



**BEYAZ BALIN SEKONDER METABOLİT ve ŞEKER PROFİLİNİN
AYDINLATILMASI, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

Yaşar HASANOĞLU

Doktora Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU

AĞRI – 2025

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Yaşar HASANOĞLU

BEYAZ BALIN SEKONDER METABOLİT ve ŞEKER PROFİLİNİN
AYDINLATILMASI, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU

AĞRI-2025

.../.../2025

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum “Beyaz Balın Sekonder Metabolit ve Şeker Profilinin Aydınlatılması, Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi” adlı tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

☐ Tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

☐ Tezim sadece Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.

☒ Tezimi 3 yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

12.09.2025

Yaşar HASANOĞLU

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU danışmanlığında, Yaşar HASANOĞLU tarafından hazırlanan bu çalışma, 08/08/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği / oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN

İmza :

Üye : Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU

İmza :

Üye : Prof. Dr. Veysel ÇOMAKLI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Mahinur KIRICI

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebubekir İZOL
İmza :

Yukarıdaki imzalar adı geçen öğretim üyelerine ait olup;

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../2025 tarih ve nolu kararı ile onaylanmıştır.

..../...../.....

Prof. Dr. Mehmet TEYFUR

Enstitü Müdürü

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BEYAZ BALIN SEKONDER METABOLİT ve ŞEKER PROFİLİNİN AYDINLATILMASI, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Yaşar HASANOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU

Beyaz balın üretiminde uzun dilli Kafkas arılarının önemli bir rol oynadığı vurgulanmakta olup, kafkas arılarının yüksek rakımlı dağlarda çeşitli çiçeklerin özlerini toplayarak bal ürettikleri ifade edilmektedir. Elde edilen bal, süzme işleminden sonra dinlendirilerek beyaz bal haline getirilmektedir. Beyaz bal, yoğun bir kıvama ve karakteristik yoğun tat profiline sahiptir.

Tez kapsamında beyaz balın şeker profili ve biyolojik aktiviteleri belirlenmiş ayrıca sekonder metabolit analizi yapılarak bazı kimyasal ve kalite parametreleri belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan analitik yöntemler arasında LC-MS/MS ile 35 farklı bileşen ve HPLC ile fruktoz, glukoz, sakkaroz, turanoz, maltoz gibi şekerlerin konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak beyaz balın prolin ve diastaz konsantrasyonları da belirlenmiştir. Tüm bu içeriklerin tespiti beyaz balın besin değeri ve sağlık potansiyeli hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır.

Beyaz balın bu özelliklerinin yanı sıra asetilkolin esterase (AChE) ve bütirilkinolin esterase (BChE) üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır. NADES (Doğal Derin Ötektik Çözücüler) ve geleneksel maserasyon yöntemi ile hazırlanan beyaz bal ekstraktlarının ayrıca antioksidan özellikleri tez kapsamında araştırılmıştır. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde beyaz balın biyolojik etkileri ve içerik analizleri doğal ürün olması sebebiyle literatüre anlamlı ve önemli fikir vereceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyaz bal, Sekonder metabolit, HPLC, LC-MS/MS, NADES, AChE, BChE, Antioksidan

ABSTRACT

Ph. D. DISSERTATION

ILLUMINATION of THE SECONDARY METABOLITE and SUGAR PROFILE of HONEY, DETERMINATION of ITS BIOLOGICAL ACTIVITIES

Yaşar HASANOĞLU

Advisor: Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU

It is emphasized that Caucasian honeybees, with their long tongues, play an important role in the production of white honey, as they collect nectar from various flowers in high-altitude mountainous regions. The collected honey is then filtered and left to rest, resulting in a product with a dense consistency and a distinctive, intense flavor profile.

Within the scope of this thesis, the sugar profile and biological activities of white honey were determined, and a secondary metabolite analysis was conducted to identify specific chemical and quality parameters. Among the analytical methods used, LC-MS/MS enabled the identification of 35 different compounds, while HPLC was employed to quantify sugars such as fructose, glucose, sucrose, turanose, and maltose. In addition, the proline content and diastase activity of white honey were analyzed. The identification of these components provides valuable insights into the nutritional value and potential health benefits of white honey.

