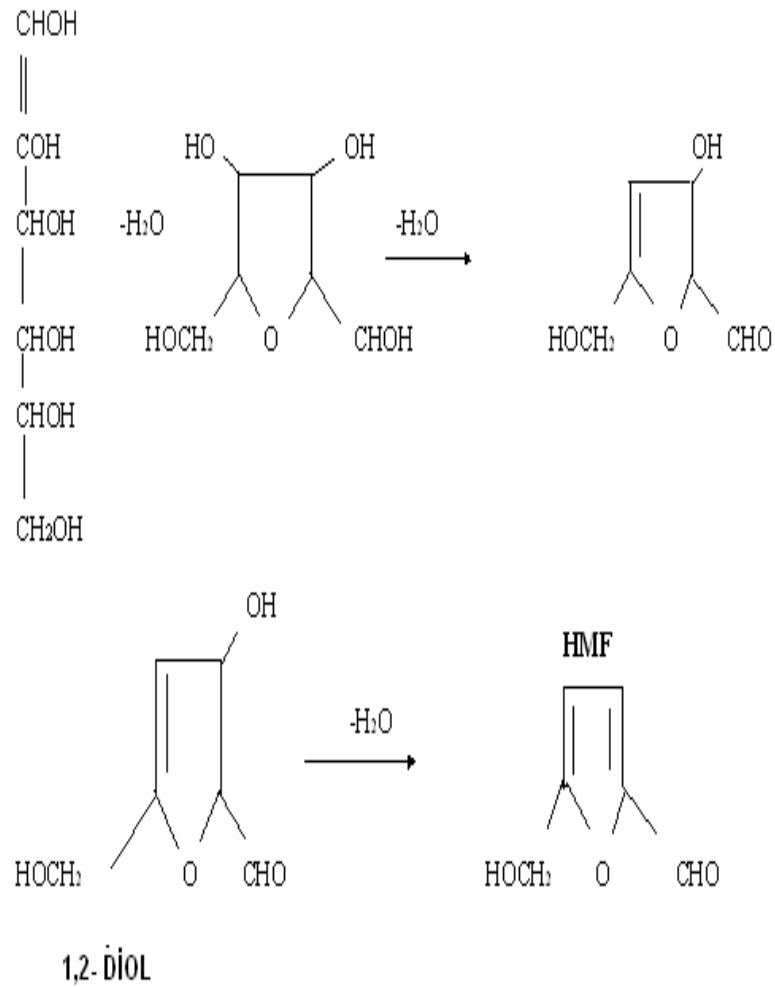
Şekil 1 : Hidroksimetil furfural

Bir başka tanıma göre pişirme yada sterilizasyon esnasında gıdalara uygulanan ısı işlemler sonucu indirgen şekerlerin amino asitlerle oluşturduğu ve enzimatik olmayan “Maillard reaksiyon” neticesinde oluşan en temel ara ürün HMF (5-Hydroxymethylfurfural)’dir.

2.2.5.2 .Hidroksimetilfurfuralın Oluşumu ve Önemi

Balda önemli bir kalite faktörü olan HMF işlem sırasında ısıtmakla oluştuğu gibi uzun süre bekletilen ballarda da zamanla oluşabilmektedir. Yüksek sıcaklıkta ve uzun süre bekleme sırasında balda bulunan fruktoz ve glikozun çok az bir kısmı HMF’ e dönüşmektedir.

Genel olarak mekanizma aşağıdaki gibidir.



Şekil 2: Genel Olarak Ballarda HMF Oluşumu

Balda HMF'in oluşumu pH, sıcaklık, ısıtma süresi ve şeker konsantrasyonuna bağlı olduğundan balın kalitesini belirlemede kullanılan en önemli kriterlerdendir. HMF, taze ballarda da az miktarda bulunur, ancak miktarı 10 mg/kg ı nadiren aşar. Balın uzun süre

depolanması ve yüksek sıcaklıkta ısıtılması bu oran 30-40mg/kg 'a kadar yükselir. Bu oranın 150 mg/kg 'dan büyük olması bala invert şeker katıldığıının belirtisidir (15).

2.2.5.3.Balda HMF Oluşumunu Hızlandıran Etkenler

Türkiye’de bal genellikle süzülerek pazarlanmaktadır. Bal eldesi sırasında peteklerde süzme işlemini kolaylaştırmak ve kristallenmeyi geciktirmek için genelde ısıtma işlemi uygulanmakta ve bu işlem sırasında baldaki HMF miktarı yükselme, diastaz aktivitesinde ise düşme olduğu bilinmektedir.

Balın depolanması esnasında HMF değişimi üzerinde Fiehe ve anilin klorid testleriyle çalışıldığında, HMF gelişiminin kendini katalize ettiğini, şeker ve sakarinin ısıtma esnasında, depolamada ve asitlerle muamelede HMF geliştirdiği bilinmektedir. Bundan dolayı taklit olmayan bir bal örneği bile belli bir miktarda HMF ihtiva eder. FAO/WHO'nun Codex Alimentarius komisyonu, baldaki HMF konsantrasyonunu, balın bayatlığını depolandığı koşulları ve invert şekerle karıştırılıp karıştırılmadığını kontrol edebilmek için 40ppm(40mg/kg)in altında belirlenmiştir (16).

2.2.6.Balın Besin Değeri ve Sağlık Üzerine Etkileri

2.2.6.1 Balın Beslenmedeki Önemi

Balı bildiğimiz şekerlerden ayıran çok önemli fark vardır. Şeker ancak sindirim sisteminde değişime uğradıktan sonra kana karışırken bal, sindirime gerek olmadan çok süratli bir şekilde kana karışır. Dolayısıyla bal insan vücudunun en yüksek derecede ve en hızlı biçimde faydalanacağı bir gıdadır.

Bal temel olarak besin maddesi ve enerji kaynağı olarak kullanılmakta bunun yanı sıra insan sağlığı bakımından da önem taşımakta çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bazı bakteri türlerinin büyümesi için optimum pH'nin 7.2-7.4 arasında olması gereklidir. Minimum düzeyde ise Escherichia coli'nin gelişmesi için pH'nin 4.3; salmonella sp'nin, Streptococcus pyogenes için pH 4.5 olması gereklidir. Bundan dolayı sulandırılmış balın asitliği önemli bir anti bakteriyel faktördür.

Bal yara ve yanıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Yara ve yanıkların tedavisinde kullanılan krem ve antibiyotiklerin, yara izi, yara kabuğu gibi olumsuz etkileri bulunmakta bal kullanılmasıyla bu olumsuz etkiler görülmemekte ve yanıklara karşı kullanılan silver sulfadiazine yerine bal kullanımıyla iyileşme daha kısa bir süre içinde gerçekleşmektedir .

Bal kronik sindirim sistemi hastalıklarında özellikle peptik ülser ve hazımsızlığa duodenal ülsere çocuklarda ise bakteriyel gastroenteritise karşı etkili bir şekilde tedavi amacıyla kullanılmaktadır (19).

Klinik araştırmalarda ise gözde, katarakt hastalığına, konjuktivit ve çeşitli kornea rahatsızlıklarına karşı, direkt gözün içine uygulanarak kullanıldığı bilinmektedir. (20)

Balın şeker hastaları için uygun bilinir ancak bal yüksek şeker içeriğine sahiptir. Bununla birlikte şeker hastaları için şekerli bir üründen daha iyi olduğu bildirilmiştir. Eşit kaloriye sahip diğer gıdaların bal karşılığında balın daha az insülin gerektirdiği, ancak tüketildikten kısa bir süre sonra kandaki şeker oranının aynı veya biraz daha yüksek olduğu

belirlenmiştir. Bal ve aynı miktarda sukroz tüketimi karşılaştırıldığında kan şeker oranının bal tüketimiyle daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Böbrek fonksiyonlarını düzenleyici, uykusuzluğu giderici, ateş düşürücü etkisi bulunmakta olup, kalp-dolaşım sistemi hastalıkları ve karaciğer rahatsızlıklarına karşı kullanılmaktadır.

Balın antifungal aktivitesinin de bulunduğu ancak bir çok mantar türlerine karşı bu aktivitenin test edilmediği bildirilmektedir. Bunların yanında sığır ve keçilerde, sağmal hayvanlarda görülen mastitise karşı balın kullanılmasıyla başarılı sonuçlar alınmaktadır. Son yıllarda ise travmatolojik hastalıkların tedavisinde de kullanıldığı bilinmektedir. Balda ayrıca vücudun ancak az miktarda üretebildiği Chocin maddesi vardır. Chocin karaciğerin yağ metabolizmasının ayarlar ve bu organın yağ bağlamasını önler .

Amerikan Dental Araştırmalar Birliğinin Illinois Chicago da düzenlenen ‘Oral Sağlık İçin Yararlı Yiyecekler’ konulu sempozyumda, balın diş çürüğünü önlediği ortaya konmuştur. Yeni Zelanda Waikata Üniversitesi Biyokimya Uzmanı Bal Araştırma Ünitesi başkanı Doç. Dr. Peter Molan diş çürüğünden sorumlu bakterilerden Streptococcus mitis, Streptococcus Sabrinus ve Lactobacillus casii nin ürettikleri asit miktarını balın önemli ölçüde azalttığını belirtmiştir. Bu durumun balın Dental plaktaki dekstran üretimini engellediğinden kaynaklandığı ve baldaki bir enzimin Hidrojen Peroksit ürettiği görülmüş bunun balın anti bakteriyel etkisini artıracakını, böylece diş etinin enflamatuar enfeksiyonlarının tedavisinde balın bu etkisinden faydalanılabileceği bildirilmiştir. Antienflamatuar komponentleri sayesinde şişliği ve ağrıyı azaltan özelliği ile balın yaraları iyileştirme konusunda mükemmel bir sonuç verdiği saptanmıştır (17).

2.2.6.2. Bal Zehirlenmesi

Balın zehirli olan türüne “Deli Bal” denilmektedir. Zehirlenmeler andromedotoksin denilen toksik bir madde içeren balların yenmesiyle oluşurken bu madde rhododendron (Orman Gülü) türlerinde bulunmakta ve burada bal özü toplayan arılar vasıtasıyla bala karışmaktadır.

Zehirli bitkiler de zehirli bal verir. Bunlar; Baldıran otu, yüksük otu ile beslenen arıların balları zehirli olmaktadır. Türkiye’de zehirli bala Karadeniz bölgesinde çok rastlanır. Özellikle Hopa, Kastamonu, Zonguldak, Rize, Ordu, Tokat, Sinop zehirli polen içeren balların bulunduğu illerimizdir. Zehirlenme, 50-100 gr kadar bal yenmesi ile 20 dakika sonra baş dönmesi, mide bulantısı, kusma, ishal, terleme ve halsizlik belirtileri ile kendini gösterir.

2.2.6.3. Bal Hasadı

Bal hasadı bal olgunlaştıktan sonra yapılmalıdır. Bir çerçevede petek gözlerinin tamamı veya $\frac{3}{4}$ ‘ü sırlanmış ise bunlar hasat edilmelidir. Bu dönem de nektar akımı azaldığından kovanlarda yağmacılık başlar ve hasat güçleşir. Bal hasadı sabahın erken saatlerinde yapılmalıdır. Sırlı petekler üzerindeki arılar, arı kaçırıcı ile veya fırça yardımı ile kuluçkaya indirilmekte taşıma sandıkları içinde bal süzme odasına veya arıların girmeyeceği bir çadıra getirilmektedir.

2.2.6.4. Balın Kullanım Alanları

- Fırın endüstrisinde nemi absorblaması ve kaybetmemesi özelliklerinden ötürü önemlidir. Bu sayede ekmekler ve kekler taze ve nemli kalır
- İçerdiği froktoz kızartma kalitesini artırır
- Konserve veya dondurulmuş meyve, reçel, jel ve içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır.
- Kozmetik sanayisinde ve içki sanayisinde kullanılır

2.2.7. Arı Ürünleri

2.2.7.1. Balmumu

Balmumu, işçi arıların 12-18. dönemlerinde 4,5,6,ve7. abdominal segmentlerdeki mum salgı bezlerinden salgılanan bir maddedir. Rengi salgıladığı anda beyaz olmasına rağmen, daha sonra koyulaşarak sarıya veya kahverengine döner. Arılar bu maddeyi yavru yetiştirmek, bal ve polen depolamak üzere gerekli depo gözlerini örme için salgılar. Günümüzde peteklerin balı süzöldükten sonra geriye kalan örlömlöş petek mumları eritilip yabancı maddelerden ayrılarak tekrar arıcılıkta kullanılmaktadır.