In addition to these properties, the inhibitory effects of white honey on acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) were investigated. Furthermore, the antioxidant activities of white honey extracts—prepared using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and the traditional maceration method—were examined within the scope of this thesis. Based on the findings, it is considered that the biological activities and compositional analyses of white honey, as a natural product, will contribute significantly and meaningfully to the existing literature.

Keywords: White honey, Secondary metabolite, HPLC, LC-MS/MS, NADES, AChE, BChE, Antioxidant

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgisini, deneyimini ve desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen; araştırmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü imkânı sunan çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hülya AKINCIOĞLU'na gönülden teşekkür ederim.

Aynı zamanda, her aşamada fikirlerine başvurduğum, bilgi ve birikiminden sürekli faydalandığım, yol göstericiliğiyle bana büyük katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN'e içten teşekkürlerimi sunarım. Yine her türlü yardımı esirgemeyen Doç. Dr. Akın AKINCIOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Ertuğrul CEYRAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında destek olan, bilgi ve yardımlarıyla katkıda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Rüya SAĞLAMTAŞ ve Dr. Öğr. Üyesi Ebubekir İZOL hocalarıma, laboratuvarıda birlikte çalıştığımız yüksek lisans öğrencileri Dilara TOĞRUL ve Neslihan AYDEMİR'e, ayrıca Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nın kıymetli çalışanlarına sağladıkları destek için teşekkür ederim.

Bu zorlu süreçte her daim yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sabırla ve sevgiyle yanımda duran sevgili eşime ve canım kızlarıma sonsuz teşekkür ederim.

23/06/2025

Yaşar HASANOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ	1
-----------------------	----------

İKİNCİ BÖLÜM

2. KURAMSAL TEMELLER	6
2.1. Apiterapi	6
2.1.1. Apiterapinin Kullanım Amaçları:.....	6
2.1.2. Balın Apiterapi Özellikleri	6
2.1.3. Propolis.....	8
2.1.4. Arı Ekmeği	10
2.1.5. Polen.....	10
2.1.6. Arı Sütü	12
2.1.7. Beyaz Bal	13
2.2. Enzimler	14
2.2.1 Asetilkolinesteraz (AChE)	16
2.2.2. Bütilkolinesteraz (BChE).....	18
2.2.3. α -Glikozidaz	20
2.3. Fenolik Bileşikler	22
2.3.1. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	23
2.3.2. Antioksidanlar	25
2.4. Serbest Radikaller.....	26
2.4.1. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları	27
2.5. DES ve NADES	28

2.5.1. Doğal Derin Ötektik Çözücüler (NADES).....	30
2.5.2. Bitkisel Ekstraksiyon Uygulamaları.....	30

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MATERYAL ve YÖNTEM	32
3.1. Materyal.....	32
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	33
3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanış Yöntemleri.....	33
3.1.3.1. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler	33
3.1.4. Antioksidan ve Radikal Giderme Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler ..	35
3.1.4.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Kapasitesi İçin Hazırlanan Çözeltiler:	35
3.1.4.2. Kuprak (CUPRAK) Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler	35
3.1.4.3. ABTS ⁺ Radikali Giderme Yönteminde Çözeltiler.....	36
3.1.4.4. DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ile ilgili çözeltilerin hazırlanması.....	36
3.1.5. NADES Çözeltilerinin Hazırlanması	36
3.2. Yöntem	37
3.2.1. Enzim İnhibisyonu Çalışmaları.....	37
3.2.2. Antioksidan Çalışmaları.....	37
3.2.3. LC-MS/MS Sistemi ile Beyaz Bal'ın Sekonder Metabolit Profiline Belirlenmesi	39
3.2.4. HPLC Sistemi ile Beyaz Bal Örneğinin Şeker Profiline Belirlenmesi	40
3.2.5. Beyaz Bal Örneğindeki Prolin Muhtevasının Belirlenmesi	40
3.2.6 Beyaz Bal Örneğinin Diastaz Sayısı ve Nem Miktarının Belirlenmesi	41