<u>Balmumunun Kimyasal Yapısı</u>	<u>Oran%</u>
• Monesterler	35
• Diesterler	14
• Triesterler	3
• Hidroksi ester ve poliester	12
• Asit ester ve poliester	3
• Uzun zincirli hidrokarbonlar	14
• Uzun zincirli yağ asitleri	12

Bal mumu arıcılık sektöründe petek yapımında, marangozculukta ağaçtan yapılmış eşyaların parlatılmasında, parke verniği yapımında ve boya endüstrisinde çeşitli amaçlarda kullanılır. Küçük heykel ve biblo endüstrisinde madeni kap ve şişe kapaklarının yapımında yine bal mumundan yararlanır. Ayrıca ışık kaynağı mum üretiminde, parfümeri endüstrisinde, kozmetikte dudak boyası yapımında kullanılır. Bunların yanında insan sağlığı açısından çeşitli merhem türü ilaçların yapımında, ayrıca yüz kremlerinin yapımında ve dişçilik alanın da bal mumunun kullanıldığı bilinmektedir.

2.2.7.2.Polen

Çiçeklerin erkek organlarının (stamen) üst kısmında bulunan anterlerin içindeki polen kesecikleri içerisinde yer alan, erkek hücre taşıyan, buruşuk dikenli, yağlı ve yapışkan yapıda olan, bal arısı tarafından toplanan kurutulmuş çiçek tozlarıdır. Polen arıları büyüyüp gelişmelerini tamamlamaları, salgı bezlerinin gelişmesi için gerekli olan başlıca protein kaynağıdır. Polen olmadığı takdirde koloninin yavru yetiştirip hayatını devam ettirmesi imkansızdır (18).

Tablo 3. Polen kimyasal oranı

Bileşen	Oran	Bileşen	Oran
Enerji	2,46kcal/g	Nikel	4,5 ppm
Protein	23,7%	Tiamin	9,4 ppm
Karbonhidrat	27 %	Niasin	157 ppm
Lipit	4,8 %	Riboflavin	18,6 ppm
Fosfor	0,53 %	Pridoksin	9 ppm
Potasyum	0,58 %	Pantotenat	28 ppm
Sodyum	0,044%	Folik asit	5,2 ppm
Kalsiyum	0,2255	Biotin	0,32 ppm
Magnezyum	0,148%	Vitamin C	350 ppm
Çinko	87ppm	Karoten	95 ppm
Bakır	14ppm	Vitamin E	14 ppm
Demir	140ppm		

Polenin bileşiminde değişik oranlarda mineral maddeler, karbon hidratlar, protein ve lipitler bulunmaktadır. Külün esas kompozisyonunu ise potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, oluşturur. İz element olarak çinko, bakır ve nikel rastlanır. Polen insan beslenmesi için çok büyük bir öneme sahiptir. Büyüme hızlandırmakta, yorgunluğu gidermekte kansızlığı önlemekte, metabolizmayı düzenleyici etkileri bulunmaktadır.

Polen besin değeri bakımından diğer tarımsal ürünlerle karşılaştırılmış ve domates, kabak, fasulye, elma, ekmek ve ete göre daha fazla protein Fe, tiamin, Riboflavin, niacin içerdiği bildirilmiştir. Zengin madde içeriğine sahip olan polenin buzağı ve broiler bazı çiftlik hayvanlarının rasyonlarına katılmasıyla canlı ağırlıklarının arttığı belirtilmiştir.

2.2.7.3. Arı Zehiri ve Kimyasal Bileşimi

Arı zehiri, arıların zehir torbasında oluşan ve içerisinde başlıca mellitin, apaminü MCD-peptidi, histamin, hyaluronidaz, fosfolipaz-A2 bulunan keskin kokulu, acı tadta, sarımtırak renkte sıvı hava ile temasında çabuk kuruyup kristalize olan bir maddedir. Arı zehiri arılarda zehir ile bir kanal ile bağlanan, asit ve alkali salgı bezlerinde üretilerek zehir torbasında depolanır. Bu salgı arı soktuğu zaman iğne içerisindeki zehir kanalından sokulan kimseye enjekte edilir. Yeni ergin hale gelmiş bir günlük arılarda bir miktar arı zehri mevcut olmasına rağmen, bu dönemde iğnenin henüz sert olmaması nedeniyle sokmazlar. İkinci günden itibaren asit salgı bezinin aktivitesi artar ve 16-19 günlük arılarda arı zehri üretimi en yüksek seviyeye ulaşır.

Bir arıdaki zehir miktarı mevsimi ve arının yapısına göre 0,05-0,3ul/arı olacak şekilde değişiklik gösterir (19).

Arı Zehirinin Kimyasal Bileşimi

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Oran</u>
• Mellitin	30-50
• Fosfolipaz	10-20
• Apamin	3
• Hyaluronidase	2
• MCDpeptidi	2
• Histamin	<1

Amerikan Apiterapı birliği günümüzde mafsalsal iltihabı, doku sertleşmesi, deri veremi, yaşlılarda görülen deri sertleşmesi, kronik yorgunluk sendromu, yara izi, deri kanseri, ekzema gibi hastalıkların tedavisinde arı zehirinin kullanıldığını bildirmiştir.

Arı zehiri temel olarak immünolojide, allerjik hastaların tedavisinde bunun yanında romatizma hastalıklarında, gut hastalığında, sklerosis’de çeşitli immünolojik hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır.

Bunların yanında arı zehiri epilepsiye bir çok arthritis çeşitlerine, bazı kanser çeşitlerine boğaz enfeksiyonlarına karşı, migrene, kolesterole karşı, sinüzite, ülser, astıma vb. tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

2.2.7.4. Arı Sütü

Arı sütü 5 ile 15 günlük işçi arıların alt çene (mandibular) ve boğaz (hypopharyngeal) bezlerinin salgılarından birisi olup ana arı gözlerine aşılana larvaların beslenmesine yarayan ancak ana arı gözlerine aşılama yapıldıktan sonra 36-48saat zarfında toplanan pelte kıvamında kemik renginde, kendine has bir kokuya ve yakıcı tada sahip gıdadır’

Arısütünün kompozisyonu, arıların doğal beslenmesine, mevsime ve larvanın yaşına üretim yönetimine göre değişmektedir. Suda eriyen pH ‘sı 3,5 olan arısütünün yapısında proteinler, lipitler, karbonhidratlar bulunmaktadır. Dinclik, zindelik ve sağladığı hücre yenilemesine katkıda bulunduğu düşüncesi nedeniyle, insanlar tarafından yaygın olarak tüketilen arı sütünün çok düşük miktarda ptrein, neopterin, biopterin, ksantopterin gibi biyolojik aktif maddeler ile hormonlar içerdiği bilinmiştir.

Arı sütü en fazla bronş astımı, damar sertliği, mide ve bağırsak hastalıkları romatizma gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bunların yanında yüksek tansiyonu önleyici, böbrek ve idrar yolu rahatsızlıklarını düzenleyici özellikleri de vardır. Arı sütü zihinsel ve bedensel yorgunlukların giderilmesine karşı ve ciltteki kırısklık ve sivilcelere karşıda etkili bir şekilde kullanılmaktadır (20).

Tablo 4. Arı Sütünün Bileşimi

Bileşen	(%)	Bileşen	(%)
Su	68,43	Amino Asitler	mg/100g
Kuru Madde	31,57	Sistin	-----
Protein	14,01	Valin	573
Asitlik	33,18	Metiyonin	403
Amino Asitler	mg/100g	İzolösin	312
Aspartik Asit	3851	Lösin	962
Treonin	807	Tirosin	828
Serin	980	Fenilalanin	905
Glutamik asit	3851	Histidin	589
Prolin	-----	Lizin	643
Glisin	421	Amonyak	139
Alanin	517	Arginin	-----

Arı sütünün kandaki kolesterol, toplam lipit, fosfolipit, trigliserid ve LDL-lipoprotein seviyesini düşürmekte, tansiyon düşürücü ve damar genişletici etkisi bulunmaktadır. İnsülin benzeri peptidler içermesi nedeniyle hipoglisemik ve immünolojik etkisi bulunmaktadır.

Bunların yanında cilt ve sac hastalıklarında tedavi edici, cinsel fonksiyonları düzenleyici etkileri bulunmakta ve hücre onarıcı ve gençleştirici etkilere sahip bulunmaktadır.

Yapılan invitro çalışmalar arı sütünün, yapısında bulunan HDA 'den dolayı anti bakteriyel özelliğinin bulunduğunu göstermiştir. Bu özellik ile arı sütü Escherichia coli, Salmonella, pruteus, Bacillus, subtilis ve staphlococcus aureus'un gelişimini engellemektedir.

Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda ise kemoterapi ve radyoterapi uygulanan, lösemili çocuklarda arı sütünün canlı ağırlık artışıyla birlikte kandaki beyaz küre, nötrofil ve lenfositlerin artmasına neden olduğu saptanmıştır.

2.2.7.5. Propolis ve Yapısı

Propolis, işçi arıların bitkilerin filiz ve tomurcuklarından topladığı reçinemsin maddeleri ve bitki salgılarının başlarında bulunan gaddeler tarafından salgılanan enzimlerle biyokimyasal değişikliğe uğratarak oluşturdukları kirlili sarıdan, koyu kahverengiye kadar değişen renkte ve oda sıcaklığında yarı katı olan bir maddedir.

Propolisin insan tüberküloz basilini kapsayan gram pozitif basilluslara karşı anti bakteriyel etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Propolisin kompozisyonu konusunda çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Propolisin sprelerinin solunum yoluyla alındığını romatizmaya ve astıma iyi geldiği gut hastalığının tedavisinde ve sinirlerin yatıştırılmasında kullanıldığı bilinmektedir. Bunların yanında propolisin beyin cerrahisinde kanamayı engellediği, yine %2'lik Propolisin genel olarak merhemlerin anti bakteriyel etkilerini artırdığı bilinmektedir (21).

Propolisin Yapısı

Kimyasal Madde	(%)
• Reçine	50
• Mumlu Bitkiler	30
• Esansiyel Yağlar	10
• Polen	5
• Organik Maddeler ve Mineral maddeler	5

Propolisin antidiyabetik aktivitesi bulunmakta ayrıca kapilleri güçlendirmekte doku yenilenmesini sağlamakta, habis tümör hücrelerinin gelişimini engellenmektedir. Propolis doku yenileyici bakterisid ve fungusid özelliği ile kozmetikte çeşitli kremlerin yapımında kullanılmaktadır .

Kronik vajinit, serviks uterin lezyonları gibi dışı genital sistemin önemli patojenlerinin tedavisinde Propolis sprej veya merhemleri lokal olarak kullanılmaktadır.

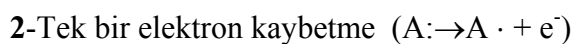
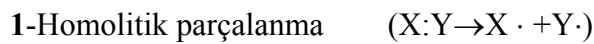
Genel olarak tıpta kardiyovasküler ve dolaşım sistemi hastalıklarında dermatolijide, doku yenilemesi, ülser, ekzema, yara ve yanıklara karşı, kanser tedavisinde immün sistem ve sindirim sistemi hastalıklarında tedavi edici olarak karaciğer rahatsızlıklarında karşı ise koruyucu olarak kullanılmaktadır.

Ayrıca propolisin anti inflamatuvar özelliğinin olduğu dermatitlere karşı anti bakteriyel krem olarak kullanıldığı ve doku yenileme özelliğini sahip olduğu bildirilmektedir.

2.3. SERBEST RADİKALLER

Atomlardaki elektronlar orbital denilen bölgelerin içinde yer alır. Her orbital birbirine zıt yönde yerleşimli en fazla iki elektron içerebilir. Serbest radikaller ise en dış orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan kısa ömürlü bileşiklerdir. Bu nedenle kararsız bir yapı özelliği gösteren serbest radikaller diğer organik ve inorganik moleküllerle reaksiyona girebilme yeteneğine sahiptirler. Elektronlar orbitallerde çiftler halinde bulunurken daha stabil olduklarından, radikaller genel olarak non-radikallere göre daha aktiftirler ancak aktivitelerinde kayda değer farklılıklar vardır. Eğer iki radikal karşılaşırsa çiftleşmemiş elektronları (\cdot ile sembolize edilir) birleşir ve paylaşılan bir çift elektronla kovalent bir bağ oluşur. Tek çiftleşmemiş elektronu bulunan hidrojen atomu radikaldir ve hidrojen atomunun iki tanesi kolaylıkla diatomik hidrojen molekülünü meydana getirir ($H\cdot + H\cdot \rightarrow H_2$)(22,23).

Radikaller radikal olmayan bileşiklerle çeşitli şekillerde reaksiyona girebilirler. Bir radikal elektronunu non-radikale devredebilir (redüktan radikal), veya bir molekülden elektronunu çift oluşturmak üzere alabilir (oksidan radikal). Bir radikal bir başka non-radikale de katılabilir. Bu üç reaksiyondan hangisi gerçekleşirse gerçekleşsin, non-radikal türler bir radikale dönüşür. Serbest radikallerle non-radikal reaksiyonlarının bir özelliği de zincir reaksiyonu oluşturma eğilimidir. Bir serbest radikal diğerini oluşturur(24,25). Kararlı bir molekül üç yolla serbest radikal halini almaktadır:



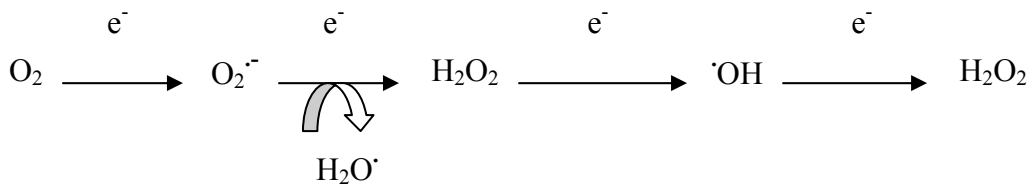
Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu^2 , Fe^3 , Mn ve Mo gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat, bu iyonlar reaksiyonları katalize ettiklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (23).