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR.....	42
4.1. Asetilkolinesteraz (AChE), Bütilkolinesteraz (BChE) ve α -Glikozidaz Enzimleri ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları.....	42
4.1.1. AChE Enzimi Üzerine Beyaz Balın İnhibisyon Etkisi.....	42
4.1.2. BChE Enzimi Üzerine Beyaz Balın İnhibisyon Etkisi.....	43
4.1.3. α -Glikozidaz Enzimi Üzerine Beyaz Balın İnhibisyon Etkisi.....	44
4.2. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları	46

4.2.1. Fe ⁺³ -Fe ⁺² İndirgeme Kuvveti Bulguları	46
4.2.2. Cu ⁺² -Cu ⁺ İndirgeme Kuvveti (Kuprak Metodu) Bulguları	47
4.2.3. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları.....	48
4.2.4. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları	49
4.3. Beyaz Bal Örneğinin Sekonder Metabolit Profili	50
4.4. Beyaz Bal Örneğinin Şeker Profili	54
4.5. Beyaz Bal Örneğinin Prolin, Diastaz Sayısı ve Nem Muhteviyatı.....	54

BEŞİNCİ BÖLÜM

5. SONUÇ ve TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ.....	77

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. DES oluşumunda H bağı alan ve veren bazı maddeler	29
Tablo 3.1. Araştırma Süresince Yararlanılan Cihaz ve Aletler	33
Tablo 3.2. Uygulanan gradient sistem programı	40
Tablo 4.1. AChE, BChE ve α -Glikozidaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Beyaz Bal'ın %50 İnhibisyona Sebep Olan Beyaz Bal'ın IC ₅₀ Değerleri.....	45
Tablo 4.2. Beyaz Bal'ın 30 μ g/ml Konsantrasyonunda İndirgeme Kapasitelerinin Standart Antioksidanlarla Mukayesesi.....	48
Tablo 4.3. Beyaz Bal Çözeltilisinin DPPH• ve ABTS• ⁺ Radikal Giderme Aktivitelerine ait IC ₅₀ Değerlerinin, Standart Antioksidanlar Olan BHA, BHT, α - tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırılması.	50
Tablo 4.4. Beyaz bal örneğinin sekonder metabolit profili	53
Tablo 4.5. Beyaz bal örneğinin prolin, diastaz sayısı ve nem miktarı.....	55
Tablo 5.1. AChE, BChE ve α - Glikozidaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Beyaz Bal'ın %50 İnhibisyona Sebep Olan Beyaz Bal Konsantrasyonları IC ₅₀ Değerleri.	57
Tablo 5.2. Beyaz Bal'ın 30 μ g/ml Konsantrasyonunda İndirgeme Kapasitelerinin Standart Antioksidanlarla Mukayesesi.....	60
Tablo 5.3. Beyaz Bal Çözeltilisinin DPPH• ve ABTS• ⁺ Radikal Giderme Aktivitelerine Ait IC ₅₀ Değerlerinin, Standart Antioksidanlar Olan BHA, BHT, α - tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırılması.	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Arı Ürünü Propolis	8
Şekil 2.2. Bir Kovan İçinde Arı Propolisi.....	9
Şekil 2.3. Arı Ekmeği	10
Şekil 2.4. Polen	11
Şekil 2.5. Arı Sütü (Royal Jelly).....	12
Şekil 2.6. Beyaz Bal.....	13
Şekil 2.7. Enzim ile substrat arasında Anahtar-Kilit Modeli.....	16
Şekil 2.8. Asetilkolinesteraz Enzimi kataliz mekanizması	18
Şekil 2.9. Bütilirilkolinesterazın kataliz mekanizması	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 4.1. AChE Enziminin 5 farklı Beyaz Bal Konsantrasyonunda IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Beyaz Bal] grafiği	42
Şekil 4.2. AChE Enzminin 5 farklı Takrin Konsantrasyonunda IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği	43
Şekil 4.3. BChE Enziminin Aktivitesi 5 Farklı Beyaz Bal Konsantrasyonunda IC ₅₀ Değerinin Bulunması İçin Çizilen Aktivite (%)-[Beyaz Bal] Grafiği	43
Şekil 4.4. BChE Enzim Aktivitesi Kullanılarak Çalışılan 5 Farklı Takrin Konsantrasyonunda Çizilen Aktivite (%)-[Takrin] Grafiği	44
Şekil 4.5. α-Glikozidaz Enzminin 5 farklı Beyaz Bal Konsantrasyonunda IC ₅₀ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Beyaz Bal] grafiği	44
Şekil 4.6. α-Glikosidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Takrin'in İnhibitör Etkisini Belirlemek Amacıyla (%)-[Akarboz] Beş Farklı Konsantrasyonda Uygulanan Örneklerle Elde Edilen Aktivite (%)-[Akarboz] Grafiği.....	45
Şekil 4.7. 10–30 µg/mL Aralığındaki Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Beyaz Bal Örneklerinin Ferrik İyonlarını (Fe ³⁺) İndirgeme Kapasitelerinin, Standart Antioksidanlar Olan BHA, BHT, A-Tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırılması	46

Şekil 4.8. 10–30 µg/mL Aralığında Hazırlanan Farklı Konsantrasyonlardaki Beyaz Bal Örneklerinin Kuprik İyonlarını (Cu^{2+}) İndirgeme Aktivitelerinin, Standart Antioksidanlar Olan BHA, BHT, A-Tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırılması	47
Şekil 4.9. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Tayini İçin Hazırlanan Standart DPPH Grafiği	48
Şekil 4.10. Farklı Konsantrasyonlardaki Beyaz Bal'ın (10-30 µg/ml) $\text{ABTS}^{\cdot+}$ Giderme Aktivitesinin Birer Standart Antioksidan Olan BHA, BHT, α -tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırması.....	50
Şekil 4.11. LC-MS/MS tekniği ile oluşturulan standart toplam iyon (a) ve MRM kromatogramları.....	51
Şekil 4.12. Beyaz bal örneğine ait toplam iyon (a) ve MRM (b) kromatogramları...	51
Şekil 4.13. Şeker standartları ile oluşturulan standart kromatogram.....	54
Şekil 4.14. Beyaz Bal örneğine ait HPLC kromatogramı	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABTS	:	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit
AChE	:	Asetilkolinesteraz Enzimi
AChEI	:	Asetilkolinesteraz İnhibitörü
BChE	:	Bütilkolinesteraz Enzimi
BHA	:	Bütilatlı Hidroksi Anisol
BHT	:	Bütilatlı Hidroksi Toluen
CAT	:	Katalaz
DPPH	:	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
ABTS	:	2,2- azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
DTNB	:	5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoik asit)
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik Asit
ES	:	Enzim-Substrat Kompleksi
ESI	:	Elektrospray İyonizasyonu
ETS	:	Elektron Taşıma Sistemi
AGI	:	α - glikozidaz inhibitörü
DES	:	Derin Ötektik Çözücü
NADES	:	Doğal Derin Ötektik Çözücü
CA	:	Sitrik asit
G	:	Glukoz

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ

Arı ürünü denildiğinde akla ilk olarak bal, polen ve balmumu gelir; ancak bu ürünlerin yanında, bal arısının propolis, arı sütü, apilarnil, arı zehri, arı ekmeği (perga) ve kovan havası gibi biyolojik açıdan önemli diğer ürünleri de bulunmaktadır. (Kumar ve ark. 2010;2:385–395). Genel olarak bal son derece besleyici, mineral ve vitamin içeren, serbest radikalleri giderme etkisi olan, ayrıca yaşlanmayı geciktiren güçlü antioksidan etkiye sahip arı ürünüdür (Kumar vd. 2010).