2.3.1.Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri (ROS) biyolojide genel bir terim olarak kullanılır. Sadece oksijen merkezli serbest radikalleri ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$ gibi) değil aynı zamanda radikal olmayan toksik oksijen türlerini de (H_2O_2 , HOCl , Singlet O_2 gibi) içine alır. Oksijen, canlıların hayatlarını devam ettirebilmesi için mutlak gerekli bir elementtir. Çünkü oksijenin yapısal ve fonksiyonel olmak üzere iki görevi vardır. Organizmayı oluşturan moleküllerin yapısında bulunduğu gibi besin kaynağı olan maddelerinde yapısında bulunan başlıca elementlerden birisidir. Oksijenin diğer bir görevi fonksiyoneldir ve aerobik canlılar için hayati önemi vardır. Çünkü oksijen oksidasyon tepkimeleriyle solunum sisteminde rol alır. Elektron Transport Zincirinde (ETZ) oksijen son elektron akseptörü olarak kullanılmaktadır.

Aerobik organizmalarda serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Oksijen moleküllerinin %95-99'u oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondrial stokrom oksidazları ile $4 e^-$ olarak suya dönüştürülmekte ve sonuçta ATP elde edilmektedir. Fakat bu süreçte oksijenin % 1-3 kadarı tam olarak suya dönüşemez ve hidroksil radikali ile süperoksit anyon radikali meydana gelir.

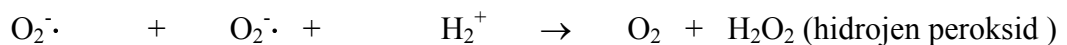
İnsan vücudunda oluşan radikallerin büyük bir kısmı oksijenden türemektedir. Zira oksijen elektronlarının ikisi eşleşmemiş şekilde dağılmıştır. Bu yüzden oksijen “diradikal” olarak değerlendirilmektedir. Oksijen bu özelliğinden dolayı diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir (26).



Şekil 3 : Oksijenin normal metabolizması sonucu oluşan radikaller.

2.3.1.1.Süperoksid Radikali

Redüktan ve orta derecede oksidandır. Süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermemesine rağmen H_2O_2 oluşumuna kaynaklık etmesi ve geçiş metal iyonlarının redüktanı olması nedeniyle zararlıdır. H_2O_2 , membran lipitlerinde lipit peroksidasyona, süperoksit dismutazın inaktivasyonuna, DNA hasarına neden olmaktadır(27,28) . $O_2^{\cdot-}$ 'nin yarı ömrü uzundur ve lipofilik özellik taşımasından dolayı uzak bölgelere difüzyonla yayılabilmektedir. $O_2^{\cdot-}$ daha sonra spontan veya enzimatik (süperoksit dismutaz, SOD) olarak dismutasyona uğrayabilir (29,30,31).



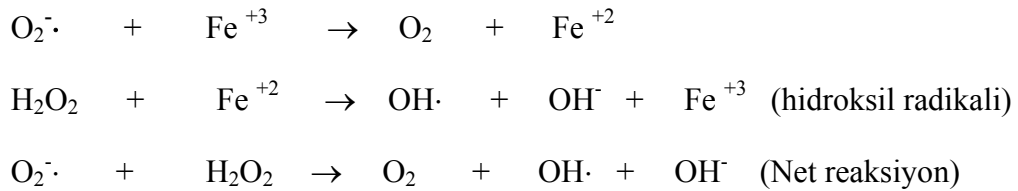
Tablo 5. Aerobik metabolizması olan canlılarda oksijen kaynaklı reaktif oksijen türleri yukarıdaki tabloda verilmiştir.

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Hidroksil (OH [·])	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Süperoksit (O ₂ ^{·-})	Singlet oksijen (1O ₂)
Nitrik oksit (NO [·])	Peroksinitrit (ONOO ⁻)
Azotdioksit (NO ₂ [·])	Ozon (O ₃)
Alkoksil (RO [·])	Hipoklorid asit (HOCl)
Peroksil (ROO [·])	Lipit peroksit (LOOH)

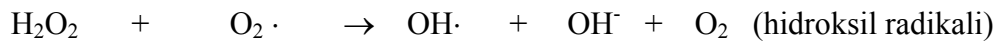
2.3.1.2. H₂O₂ (Hidrojen Peroksit)

Mitokondrial membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından kolayca difüze olarak, toksik etkisini açığa çıktığı noktadan daha uzak hücre bölümlerinde gösterebilir ve molekül yüksüz kovalent yapıya sahiptir. H₂O₂ eşleşmemiş e⁻ olmadığı için aslında bir radikal değildir ancak süperoksit radikali veya Fe gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girerek hidroksil radikalinin oluşmasına neden olarak toksik etki gösterebilir. Bu dönüşümler Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları olarak bilinmektedir.

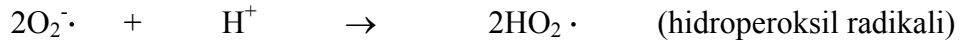
Fenton reaksiyonu:



Haber-Weiss reaksiyonu



İleri derecede reaktif bir radikal olan hidroksil radikalının biyomoleküllerle reaksiyonu, hidrojen eklenmesi veya çıkartılması ya da e⁻ transferi şeklinde olur. Hidroksil radikalının özellikle membranlar üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Membran lipitlerinin yapısına girerek membran harabiyetine neden olmaktadır. Hidroksil radikalının DNA üzerindeki etkileri mutajenik ve onkojenik olabilmektedir.



O₂'nin protonlanmasıyla da hidroperoksil (HO₂ ·) radikali oluşur. Bu radikalın herhangi bir biyolojik sistemde sitotoksik rolü kanıtlanmamasına rağmen, biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi yönünden önemlidir (31,32,33).

2.3.1.3.Hidroksil Radikali

Hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu) oluşur. Suyun yüksek enerjili iyonizasyonundan oluşan gerçek üründür.

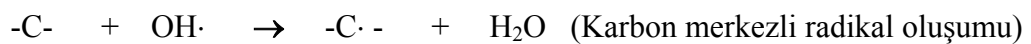


Bu radikallerden biri hidrojen (H[·]) ve diğeri ise hidroksil (OH[·]) radikalidir. Hidroksil radikalleri en reaktif radikal olarak bilinir ve OH[·] her moleküle hücum ederek hasar meydana getirir. Oldukça reaktif OH[·] 'nin biyolojik moleküllerle reaksiyonu nonradikal bir tepkimedir. OH[·] Reaksiyonları DNA'nın pürin ve pirimidin bazıları ile etkileşir, ayrıca tiyol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu çıkarabilir. Örneğin;



Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O₂ ile kombine olabilir ve oksijen sülfür radikallerini oluşturur. RSO₂⁻ ve RSO⁻ gibi bunların birçoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar (örneğin bazı proteinlerde hasar oluşturma özelliği gibi).

Hidroksil radikali, biyolojik moleküllere saldırabilen çok agresif oksidan bir ajandır. Tiyol ve karbon içeren moleküllerden hidrojen atomu kopararak su oluşturmak üzere tiyol radikalleri ve karbon merkezli radikallerin oluşumuna neden olurlar. Yarı ömrü kısa olmakla birlikte, aşırı reaktif olması nedeniyle çok yüksek doku hasarları oluşturur. Hidroksil radikalının suya indirgenmesi büyük enerji açığı oluşturur ve yarı ömürleri uzun, daha kararlı, daha az reaktif bileşimlerin oluşmasına neden olur. OH[•] in sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. OH[•], membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asitleri gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinin karbon atomunun birinden H atomunu çıkartır ve sonuçta su oluşumunu sağlar (34,35).



2.3.1.4. Singlet Oksijen

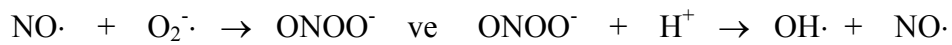
Ortaklanmamış bir elektron içermediği için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Moleküler oksijenden serbest radikal reaksiyonları ile oluşur ve serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Hipokloröz asit ve hidrojen peroksidin reaksiyonu ile de üretilebilir. Patofizyolojik önemi hala tartışmalıdır (36).

2.3.1.5. Nitrik Oksit ve Türevleri

Nitrik oksit (NO), lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir. Düşük konsantrasyonlarda iken, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilen NO, bilinen en düşük molekül ağırlıklı, biyoaktif memeli hücresi sekresyon ürünüdür (37,38,39). Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevleri gerçekleştirir. NO ve nitrojendioksit (NO₂) tek sayıda elektronlara sahiptirler, bu yüzden serbest radikaldirler. Nitrozoksit (N₂O) ise serbest radikal değildir. NO vücutta özellikle endotel hücreleri olmak üzere pek çok hücre tarafından üretilir. NO esansiyel bir amino asit olan L-argininden, moleküler oksijen ve kofaktör olarak NADPH varlığında, nitrik oksit sentaz (NOS) etkisiyle L-Sitrülin ile birlikte sentezlenir.



NO, süperoksit gibi diğer endojen serbest radikallerle reaksiyona girebilir ve reaktif bir ara ürün olan peroksinitrit (ONOO⁻) meydana gelir. Peroksinitrit güçlü bir oksidan olup, DNA ve proteinler gibi biyolojik moleküllerde hasar oluşturabilir ve uygunsuz pH'larda metal katalizörlerden bağımsız olarak az miktarda hidroksil radikali oluşturabilir.

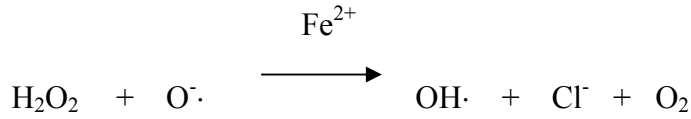


2.3.1.6. Hipokloröz Asit

Aktif nötröfillerde oluşan güçlü bir oksidandır. Fagosit stoplazmasında bulunan, hem içeren myeloperoksidaz enzimi (MPO), klor iyonu ve hidrojen peroksitten hipokloröz asit (HOCl) oluşumunu katalize eder.



Hipokloröz asit Fe^{+2} bağımlı ve bağımsız bir reaksiyon ile hidroksil radikali oluşumunu arttırabilir.



Serbest oksijen radikalleri, özellikle hidroksil radikali, tüm hücrel makromoleküller ile reaksiyona girebilir. Çeşitli patolojik durumlarda normalden daha fazla serbest oksijen radikali oluşumu, ya da organizmanın antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması sonucu artan serbest radikaller, hücrenin değişik bileşenleri ve hücre dışı yapılar ile etkileşerek; hücrede metabolik, yapısal ve fonksiyonel bir bozukluğa yol açabilir ve bu da hücre ölümüyle sonuçlanabilir (40,41).

2.3.1.7. Ozon

Atmosferde solar radyasyona karşı global bir antioksidan görevi yapmasına rağmen yeryüzü seviyesinde toksiktir ve okside olabilen bir kirleticidir. Ozon, bazı fotokopi makinelerinde ve bilimsel ekipmanlarda kullanılan şiddetli ışık kaynağı vasıtasıyla oluşur ve şehir havasını kirletir. Ozon, akciğerde lipitleri, çabuk okside olan proteinleri ve DNA'yı aşırı derecede zedeler (34,42,43).

2.3.2 . Serbest Radikal Kaynakları

Hücrelerde en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgenmiş zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar. Endoplazmik

retikulum ve nükleer membranda ise serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır (37,39,44) .

Serbest radikaller organizmada, normal metabolik reaksiyonlar sırasında veya çevresel faktörlerin organizma üzerine etkisi ile oluşabilirler. Çevresel faktörler direkt olarak veya hücre hasarı yoluyla hücrel kaynakları aktifleyerek reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırır. Oluşan radikaller, çözünen oksijen veya hücrel kimyasal maddelerle sekonder reaksiyonlara girebilirler (45,46).

2.3.2.1.Endojen Kaynaklar

Endojen kaynaklar hücrenin tüm fraksiyonlarında oluşabilme özelliğindedirler. Radikal oluşumu hücre tiplerine göre değişiklik göstermesine rağmen, tüm aerobik hücrelerde belirli düzeylerde radikal oluşmaktadır. Bunlar: mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, redoks döngüsü, araşidonik asit metabolizması, fagositoz., otooksidasyon ve oksidan enzimlerin reaksiyonlarıdır.

Mitokondriyal elektron transport sisteminde mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1–5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçığının olmasıdır. Fizyolojik olarak reaktif oksijen türlerinin temel kaynağı normal oksijen metabolizmasıdır. Dolayısıyla fizyolojik koşullar altında mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır (47).

Endoplazmik retikulumda bulunan sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak birçok substratı oksitler. Oksijen molekülünün bir atomu substrata bağlanır, diğer atomu ise su oluşturur. Bu reaksiyon monooksijenaz veya karıŐık fonksiyonlu oksidaz reaksiyonu olarak adlandırılır.

Kimyasal ajanların serbest radikal oluŐturmadaki en önemli mekanizmaları, mikrozomal sitokrom P-450 sistemi ile aktivasyonudur. Bu sistem, molekülleri indirgeyerek veya oksitleyerek serbest radikal oluşturur. Son durumda bir elektron eksikliği vardır ve elektrofilik bileŐik oluşur. Oluşan bu elektrofilik ürün bir nükleofil ile reaksiyona girer. Bu elektrofilik bileşiği çeken en önemli bileŐik sistein kalıntıları üzerindeki tiyol (-SH) grubudur. Tiyol grubu ise pek çok endojen makromolek lde (DNA, RNA, enzimler gibi) bulunduğu için reaktif ara ürünler bu moleküllerle kovalent bağlanarak toksisite g sterbilirler (48).

Redoks döngüsünde ksenobiyotiklerden serbest radikal oluşumu sadece mikrozomal reaksiyonlarla olmamaktadır. Menadion, parakuat, dikuat, nitrofurantoin, gibi bileşikler alternatif bir redoks siklusuna girerler. Bu bileşikler, ilave bir çiftlenmemiŐ elektron kazanma eğilimindedirler. Bu ajanlardan oluşan radikaller, tekrar ana bileŐiėe dönüŐmek için kolayca oksijenle oksitlenir ve süperoksit radikalini oluştururlar (49).

Oluşan ksenobiyotik ve süperoksit radikalleri intrasellüler ferritin depolarından demiri serbest hale getirirler. Sitozole salınan demir, serbest radikaller arasında en reaktif olan ve dolayısıyla daha yıkıcı olan hidroksil radikali gibi ikincil radikallerin oluştuğu Fenton reaksiyonunda katalitik rol oynar (50).

Araşidonik asit metabolizmasında hücre membranlarında prostaglandin için en önemli doymamış yağ asidi prekürsörü araşidonik asittir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonu, plazma membranlarında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin siklooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu prostaglandinleri, lipooksijenaz tarafından katalizlenen oksidasyonu ise lökotrienleri verir ve bu tepkimeler sırasında serbest radikaller oluşur (51).

Araşidonik asit oksidasyonu başlatılmış bir serbest radikal reaksiyonudur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerinin her ikisi de aktiviteleri için peroksitlere ihtiyaç duyarlar. Siklooksijenaz aktivitesi daha sonra prostaglandinlerin sentezi içinde gerekli olan endoperoksitlerin oluşumuyla sonuçlanır. Öte yandan lipooksijenaz lipid peroksitleri üzerinden lökotrienlerin oluşumunu katalize eder (51). Aynı zamanda bazı ksenobiyotiklerden bu esnada reaktif ara ürünler oluşmaktadır. Bu ara ürünler hedef yapılarla etkileşerek toksisite gösterirler.

Radyasyon, stres ve ksenobiyotikler aktive olmuş fagositlerde serbest radikal üretimini arttırmırlar. Aktive fagositler intrasellüler radikal oluşumuna neden olurlar (Tablo-6). Aktive olmuş fagositlerde üretilen serbest radikaller patojenlerle savaşta önemli rol oynar.

Tablo 6. Fagositlerin ürettiği reaktif oksidan ürünler

Trombositler	H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}
Nötrofiller	H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $HOCl$
Eozinofiller	H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $HOCl$,
Makrofajlar	H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , $HOCl$, NO^{\cdot}

Kan monositleri, doku makrofajları (kupfer hücreleri, alveolar makrofajlar) gibi fagositik hücreler ve nötrofiller, eozinofiller, bazofiller gibi granüositler immunojenik veya özel bir uyararla uyarıldıktan sonra lizozomlarını dışarı vermeye başlarlar. Reaktif oksijen oluşumunun yanısıra, mitokondri dışındaki oksijen üretiminde bir patlama olur. Fagositik edilmiş patojenler oksidan ajanlar tarafından öldürülür. Solunum yolu ile patlamanın amacı oksidan ajanlar sağlamaktır. Oluşan oksidan ajanlar patojenleri öldürmenin yanısıra myeloperoksidaz sistemine de etki eder. Hidrojen peroksit ve hipoklorit kombinasyonu myeloperoksidaz sistemine etkiyerek de güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterir. Bu radikaller memeli bakteri ve parazitlerine karşı sitotoksik etkiye sahip oksidan ajanlardır. Membran peroksidasyonu, membran proteinlerinin dekarboksilasyonu ve/veya oksidasyonuna yol açıp membran bütünlüğünü bozabilir ve DNA'yı okside ederek parçalayabilir. Fagositik kaynaklı oksidan ajanlar; ototoksik, immunosupresif ve mutojenik etki oluşturabilirler (51).

Doku bileşenlerinin çoğu moleküler oksijenin varlığında kimyasal olarak stabil değildirler ve metabolik şartlar altında az yada çok otookside olurlar. Kolayca otookside olabilen bu bileşenler doku ve hücrelerin son derece önemli komponentleridirler (46, 47, 48). Bunlar arasında, Hemogloblin gibi metalloproteinler, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitleri sayılabilir.

Bütün otooksidasyonlar sırasında serbest radikal intermediyerleri kadar aktive oksijen türleri de üretilir. Böylece otooksidasyonlar vücudun radikal kaynaklarına katkıda bulunurlar.

Aerobik organizmalarda oksijenin katıldığı birçok reaksiyonda oksijenin tek değerlikli indirgenmesiyle süperoksit anyonu meydana gelebilir. Glikojen oksidaz, ksantin oksidaz,

NADPH oksidaz, NADH oksidaz, diamin oksidaz, ürat oksidaz gibi enzimler bunlardan bazılarıdır.

Üzerinde en çok çalışılan enzim ksantin oksidaz (XOD) aslında ksantin dehidrogenaz (XDH) olarak sentezlenmekte ve bu şekilde dokularda yaygın olarak bulunmaktadır. Bu enzim elektronlarını moleküler oksijene değil NAD'ye verir ve süperoksit anyon radikali oluşturmaz. Fakat XOD sülfidril oksidasyonu ya da sınırlı proteolizis ile dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşebilir. XOD moleküler oksijeni kullanarak H_2O_2 ve O_2 oluşturmaktadır (52).

2.3.2.2.Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları

Diyet, çevresel etkenler ve bazı ilaçlar organizmada serbest radikal oluşturmada etkilidirler.

•Diyetsel

-Çok doymamış yağ asitlerince zengin beslenme

-Alkol

-Fazla kalorili beslenme (obezite)

-Hayvansal proteinlerce zengin beslenme

-Aşırı demir ve bakır alınması

-Az sebze ve meyve yenmesi

-Yiyeceklerin uygun olmayan koşullarda saklanması ve hazırlanması

-Yiyeceklerin pişirme yöntemlerindeki hatalar

- Çevresel

- Sigara dumanı

- Hava kirliliği (O₃, NO₂, SO₂, hidrokarbonlar)

- Diğer kirleticiler (Asbest, pestisitler)

- Radyasyon

- İlaçlar

- Antikanser ilaçlar

- Glutasyon tüketen ilaçlar (Asetaminofen, kokain)

•Metaller; Metal iyonları, süperoksit anyonları ve H₂O₂ ile biyolojik sistemlerde hidroksil serbest radikali ve metal-oksijen kompleksleri gibi çok reaktif türleri üretmek için reaksiyona girerler ve sonuçta oksidatif DNA hasarı oluşur. Kimyasal karsinogeneziste, metallerin aracılık ettiği oksidatif DNA hasarı önemli rol oynar (53,54).

Serbest radikallerin hücre çekirdeği ve DNA'daki etkileri genotoksik ve mutajenik değişikliklere yol açar. OH· radikali oluşumu pürin ve pirimidinlerin modifikasyonuna veya DNA ipliklerinin kırılmasına neden olur. Serbest radikaller DNA polimerazı inhibe ederler.

2.3.3. Serbest Radikallerin Hücre Düzeyinde Etkileri

Çeşitli patolojik durumlarda normalden fazla miktarda serbest oksijen radikali oluşmasıyla veya organizmanın antioksidan sisteminin yetersiz kalmasıyla artan serbest radikaller; hücrenin çeşitli bileşenleri ve hücre dışı makromoleküller ile etkileşerek, hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluğa neden olurlar. Oksijen radikallerinden etkilenebilecek

başlıca vücut kimyasal maddeleri arasında; proteinler, nörotransmitterler, nükleik asitler, DNA ve hücre membranlarının başlıca bileşenleri olan yağ asitleri bulunmaktadır(55) .

2.3.3.1.Serbest Radikallerin Enzimlere Etkisi

Hücre membranı gibi, mitokondriyal ve mikrozomal membranlarında fosfolipitlerinde doymamış yağ asitlerinin fazla miktarda bulunması nedeniyle lipit peroksidasyonuna karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Lipit peroksidasyon hasarı, membran yapı ve fonksiyonunda bozukluklarla sonuçlanabilen bir olaydır. Lizozomal membranların tahribi, hidrolitik enzimlerin salınması ve intrasellüler sindirimle sonuçlanır. Lipit peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür Enzimler de serbest radikal kaynaklı fonksiyon kaybına uğrayabilirler. Örneğin; Ca^{++} -ATPaz ve Na^{+} - K^{+} ATPaz enzimlerinin tiyol gruplarının oksidasyonu aktive kaybına sebep olur ve buna bağlı olarak hücre içi ve dışı iyon dağılımı bozulur. Serbest radikaller glutamin sentetaz, pruvat kinaz, kreatin kinaz, LDH gibi enzimlerde de aktive kaybına yol açarak metabolik fonksiyonel bozukluklara neden olurlar (23,29).

2.3.3.2.Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Stabil bir molekül olan DNA da lipitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 10^3 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmüştür(56). DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun (8OHdG) olduğu

gösterilmiştir(57) . ROS oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır. Oksidatif hasara bağlı olarak DNA’da, tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olabilir(58,59). Bu lezyonlardan bazıları fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir. Örneğin pürin kaybı ile apürinik alanların oluşması insan genomunda gün içinde 104 kez meydana gelebilmektedir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikoru oluşmaktadır. İyonize radyasyon, yüksek oksijen konsantrasyonu, otooksidasyona uğrayan kimyasallar (dihidroksifumarat, dopamin, L-DOPA, noradrenalin, adrenalin), ksantin oksidaz ve substratları ve TNF- α dir (56). DNA’da oksidatif hasarın oluşumu iki hipotez ile açıklanmıştır. “Fenton Kimyası” hipotezinde OH radikalleri DNA’ya saldırarak hasar oluşturur. O_2^- gibi H_2O_2 ’de doğrudan DNA’da hasar yapmaz. OH radikalinin DNA üzerine etkili olabilmesi için DNA’da veya çok yakınında oluşması gerekmektedir. Reaktivitesi çok yüksek olan OH• radikalinin hücre içinde diffüze olarak nükleusa geçme olasılıkları azdır. Olası mekanizma membranı kolayca geçebilen H_2O_2 ’in nükleusta Fe-Cu iyonları ile reaksiyonlaşarak (Haber- Weiss ve Fenton reaksiyonları) hidroksil radikallerini oluşturmasıdır.