Bal, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından çiçek nektarları, bitkilerin salgıları veya bitki yüzeyindeki emici böceklerin salgılarından üretilen doğal ve tatlı bir maddedir. Elde edildiği bitki florasına bağlı olarak değişkenlik gösteren kimyasal bileşimi, temel olarak şekerler, az miktarda protein, enzimler, amino asitler, mineraller, eser elementler, vitaminler, aroma bileşikleri, çeşitli flavonoidler ve fenolik bileşikleri içermektedir. Bu zengin içeriği sayesinde bal, antik çağlardan beri sadece besin maddesi olarak değil, aynı zamanda yanıklar, kataraktlar, ülserler, diyabet ve yara iyileşmesi gibi rahatsızlıkların tedavisinde halk hekimliğinde ilaç olarak kullanılmıştır. Zamanla yapılan bilimsel araştırmalar, bu geleneksel kullanım alanlarını desteklemiş ve balın terapötik bir ajan olarak etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Alternatif tıpta yaygın bir kullanım alanı bulan bal, çeşitli hastalıklara karşı önemli terapötik özellikleri ve antioksidan etkileriyle öne çıkmaktadır (Coşkun, 2022).

İnsanlık tarihi boyunca, balın tatlı ve besleyici özellikleri nedeniyle büyük bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. İlk insanlar, doğal ortamda, özellikle kaya kovuklarında ve ağaç oyuklarında bulunan arı kolonilerinin ballarını tüketmişlerdir. Bu dönemde, arıcılık kavramı henüz gelişmemiş olup, bal doğadan rastgele toplanan bir besin kaynağı olarak değerlendirilmiştir (Sarıöz, 2006). Bal arılarının (*Apis mellifera*) genetik kökenlerinin Afrika, Asya ve Avrupa kıtalarında olduğu bilinmektedir. Bu bölgeler, bal arılarının ilk yayılmaya başladığı yerlerdir. İnsanların göç hareketleri, bal arılarının da dünyaya yayılmasında önemli bir rol oynamıştır. Göç

eden insanlar, yanlarında arı kolonilerini de taşıyarak bal arılarının farklı coğrafyalara yayılmasını sağlamışlardır (Güler, 2006).

Bal, bal arılarının çiçeklerden topladıkları nektarları kendi enzimleriyle işleyerek nem oranını düşürüp olgunlaştırdıkları ve peteklerde depoladıkları, sarı renkli, tatlı ve viskoz bir doğal ürün olarak tanımlanmaktadır (İzol, 2022). Balın kimyasal yapısının büyük bir kısmını (%60-80) karbonhidratlar oluşturmakta olup, bunların başlıcaları glukoz ve fruktozdur. İçeriğinde ayrıca %13-20 oranında su bulunmakta; proteinler, amino asitler, vitaminler, fenolik bileşikler ve mineraller de daha düşük oranlarda yer almaktadır. Yapılan bilimsel araştırmalar, balın içeriğinde bulunan biyoaktif bileşikler sayesinde serbest radikal oluşumunu ve oksidatif stresi engelleyerek kansere karşı koruyucu etkiler gösterebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca mide, kolon ve karaciğer kanserlerinin tedavisinde olumlu etkiler sağladığı tespit edilmiştir (İzol, 2022; Abdel-Latif, 2015; İzol ve Bengü, 2022). Çok farklı çalışmalar göstermiştir ki, bal antibakteriyel ve antioksidan özellikleri nedeni ile büyük önem taşır (Isidorov vd. 2015; Marshall vd. 2015).

Arı ürünleri, tarih boyunca insanlık için önemli ve değerli doğal kaynaklar olmuştur. En bilinen ve yaygın olarak tüketilen arı ürünü baldır; farklı kültürlerde temel bir gıda maddesi olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Balın ardından, arıların başlıca protein kaynağı olan polen, bal üretiminde önemli bir besin maddesi olarak işlev görür. Son yıllarda ise bilimsel araştırmalar ve teknolojik ilerlemeler sayesinde, propolis, arı sütü ve arı ekmeği (perga) gibi diğer arı ürünlerinin önemi giderek artmıştır. Bu ürünler, özellikle sağlık üzerindeki biyolojik etkileri ve zengin kimyasal içerikleriyle öne çıkmakta ve onları baldan daha kıymetli hale getirmektedir. Öte yandan, erkek arı larvası ve arı zehri de arı ürünleri arasında yer alsa da, bunlar besin olarak kullanılmaz (İzol, 2023).