DNA çok sayıda negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, çeşitli katyonları bağlama yeteneğine sahip büyük bir anyondur. $Fe^{2+/3+}$ ve $Cu^{1+/2+}$ iyonları negatif yüklü DNA’ya sürekli bağlı bulunabildikleri gibi oksidatif stres altında hücre içinde bulunan demirli ve bakırlı proteinlerden serbestleşerek de DNA’ya bağlanabilmektedirler. Redoks aktif transisyon metal iyonlarının bağlanmaları DNA molekülünü H_2O_2 ’in hedefi haline getirmektedir. DNA’ya bağlı metal iyonları ile H_2O_2 ’in DNA üzerinde reaksiyonlaşmasından oluşan OH radikalleri,

OH radikal temizleyicileri tarafından uzaklaştırılmamaktadır. Ayrıca, OH radikal temizleyicilerinin oluşturduğu radikaller de DNA'ya hasar verebilmektedir (60). Doku kültür ortamının Fe^{3+} ve Cu^{2+} iyon konsantrasyonunun arttırılması ile oksidatif DNA baz hasarının arttığı ve H_2O_2 'e maruz bırakılan hücrelerde bakır ve/veya demir şelatörlerinin (deferoksamin) kullanımının DNA'daki oksidatif hasarı önlediği gösterilmiştir (56). DNA molekülüne bağlanarak transkripsiyon ve translasyonu etkileyen ribozomal proteinlerde çinko yapılarının bulunduğu ve bu yapılarda çinko yerine demirin bağlanması ile radikal oluşumunun arttığı saptanmıştır. DNA'nın oksidatif hasardan korunması için demir şelatörleri ve radikal temizleyicilerinin birlikte kullanılmalarının önemli fayda sağladığı öne sürülmüştür (56). OH radikali dört DNA bazına da saldırı yapabilirken singlet oksijen (O_2) çok daha seçicidir (58). O_2 dal kırığından daha çok, guanin türevli ürünler olan 8-hidroksiguanin ve FAPyGuanin (FAPyG) oluşturmaktadır (62). Hücrede DNA ile birlikte bulunan Cu^{2+} iyonlarının bazı fenollerle reaksiyonlaşması ile ROS oluşmakta ve sonuçta baz modifikasyonları, dal kırıkları ve DNA baz-fenol katılma ürünleri gibi çeşitli DNA lezyonları meydana gelmektedir. Invitro Cu^{2+} iyonları varlığında DNA hasarına neden olan fenol bileşikleri 2- hidroksiöstradiol, 2-metoksiöstradiol, dietilstilbestrol ve L-DOPA'dır. Bazı fenolik bileşiklerin bu lezyonların oluşumunda rol oynadıkları için karsinojenik oldukları öne sürülmektedir. Nükleaz aktivasyonu hipotezine göre oksidatif stres, sitozolik Ca^{2+} iyon konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olarak nükleustaki Ca^{2+} -bağımlı endonükleazları aktive etmekte ve DNA'nın fragmentasyonuna neden olmaktadır. Nükleaz aktivasyonu DNA bazlarında kimyasal değişikliklere neden olmamaktadır. Ca^{2+} şelatörlerinin kullanımı ile DNA hasarının engellenebildiğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır. Invivo her iki hipotezin de birlikte geçerli olduğu kabul edilmektedir. Hücre tipine ve oksidatif stres etkenine bağlı olarak mekanizmalardan biri öne çıkmaktadır. Transisyon metal iyonlarının varlığı reaksiyon hızını, mekanizmasını ve baz modifikasyonunun türünü etkilemektedir(61,63).

2.3.3.3.Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Serbest radikallere karşı en fazla hassasiyet gösteren biyomolekül grubu lipitlerdir. Oksijen radikalleri poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek lipit peroksidasyonuna yol açarlar. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilirler. Lipit peroksidasyonu, serbest radikallerin poliansature yağ asitlerinin metilenik karbonlarından hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipit peroksidasyonun en önemli ürünü malondialdehid (MDA) dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarından iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar ve iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bundan dolayı mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir (64).

2.3.3.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik proseslerde önemli rol oynarlar. Enflamatuvar eklem hastalıklarında synovial sıvıya geçen PML'lerden extrasellüler sıvıya salınan H_2O_2 ve O_2 buradaki mukopolisakkarit olan hyalüronik asidi parçalarlar. Gözün vitröz sıvısında bol miktarda hyalüronik asit bulunur. Bununda oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur (26,65).

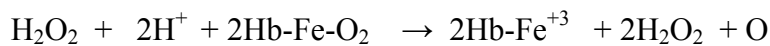
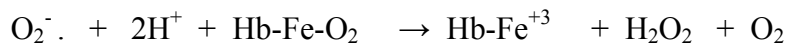
2.3.3.5.Nükleik Asit'lere Etkileri

Oksijen radikalleri oksidatif yarıma ile DNA hasarına yol açabilir, pirimidinler (timin) özellikle hassastır. DNA halatlarının kopması, DNA çift sarmalı ayrılması sonucu hücrede mutasyonlar ve ölüm gelişebilir. DNA molekülleri nükleusta bulunur ve sıkı heliks yapısında düzenlenmiştir, ayrıca histonlarla da korunur. Bundan dolayı serbest radikallerle teması bağlı değişiklikler azdır (30,67) .

2.3.3.6. Serbest radikallerin proteinlere etkileri

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında bir çok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir. Pek çok sayıda mekanizmanın protein hasarına neden olduğu bilinmektedir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca mekanizmalar; PCO oluşumu ile karakterize edilen metal-iyon katalizli protein oksidasyonu, protein-tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, 3-nitrotirozin (3-NT), ditirozin(diTyr) oluşumu olarak sıralanabilir. Potansiyel olarak bütün amino açıl yan zincirleri oksidatif modifikasyona uğrayabilme özelliğine sahiptir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücresel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artmasına yol açar. Proteinlerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılığı, amino asit bileşimine, proteinin aktivasyonundan veya yapısının düzenlenmesinden sorumlu amino asitlerin yerleşimine, hasarlı proteinin onarılabiliğine bağlıdır. Aromatik aminoasitlerde (fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar olduğundan oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı çok fazladır.

Sülfürlü amino asitler olan sistein ve sistin de serbest radikal atağına hassas amino asitlerdir. Proteinin temel yapısındaki değışme, antijenitesindeki değışmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler. Serbest radikaller etkisiyle IgG ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O_2^- veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (68,69,70) .



2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA

Oksijenli yaşamla birlikte aerobik organizmalar oksijen kaynaklı radikalleri oluşturmaya başlamışlardır. Bununla eş zamanlı olarak, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere, organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas dengenin korunamadığı durumlarda, hücre hasarına kadar giden birçok patolojik durum ortaya çıkmaktadır (71).

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri, zar yapısında bulunan lipitlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipit peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise, antioksidanların tanımı lipitlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece antioksidanlar, hedef molekülleri oksidan hasarı engelleyen ve geciktiren maddeler olarak tanımlamakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir. Memeli hücresinde oksidan ürünlere karşı korunma üç prensip içinde gerçekleşmektedir:

1. Oluşan radikallerin detoksifikasyonu
2. Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi
3. Radikal oluşumunun sınırlandırılması

Oluşan radikallere karşı savunma sistemleri, enzimler ve düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucuları olmak üzere iki grupta toplanırlar. Savunmada öncelikle etkili olan

enzim sistemleridir. Antioksidan savunmanın önemli bir kısmını süperoksit ve H_2O_2 'i temizleyen özel enzimler oluşturur. Bunlar süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimleridir. Bu enzimlerin aktivitesi, serbest radikallerin sentez ve yıkılma hızına, beslenme ile eser elementlerin (Mn, Se, Fe, Zn, Cu) alınmasına bağlıdır (72).

Enzimsel savunma dışında düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucularını, lipitte eriyebilir özellikte olanlar ve stoplazmada bulunanlar olmak üzere iki grupta toplayabiliriz. E vitamini ve β -karoten lipitte eriyebilir özellikte antioksidan özellikli vitaminlerdir. GSH, ürik asit, bilirubin ve askorbik asit stoplazmik yerleşim gösteren antioksidan etkili maddelerdir.

Plazmada yaklaşık 300 μ M konsantrasyonda bulunan ürik asit, hemoglobini peroksit oksidasyonundan ve eritrositleri lipid peroksidasyonundan korur. Bu özellikleri ile urat serbest radikal temizleyicisi olarak kabul edilebilir. Antioksidanlar çeşitli kriterlere göre gruplanabilirler:

- 1.Yapılarına göre; Enzimler ve enzim olmayan proteinler, küçük moleküller
- 2.Kaynaklarına göre: Organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar) ve dışarıdan alınanlar (ekzojen antioksidanlar)
- 3.Çözünürlüklerine göre: Suda çözünenler ve lipitlerde çözünenler
- 4.Yerleşimine göre: Hücre içinde bulunanlar ve plazma ve diğer ekstrasellüler sıvılarda bulunanlar.

Bu bahsedilen antioksidanlar dışında, çok sayıda endojen molekülün antioksidan etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Bu moleküller arasında sistein, histidin gibi amino asitler ile safra

asitleri, bilirubin gibi bileşikler ve sitokinler gibi yapıları ve işlevleri çok farklı moleküller vardır (73).

2.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.4.1.1. Superoksit Dismutaz (EC U5.1.1. EC-SOD)

SOD'lar bir grup metalloenzimdir. Süperoksit radikalinin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizleyerek, süperoksit radikalinin zararlı etkilerine karşı hücreleri korurlar. Aynı zamanda lipit peroksidasyonunu da inhibe ederler.

SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD'nin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (74).

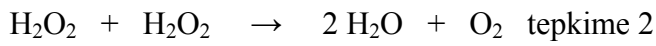
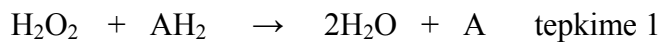


2.4.1.2. Glutatyon Peroksidaz (EC 1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Oluşan H_2O_2 , GSH-Px veya katalaz aracılığı ile suya indirgenir. Glutatyon peroksidaz fagositik hücrelerde önemli fonsiyonlara sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. Bu enzim fagositik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir (74).

2.4.1.3.Katalaz (EC 1.11.1.6)

Katalaz yapısında protoporfirin IX Fe (Hem) grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir (74). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır(74). H₂O₂ oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle (tepkime 1) veya H₂O₂ oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkime (tepkime 2) yaparak hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır.



2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.4.2.1. β-Karoten (Vitamin A Ön Maddesi)

β-Karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyona girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikalleri oluşumunu önler. Karotenoidler özel kimyasal yapılarından dolayı singlet oksijeni tutabilirler. Karotenoidlerin singlet oksijen yok etme kabiliyeti, içerdikleri konjuge çift bağ sayısına bağlıdır. Etkili bir yok etme için dokuz ya da daha fazla çift bağa sahip olmak zorunludur. β-karoten on bir konjuge çift bağa sahiptir. Bu da onun singlet oksijen yok edici etkisini arttırmaktadır.

2.4.2.2. C Vitamini

C vitamini (askorbik asit), kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilir vitaminlerden olan askorbik asit, özellikle yeşil renkli sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce bağırsaklardan kolayca emilir. Isıtılmaya dayanıksız, dondurmaya ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0.5-1.5 mg/dl kadardır. C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollagen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici bir rol oynar. Midede ferri demiri ferro demire indirgeyerek emiliminde görev alır. İmmunite ve yara iyileşmesinde etkilidir. Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asit semidehidroaskorbat radikal ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. C vitamininin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında okside etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek sellüler ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir pro-oksidan olarak değerlendirilir.

2.4.2.3. Vitamin E (α -Tokoferol)

Vitamin E nin biyolojik olarak en aktif formu α -Tokoferoldür. α -Tokoferol lipoproteinler ve biyolojik membranlar içinde bulunan yağda çözünen bir bileşiktir. Vitamin

E yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipitlerindeki yağ asitlerini korumaktır.

2.4.2.4. Glutasyon (GSH)

Glutasyon (GSH), başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeyde bulunan ve glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir iri peptittir. Glutasyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur.

2.4.2.5. Melatonin

Melatonin -OH radikalini ortadan kaldıran en güçlü antioksidandır. Melatonin, OH[·] radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür ki bunun da ortamdaki O₂^{·-} radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir. Serbest oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle kansere sebep olan safrol'un DNA üzerindeki hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir.

Melatonin'in, antioksidan olarak diğer önemli bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyeri gibi bariyerleri de kolayca geçer. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir.

3. MATERYAL METOT

3.1.GEREÇLER

3.1.1.Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmamızda Harran Üniversitesi Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında kullanılan cihazlardan yararlanılmıştır.

1. Santrifüj (Hettich Universal 30 RF)
2. Spektroflorofotometre (Shimadzu RF-1501 MODEL, Japon)
3. Derin dondurucu (New Brunswick Scientifi, C54285 model)
4. Hassas terazi (Sartorius marka 0,0001 g'a duyarlı)
5. Su banyosu (Nüve, BM 402 model, Türkiye)
6. Dijital pH-metre (Hanna, pH 211 model Japon)
7. Otomatik biyokimya analizörü (Abbott Aeroset, USA)

3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. 2,4,6-tripiryridyl-s- trazine (TPTZ)
2. Trolox
3. Gallik acid
- 4.+ (-) Catechin hydrate
5. Folin - Ciocalteau reagent
6. TRIS
7. 2,2-azinobi-bis(3-ethylbenz- thiazline-6 sulfonic acid)(ABTS)
8. Diammonium salt
9. t-butyl hydoperoxide

10. Sodium carbonate

11. FeCl₃

12. Grade I deyonize su

Bu Kimyasallar Sigma, Aldrich ve Merck Firmalarından temin edildi

3.2.YÖNTEM

3.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Bal hasadından hemen sonra yurdumuzun çeşitli yörelerinden cam kavanozlarda bal örnekleri toplanmıştır. Attar ve marketlerden temin ettiğimiz balları, örnekler çalışılincaya kadar -4°C de muhafaza edilmiştir. Çalışma öncesinde numuneler soğuktan çıkartılıp oda ısısına gelmesi beklenildi ve sonrasında 1/3 oranında deiyonize suyla sulandırıldı. İyi bir karışım sağlayabilmek için vorteks kullanıldı. Son olarak 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek çalışmaya hazır hale getirildi.

3.2.2.1. Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Prensip:

Erel tarafından (75) geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı numunenin total antioksidan kapasitesini ölçen bir metottur. Fe²⁺-o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidyl radikallerini oluştururlar. Dianisidyl radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu

durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir (75).

Reaktifler:

Reaktif-1: 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 mikromolar $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözülerek hazırlandı.

Reaktif-2: 7,5 mM hidrojen peroksit 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlanır.

3.2.2.2. Total Oksidant Seviye (TOS)

Prensip:

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir ve tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir (76).

Reaktifler:

Reaktif-1: 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM H_2SO_4 çözülerek ana solüsyon hazırlanır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250 μM Xlenol orange çözülerek hazırlanır.

Reaktif-2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlanır.

3.2.2.3. Protein Ölçümü

Prensip: Protein miktarı Bradford Yöntemiyle ölçüldü (78). Coomassie Brilliant Blue proteinlerle mavi renkli bir kompleks oluşturur. 595 nm de absorbans alınır, sığır albümin çözeltisi Standard olarak kullanılır.

3.2.2.4. Amilaz Aktivite Ölçümü

Amilaz aktivitesi Abbott marka ticari Amilaz kitleri kullanılarak ölçüldü.

3.2.2.5. Fenol Bileşikleri Ölçümü

Toplam fenol miktarı Folin – Ciocalteu ayracı ile ölçüldü (77). Standard olarak gallik asit kullanıldı.

3.3. Yapılan İstatistiksel Analizler:

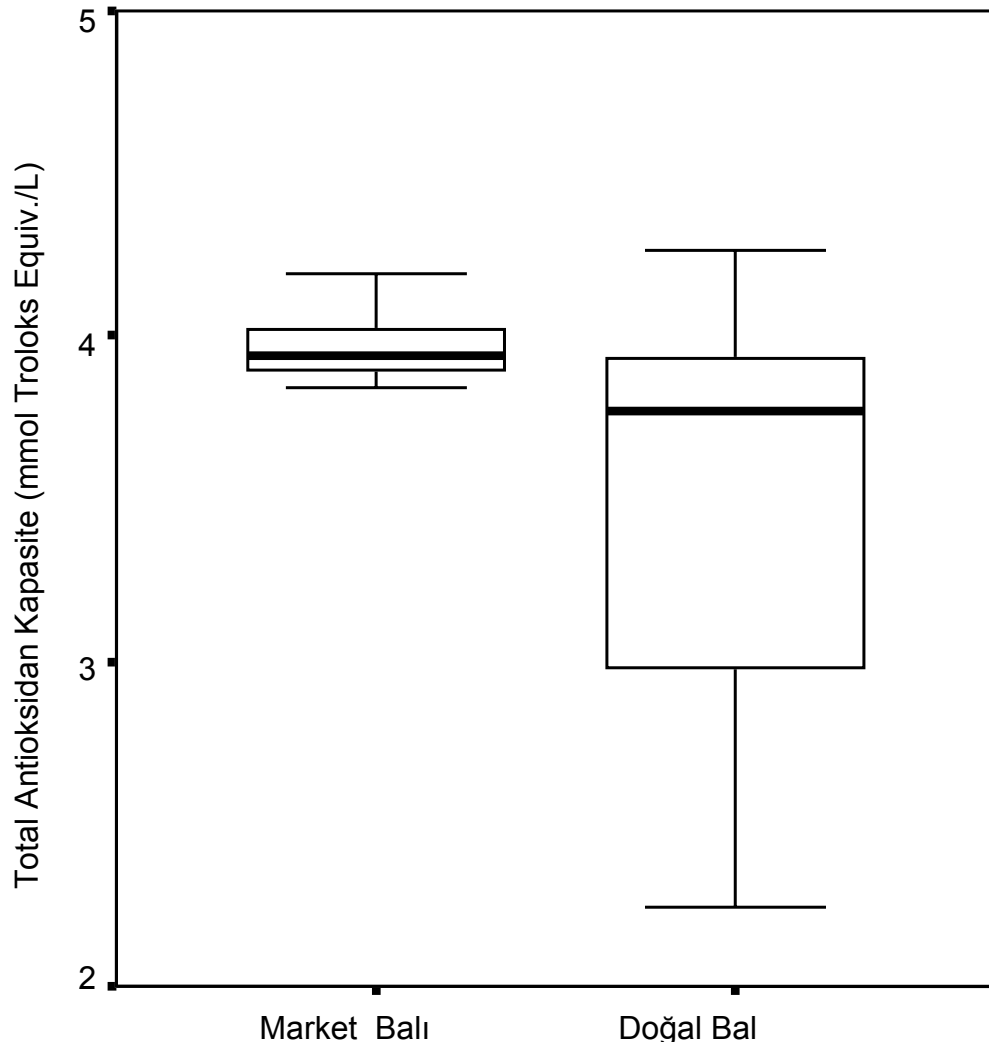
Ticari bir program olan SPSS 11.0 kullanıldı. Önemlilik derecesi $p < 0.05$ olması anlamlı olarak kabul edildi. Grupların arasındaki farkı değerlendirmek için student's t-testi kullanıldı. Parametrelerin arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için ise korelasyon analizi yapıldı.

4. BULGULAR

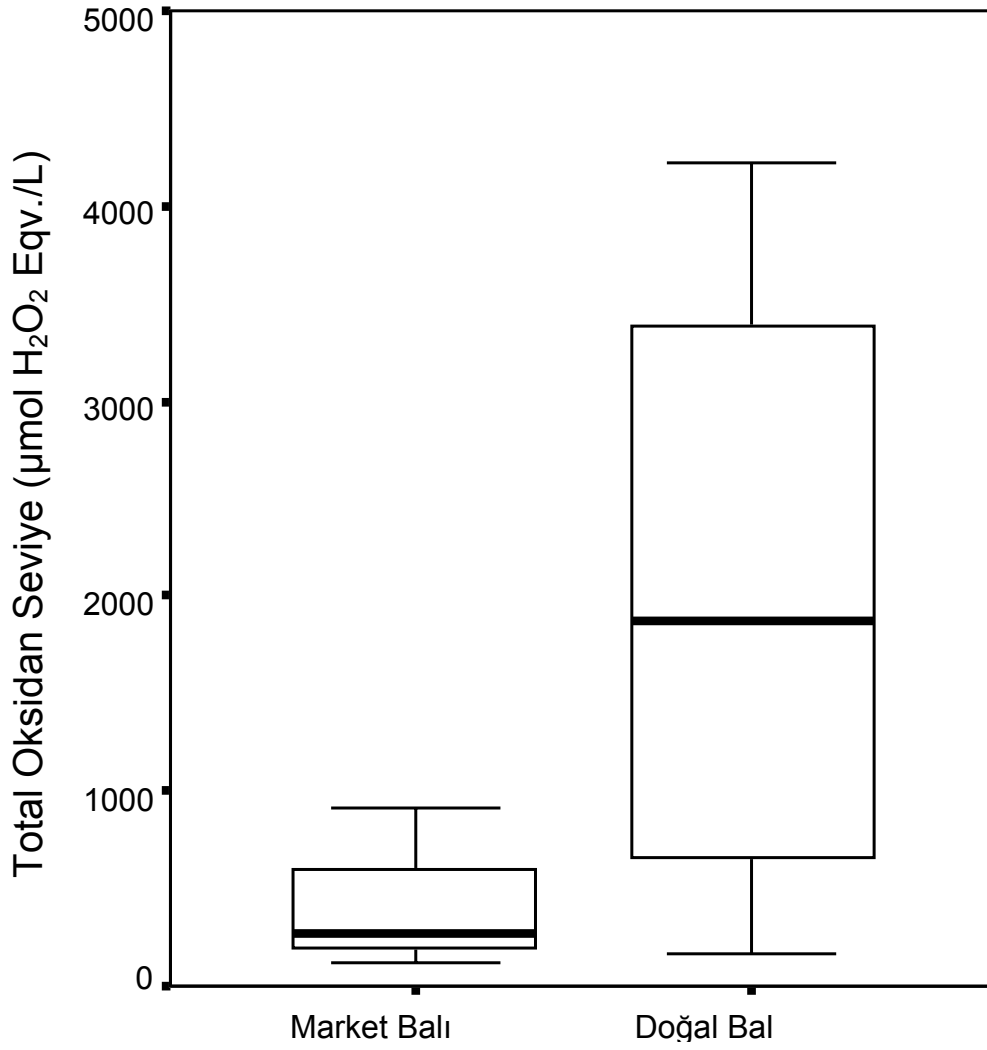
Çeşitli yörelerimizden toplamış olduğumuz 45 adet doğal olduğu bilinen bal, 20 adet marketlerden hazır olarak satılan bal örneklerinden, TAK, TOS, amilaz, fenol, protein düzeyleri saptanmıştır. Aşağıdaki Tabloda her iki gruba ait bal örneklerinin ortalamaları, standart sapmaları ve karşılaştırılmaları verilmektedir.

TABLO 7. Doğal ballar ile işlenmiş market ballarının parametre değerleri

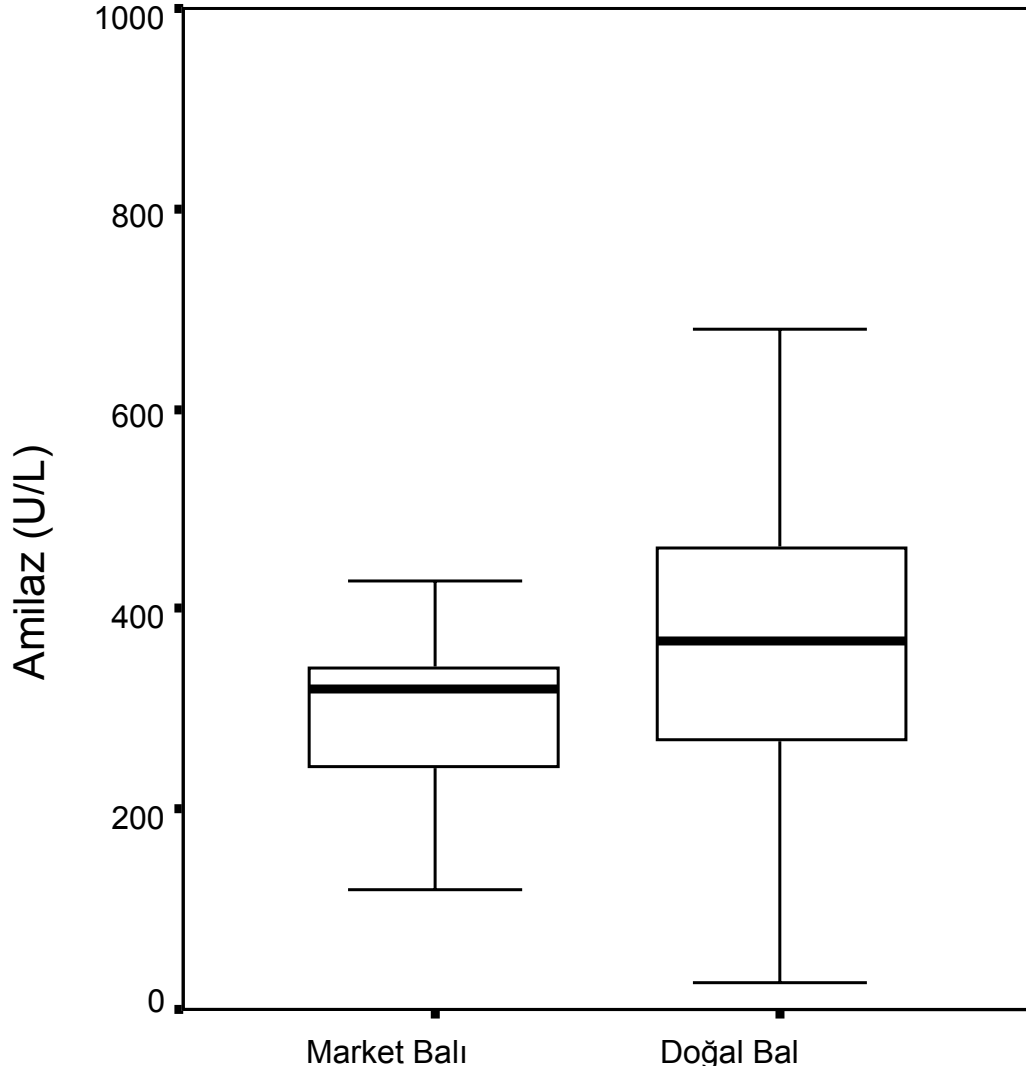
	DOĞAL BALLAR	MARKET BALLARI	P
TAK mmol Trolox Eqv/L	3,43±0,71	3,86±0,34	P=0,012
TOS µmolH ₂ O ₂ Eqv/L	1927±1331	659±886	P<0,01
AMİLAZ U/L	384±190	288±100	P=0,036
FENOL mmol Gallik Asit Eqv/L	9,6±0,29	9,7±0,24	P>0,05
Protein mg/L	560±14	480±61	P=0,015