Arılar, polen toplama faaliyetlerinde oldukça istikrarlıdır. Ancak, topladıkları polenin içeriği, ziyaret ettikleri bitkilerin türüne ve çeşitliliğine göre değişkenlik gösterir. Bu durum, polenin bileşiminin sabit olmadığı, çevresel faktörlere bağlı olarak değiştiği anlamına gelir. Arıların polen toplama süreci, bitkilerin tozlaşmasına da önemli bir katkı sağlar. Arılar, çiçekten çiçeğe dolaşarak polenleri taşır ve bitkilerin üremesine yardımcı olur (Öztürk ve Akçiçek, 2015).

Farklı bitki türlerine ait polenlerin şekil ve yapıları birbirinden farklıdır. Bu özellik, polenlerin mikroskop altında incelenerek bitki türlerinin tanımlanmasında ve balın hangi bitkilerden elde edildiğinin belirlenmesinde kullanılmasını sağlar. Polenin bileşimindeki bu çeşitlilik, balın kalitesini ve besin değerini de etkiler. Farklı bitki türlerinden elde edilen polenler, bala farklı aroma ve besin öğeleri katar (Bleha vd. 2019).

Balın antibiyotik özellikleri, bir dizi faktörle ilişkilendirilmiştir; bunlar arasında hidrojen peroksit, düşük pH ve metilgliyoksal gibi bileşikler bulunur. Ayrıca, arılar ve kuluçka üzerine yapılan farmakolojik araştırmalar, kendi kendine tedavi ve bitkisel ilaçların önemini giderek artırmaktadır. İkincil bitki metabolitleri, özellikle alkaloidler, fenolik asitler (örneğin kafeik asit, p-kumarik asit, ellagik asit ve gallik asit) ve flavonoidler (krizin, galangin, pinosemirin, kuersetin, kaempferol ve tektokrisin gibi) gibi bileşikler, enfekte bireylerde parazit ve patojen yüklerini azaltmakla ilişkilidir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bombus arılarının *Crithidia bombi* adlı bağırsak hastalığına karşı alkaloidler, terpenoidler ve iridoid glikozitlerin antimikrobiyal etkilerini göstermektedir (Baracchi vd. 2015; Manson vd. 2010; Richardson vd. 2015).

Nektarda bulunan ikincil bitki metabolitleri ile ilgili yapılan çalışmalar, bal ve bombusların nektar ve polen toplama süreçlerinde patojenlerden nasıl korunabileceğine dair önemli bulgular sunmaktadır. Mikroorganizmalardan mayalar, bal ve arı ürünlerinde rutubet ve sıcaklık durumuna göre fermantasyona neden olmakta ve dolayısıyla ürünün duyuşal ve diğer özelliklerinin bozulmasına neden olmaktadır (Çukur vd 2016). Bal arılarının, balın fermente olmasını önleyebilme yeteneği büyük ölçüde içerdiği yüksek şeker konsantrasyonuna dayanmaktadır. Ancak, yalnızca yüksek şeker oranının yeterli olup olmadığını sorgulamak ve balın diğer antimikrobiyal özelliklerini araştırmak önemlidir. Özellikle, seyreltilmiş balın incelenmesi gereklidir. Bal, depolama sırasında yüksek şeker oranına sahip olsa da, larva beslenmesine eklendiğinde seyreltilir. Araştırmalar, balın antimikrobiyal etkilerinin, glikoz oksidaz enzimi tarafından üretilen hidrojen peroksit, düşük pH (asitlik), metilglioksal, arı defensin-1 adı verilen antimikrobiyal peptit, majör arı sütü proteini ve çeşitli fenolik bileşikler gibi faktörlerden kaynaklandığını ortaya

koymuştur (Molan 1992a, 1992b; Brudzynski and Sjaarda, 2015; Dustmann, 1979; Kwakman and Zaat, 2012). Bunlar, balın antimikrobiyal potansiyeline katkı sağlayan önemli bileşenler olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, balın iğeriğinde bitkilere özgü birçok ikincil metabolit bileşeninin de yüksek oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir.