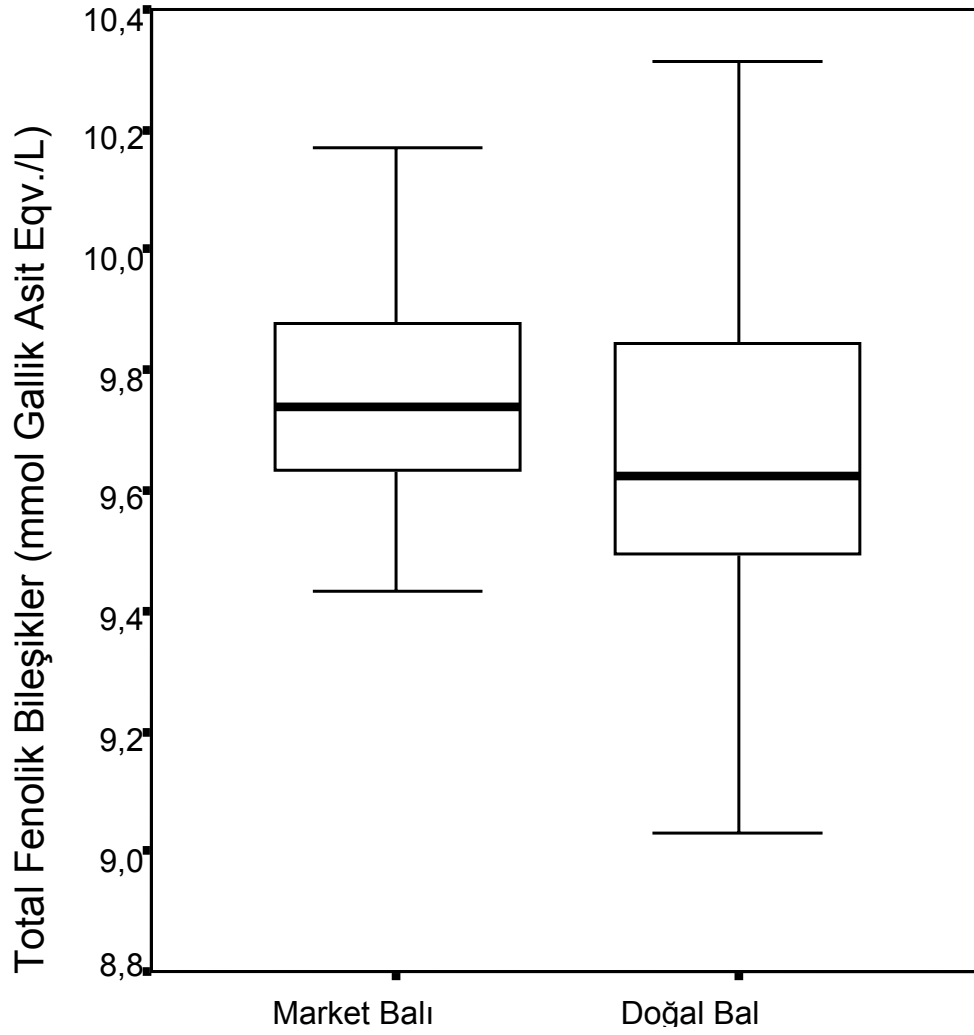
Şekil 4 : Doğal ballar ile Market ballarının Total Antioksidan Kapasiteleri



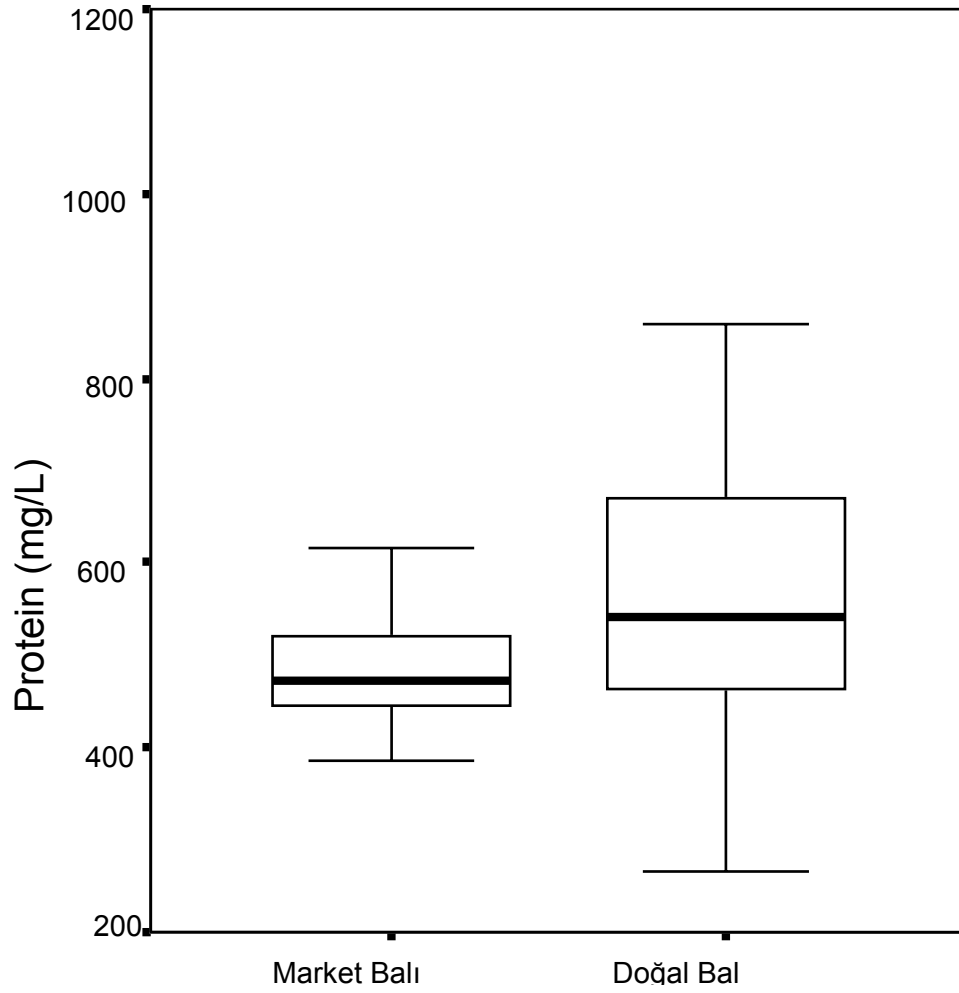
Şekil 5. Doğal ballar ile Market ballarının Total Oksidan Seviye



Şekil 6. Doğal ballar ile Market ballarının Amilaz Aktiviteleri



Şekil 7. Doğal Ballar ile Market Ballarının Total fenolik bileşikler içerikleri



Şekil 8.. Doğal Ballar ile Market Ballarının protein düzeyleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bal, arılar tarafından çiçek özünden (nektarından) yada bitki öz suyundan üretilen değerli, tatlı bir maddedir. Bal, karbonhidratların zengin bir kaynağı olmakla çok önemli bir yüksek enerjili yiyecektir. Yapılan bu çalışmamızda Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden doğal olduğu bilinerek temin edilen ve ayrıca marketlerden ambalajlı olarak satın alınan balların toplam antioksidan kapasiteleri, toplam oksidan seviyeleri, fenol ve protein düzeyleri ile amilaz aktiviteleri saptandı ve her iki grubun değerleri karşılaştırıldı.

Market balı grubunun TAK düzeyi doğal bala göre yüksek, TOS, protein ve amilaz düzeyleri düşük bulundu. Bu durum market ballarının işlenmesi sırasında balın bir takım fizikokimyasal işlemlerden geçmesi ile ilgili olabilir.

Beretta ve arkadaşları (79) yaptıkları bir çalışmada floranın balın antioksidan kapasitesi üzerinde önemli etkisi olduğunu saptamışlardır. Literatürde balın in-vivo antioksidan etkisi araştırılmış olup, bal yenilmesinin ardından serum antioksidan kapasitesinin istatistiksel açıdan önemli derecede arttığı saptanmıştır (80). Balın antioksidan kapasitesinin fenolik içeriklerle ilgisinin olduğu gösterilmiş bulunmaktadır (81).

Balda antibiyotik özelliği güçlü bir molekül olan hidrojen peroksit glikozdan glikoz oksidaz enzimi aracılığı ile üretilir. Bunun yüksek miktarda olması balın hem tadını hem de gıda kalitesini bozar ve insanlar için de toksiktir. Çok düşük düzeyde olması da bakteri, parazit ve mantarların üremelerine fırsat verir. Bal gıda açısından çok zengin bir besin olmasına rağmen içinde herhangi bir mikrobiyolojik organizmanın ürememesinin en önemli faktörü sürekli dar bir aralıkta sağladığı hidrojen peroksit molekülüdür. Genel anlamda hidrojen peroksit halk arasında oksijenli su olarak ta bilinir ve tıpta mikrop öldürücü olarak yaraların temizlenmesinde kullanılır. Balda az miktarda bulunan bu molekül gıdayı mikropların istilasına karşı korur. Bu molekül yine balda bulunan glikoz oksidaz aracılığı ile

glikozdan sentezlenir. Bilindiği gibi glikoz balın en büyük bileşenlerinden birisidir. Glikozdan hidrojen peroksit açığa çıkarılmasıyla geride glikonik asit kalır ve bu zayıf asitte balın pH sının belli bir seviyenin altında tutulmasını sağlayarak mikrobiyolojik ajanların üremesine mani olur. Çalışmamızda kullandığımız TOS testi hem hidrojen peroksidi hem de diğer peroksitleri toplam olarak ölçme kabiliyetindedir.

Üretilen aşırı miktardaki hidrojen peroksit molekülü bu substrata özgün, çok hızlı bir enzim olan katalaz tarafından ortamdan uzaklaştırılır. Katalazın hidrojen perokside ilgisi düşük miktarlarda az, aşırı miktarlarda yüksektir. Bu durum baldaki hidrojen peroksidin düzeyinin belli bir aralıkta tutulmasına yardımcı olur (82).

Bizim araştırmamızda doğal olduğunu bildiğimiz bal grubunun TOS düzeyi marketlerden satın alınan bal grubun değerlerine oranla daha yüksek bulunmuştur. Başka bir ifadeyle, market ballarının TOS düzeyi daha düşüktür. Bu durum, tam da beklenen bir durumdur. Çünkü, TOS testinin ölçtüğü hidrojen peroksit protein yapısında bir enzim olan glikoz oksidaz aracılığı ile açığa çıkarılmaktadır. Bu ballarda ısı işlemlerden geçtiği için bu enzimin yapısı geri dönüşümsüz olarak denatüre olmuş olabilir. Böyle bir durumda baldaki peroksit düzeyi düşük çıkacaktır.

Toplam fenol içerikleri market ballarında doğal bal grubuna göre daha düşüktü. Saptadığımız balların toplam fenol düzeyleri literatürdeki değerlerle uyumlu idi (83). Balın fenolik içeriği florayla ilgilidir. Doğal bal grubunun fenol içeriğinin market ballarına göre yüksek çıkması market ballarının çeşitli monofloral balların karışımıyla da ilgili olabilir düşüncesindeyiz.

Doğal balda amilaz enzimi önemli düzeyde mevcuttur (84). Amilaz enzimi sıcaklığa dayanıklı bir enzim değildir. Isıl işlem sırasında market balının içeriğindeki protein yapısındaki amilaz enzimi sıcaklıkla denatüre olur ve tekrar renatüre olamaz. Bu durumda da

amilaz enziminin aktivitesi düşer hatta kaybolur. Market ballarında amilaz enzim düşüklüğünün başka bir nedeni de balların seyreltilmiş olabilme olasılığıdır. Gerçekten de satın aldığımız market ballarının bazılarının fiyatları reçel ve pekmezden bile düşüktü ve görünüşleri de saydam ve parlaktı. Yaptığımız analizlerle bu balın doğal olmadığını iddia etmemiz mümkün değildir. Ancak bazı numuneler şüphe çekmekteydi. Amilaz aktivitesi en düşük olan numuneler de bu cins bal numuneleriydi .

Bal yüksek karbonhidrat, düşük protein içerikli bir gıdadır (85). Çalışmamızda market ballarının protein düzeyi doğal grubun protein düzeyine göre düşük bulunmuştur. Bu grupta protein yapısındaki amilaz da düşük bulunmuştu. Proteindeki farklılık amilozunkine benzerdir. Bu farkın bala uygulanan fizikokimyasal işlemlerle veya teorik olarak seyreltme ile ilgili olabileceği kanaatindeyiz.

Balların TOS ve protein düzeylerinin ölçülmesi, balın tazeliğini, doğallığını gösteren bir marker olan amilaz aktivitesi gibi önemli bir değere sahip olabilir. Bu konuda özellikle gıda bilimcilerinin de içinde bulunduğu multidisipliner alanda ileri çalışmalara gereksinim vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Encye Americana 1993,USA ,Vol 3 int Headqurtes Danbury Connetticult.444
2. John Brackenbury, İnsect and Flowers .1995 UK .s 12
3. Encye Americana 1993,USA ,Vol 3 int Headqurtes Danbury Connetticult.439
4. Ency .int. Grolier of Canada 1968 .USA. Chicago 1961 USA s 473
5. Hayvanlar ansk. Böcekler C.B.P.C Paplishing hd. s .97
6. Anonim 1990 Bal Standartları Enstitüsü .Ankara
7. Tetik , İ .Yerli Tabii Süzme Balların Besleyici Değeri ve Gıda Tüzüğü Yönünden Kimyasal Bileşimlerinin Araştırılması , Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları 1968.
8. Keskin ,H :Besin Kimyası ,Cilt II ,4 Baskı İstanbul ,1982,101-117
9. Anonim :Türkiye Kalkınma Vakfı Entegre Arıcılık Projesi Kazan,Ankara ,1985
10. Şengonca M., I. Temiz ,İzmir ve Çevresinde Üretilen Balların Yapı Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma .Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Ünitesi 1981,36
11. Gontorksi :Der Honig Als Nahrung Der Biene und Seine Entsehung,1960, 181-190
12. Austin ,g.H.:Maltoza Content of Canadian Honey and its Probable Effects on Crystallization ,int .congr .ent 4, 1958 ,1001-1006
13. Keskin ,H :Besin Kimyası ,Cilt II ,4 Baskı İstanbul ,1982,101-117
14. Surh,YJ, Liem , JA, Tannenbaum , SR: 5-Sulfooxymethylfur-fur as a Possible Ultimate Mutagenic and Carcinogenic Metobolite of the Maillard Reaction Product 5-Hydroxymethylfurfural ,j Carcinogenesis 15 (10):2375 -7england ,1994
15. Pichlere ,R,J Vorwolh.G ,Gierschner,K:Factors Controlling the Production of hydroxy Methyl Furfural in Honey .Apidologie 5(2).1984 ,171 -187
16. Anonim .Manuals of Food Quality Control , Food analysis Quality, Adulteration and Test of İdentty , Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome1986
17. Genç1993 Schmidt 1997 Medical Overconcern What are the Real Allergic and Healty Risks Anom Bee Products and Agitherapy
18. Sönmez ve atlan ,1992 Teknik Arıcılık Ege Üniversitesi Basımevi Bornava /İzmir
19. Anonim 1989 Arı Zehiri Tasarısı Türk Standartları Enstitüsü /Ankara
20. Meydanoğlu1985 Arı Sütünün Bileşimi,Dietik Özellikleri Tübitak Marmara Araştırma Enstitüsü Beslenme ve gıda Teknolojisi Ünitesi Gebze /Kocaeli
21. Ghisalberti 1979 E. LPropolis are View Bee Wold 60(2) P:59 -84

- 22 . Perinondi, NI., Thomson, W., Schmid, Hho.,1990. Diabetic Heart And Kidney Exhibit Creased Resistance To Lipid Peroxidation. *Biochim Et Biophys. Acta.* 1047: 63- 9
- 23 . Cheeseman, KH., Slater, TF., 1993. An Introduction To Free Radical Biochemistry. *Br.Med.Bull.*49(3): 479-80.
- 24 .Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri. Mimoza Basım, Yayım basım Dağıtım A.Ş. Konya, 1995
- 25 .Southorn PA. Free Radicals in Medicine I. Chemical Nature and Biological Reactions. *Mayo Clin Proc*, 1988; 63 : 381-389.
- 26 . Freeman BA, Crapo JD. Biology of Disease Free Radicals and Tissue Injury. *Lab Invest*, 1982; 47: 412-426.
- 27 . WHO. Who Reports 10 Million TB Patients Succesfully Treated “DOTS” 10 Years After Declaring TB a Global Emergency, 2003
- 28 . Adler JJ, Rose DN. Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. Boston: Little, Brown and Company; 1996: 129-40
- 29 . Dreher D, Junod AF. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Develoment. *Eur J Cancer* 1996 Jan;32A (1):30-38
- 30 . Liebler, CD., 1994. Antioxidand Reactions Of Carotenoids. *Annals New York Academy Of Sciences.* 20 – 30.
- 31 . Santos-Gomes, PC., Seabra, RM., Andrade, PB., Fernandes-Ferreira, M., 2003. Chemical And Antioxidant Properties Of *Laurocerasus Officinalis* Roem. (Cherry Laurel)FruitGrown In The Black Sea Region.*J Agric Food Chem.* 3;51(25):7489-94.
- 32 . Ripine, JE., Bast, AL., 1997. Lipids I, And The Oxidative Strees Study Graup Oxidative Strees In Chronic Obstructive Pulmonary Disease *Am J Respir Crit Care Med* 156: 341-347.

- 33 . Ammes BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Sep 1;90(17):7915-7922
- 34 . Gulcin I., Kufrevioglu O., Oktay M., Buyukokuroglu ME., 2004 . Antioxidant, Antimicrobial, Antiulcer And Analgesic Activities Of Nettle (*Urtica Dioica L.*). *J Ethnopharmacol.* 90(2-3):205-15.
- 35 . Dean RT, Giese S, Davies MJ. Reactive Species and Their Accumulation on Radical Damaged Proteins. *TIBS*, 1993; 18:437-421.
- 36 . Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *J. Clin Chem.*1995; 42(6):18–19.
- 37 . Knowles RG, Moncada S. Nitric Oxide Synthase in Mammals. *J. Biochem.* 1994;298(12):249–58.
- 38 . Marletta MA. Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(7):123–5.
- 39 . Lancaster J. Nitric Oxide, Principles and Actions. Copyright by Academic Press. Inc. California/USA. 1990.
- 40 . Halliwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease.*Am J Med* 1991 Sep 30; 91(3C): 14S-22S
- 41 .Freeman BA, Crapo JD. Biology of Disease: Free Radicals and Tissue Injury.*Lab Invest* 1982 Nov;47(5):412-426
- 42 . Halliwell B. Oxygen is Poisonous: The Nature and Medical Importance of Oxygen Radicals. *J. Med Lab Sci.* 1984; 41(3):157-62.
- 43 . Candeias LP, Patel KB, Startford MR, Wardman P.Free Hydroxyl Radicals are Formed on Reaction Between the Neutrophil-Derived Species Superoxide Anion and Hypochlorous Acid. *FEBS Lett* 1993 Oct 25;333(1-2):151-153

- 44 . Bland JS. Oxidants and Antioxidants in Clinical Medicine: Past, Present and Future Potential. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine* 1995;5 (3) : 255 – 281
- 45 . Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *J. Clin Chem.*1995; 42(6):18–19.
- 46 . Halliwell B. Oxygen is Poisonous: The Nature and Medical Importance of Oxygen Radicals. *J. Med Lab Sci.* 1984; 41(3):157-62.
- 47 .Sies H De Groot H. Role of Reactive Oxygen Species in Toxicity .*J.Toxicology.*1992;64 (65):547-51.
- 48 . Halliwell B. Reactive Oxygen Species in Living Systems : Source, Biochemistry and Role in Human Disease .*J. The American Journal of Medicine .* 1991; 91 (3C):14-22
- 49 .Mead J.Free Radical Mechanisms in Lipid Peroxidation and Prostaglandins. *Free Radical in Molecular Biology. J.Aging and disease.*1984;65(24):53-66.
- 50 . Dizdaroğlu M. Mechanisms of Oxidative DNA Damage; Lesion and Their Measurement *Kluwer Academic /Plenum Publishers .* 199;302:67-87
- 51 . Notarjan D. Oxidants and Signal Transduction in Vascular Endothelium .*J. Clin. Med .*1994; 125(35):26-37.
- 52 .Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK.*J. Cancer Res.* 1994; 54(6):12-15.
53. Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S, (2002) : The Role of Metals in Site-specific DNA Damage with Reference to Carcinogenesis. *Free Radical Biol. Med.*, 32: 822-832.
54. Urani C, Crippa S, Camatini M, (1998) : Cellular and Molecular Responses of Metal-Induced Toxicity. *Toxicol. Lett.*, suppl. 1:195

55. Kim TW., Yang KS., 2001. Antioxidative Effects Of Cichorium Intybus Root Extract On Ldl (Low Density Lipoprotein) Oxidation. Arch Pharm Res. 24(5):431-6.
56. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford University Press. Inc, London 1999.
57. Randerath K, Zhou GD, Monk SA, Randerath E. Enhanced Levels in Neonatal Rat Liver of 7, 8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-hydroxydeoxyguanosine), a Major Mutagenic Oxidative DNA Lesion. Carcinogenesis 1997; 18: 1419-1421.
58. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease. FASEB J 2003; 17: 1195-1214.
59. Evans MD, Cooke MS. Factors Contributing to the Outcome of Oxidative Damage to Nucleic Acids. BioEssays 2004; 26: 533-542.
60. American Academy of Pediatrics. Tuberculosis In: Pickering LK, ed 2000 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 25th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics 2000: 593-613
61. Halliwell B, Aruoma OI. DNA Damage by Oxygen-derived Species. Its Mechanism and Measurement in Mammalian Systems. FEBS Letters 1991; 281: 9-19.
62. Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat J-L. Oxidative Damage to DNA: Formation, Measurement and Biochemical Features. Mutat Res 2003; 531: 5-23.
63. Li Y, Trush MA. Reactive O₂-dependent DNA Damage Resulting from the Oxidation of Phenolic Compounds by a Copper-redox Cycle Mechanism. Cancer Res 1994; 54: 1895S-
64. Seven, A., Candan, G., 1995 Radikal Ve Lipid Peroksid Düzeyini Artıran Etkenler. Biyokimya Dergisi 4:43-56.

65. Akaike, T.; Sato, K.; Kohno, M.; Ando, M.; Maeda, H. "Bactericidal Activity of Alkyl Peroxyl Radicals Generated by Heme-Iron-Catalyzed Decomposition of Organic Peroxides", *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 55-63 (1992).
66. Muggli, D. 1994. Physiological Requirements of Vitamin E As A Function Of The Amount and Type of Polyunsaturated Fatty Acid. *Fatty Acids and Lipids*. Vol 75, 166 – 168.
67. Smith, EL., Hill, RL., Lehman, R., 1983. *Principles of Biochemistry*. 3rd ed. McGraw Hill, Inc. USA. 86.
68. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyl formation. *J. Biochem* 1992; 286(35): 607–11.
69. McCord JM. Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem* 1993; 26(4): 351–7.
70. Akkus İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1995; 5:1–3.
71. Seven A, İnci F, Civelek S, Burçak G, İnci E, Korkut N. Larenks Kanseri Olgularında Lipid Peroksidasyon ve Antioksidan Statü Göstergelerinin Dokuda İncelenmesi. *Türk ORL Arşivi* 1998; 36: 33–6.
72. Burton G, Traber M. Antioxidant Action of Carotenoids. *J. Nutr.* 1989; 119(6):109-11.
73. Rikans LE, Hornbrook LR. Lipid Peroxidation, Antioxidant and Aging. *J. Biochim Biophys Acta* 1997; 1362(1):116–27.
74. Mates JM, Gomez CP, Castro I (1999): Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochem.* 32, 8, 595-603.
75. Erel, Ö., 2003. A novel Automated Method to Measure Total Antioxidant Response Against Potent Free Radical Reactions. *Clinical Biochemistry* 37(2004) 112-119.

76. Erel O. A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *J. Clinical Biochemistry* 2005; 47(5): 119– 29.
77. Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M and Knez, Z. (2005). Phenols, Proanthocyanidins, Flavones and Flavonols in Some Plant Materials and Their Antioxidant Activities, *Food Chemistry*, 89, 191-198.
78. Bradford, M. M. (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantification of Microgramquanties of Protein Utilizing the Principle Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254
79. Beretta,G., Granata, P., Ferrero, M.,Orioli, M. And Facino, R.M., (2005). Standardization of Antioxidant Properties of Honey by a Combination of Spectrophotometric/Fluorimetric Assays and Chemometrics. *Analitica Chimica Acta*, 533,185-191.
80. Schramm, D.D., Karim, M., Schrader, H.R., Holt, R.R., Cardetti, M. and Keen, C.L. (2003). Honey with High Levels of Antioxidants can Provide Protection to Healthy Human Subjects. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51, 1732-5.
81. Gheldof, N., Wang, X.H. and Engeseth, N.J. (2002). Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5870-7.
82. Dustman, J.H. (1979). Antibacterial Effect of Honey. *Apiacta*, 14, 7-11.
83. Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, M.P., Albertini, M.C. and Piatti, E. (2005). Raw Millefiori Honey is Packed Full of Antioxidants. *Food Chemistry*, In Press.
84. Devillers J, Morlot M, Pham-Delegue MH, Dored JC. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Classification of Monofloral Honeys Based on Their Quality Control Data. *Food Chemistry* 86 (2004) 305–312
85. Azeredo LC, Azeredo MA, Souza SR, Dutra VML. Protein Contents and Physicochemical Properties in Honey Samples of *Apis Mellifera* of Different Floral Origins *Food Chemistry* 80 (2003) 249–254.