Balın antioksidan aktivitesi ile toplam fenolik iğeriği arasında güçlü bir pozitif ilişki olduğu belirlenmiştir. Balın antioksidan etkisinin büyük ölçüde fenolik bileşiklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Özellikle koyu renkli ballar, yüksek miktarda fenolik bileşik iğermekte olup, bu bileşiklerin askorbik asit ve E vitaminine kıyasla daha güçlü antioksidan aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Sarıkaya, 2009).

Balın iğeriğinde yaygın olarak bulunan fenolik asitler ve flavonoidler; anti-bakteriyel, anti-enflamatuar, anti-alerjik ve anti-trombotik etkiler göstermektedir. Ayrıca yapılan epidemiyolojik çalışmalar, bu bileşiklerin kardiyovasküler hastalıkların ve kanserin tedavisinde önemli roller üstlendiğini ortaya koymuştur (Al-Habori vd. 2002; Pyrzynska and Biesaga, 2009; Miotto, 2010).

Bunun yanı sıra, balın antibakteriyel özelliklerine katkıda bulunan diğer bileşenler arasında polifenoller, fenolik asitler (örneğin, kafeik asit, ferulik asit, kumarik asit, ellagik asit vb.) ve bunların türevleri (örneğin, metil syringate), aromatik asitler ve son dönemde Maillard reaksiyonu ürünleri de yer almaktadır (Gauhe, 1941; White vd. 1962; Dustman, 1971; Molan, 1995; Bogdanow, 1997; Erdoğan ve Erbilir, 2007; Kwakman and Zaat, 2012).

Beyaz balın üretiminde, uzun dilli Kafkas arıları önemli bir rol oynar. Bu arılar, eşsiz bitki örtüsüne sahip yüksek rakımlı dağlara çıkarak çeşitli çiçeklerin özlerini toplarlar. Farklı çiçeklerden topladıkları polenlerle bal üretirler. Arıların ürettiği bal süzüldükten sonra, bir süre dinlendirilerek beyaz bal elde edilir. Süzme baldan daha yoğun bir kıvama sahip olan bu balın tadı oldukça yoğundur. Sekonder metabolitler primer metabolitlere kıyasla çok düşük konsantrasyonlarda tabiattaki doğal ürünlerde ve özellikle bitki ve bitki kaynaklı ürünlerde bulunmaktadır. Arı ürünleri de sekonder metabolitleri içinde bulunduran değerli doğal ürünlerdir (İnci vd 2023; Chen vd. 2005, 2020).

Arı ürünleri, kaynaklarına göre iki ana gruba ayrılır. Birinci grup; doğrudan arı tarafından sentezlenen arı sütü, arı zehri, erkek arı larvası (erkek arı mumu) ve bal mumunu içerir. İkinci grup ise, arının topladığı bitkisel hammaddelerden elde ettiği bal, arı ekmeği, propolis ve polen gibi ürünlerden oluşur (İzol, 2023).

Günümüzde, gelişmiş analitik tekniklerin kullanımıyla, arı ürünlerinin karmaşık kimyasal yapıları ve biyolojik işlevleri daha iyi anlaşılmaktadır. Bu ürünlerin, fenolik ve flavonoid gibi zengin biyoaktif bileşenler içermesi, çeşitli sağlık yararları sunabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, arı ürünleri, son yıllarda bilimsel araştırmaların ilgi odağı haline gelmiştir. Bu bağlamda, yapılan bir çalışmada, farklı arı ürünlerinin fenolik ve flavonoid içerikleri, antioksidan kapasiteleri, bazı hastalıkların tedavisinde rol oynayan metabolik enzimler üzerindeki etkileri ve balın kalite göstergeleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (İzol, 2023).

Bitkisel kaynaklı ürünlerde, özellikle doğal ürünlerde, primer metabolitlere kıyasla daha düşük yoğunlukta bulunan sekonder metabolitler, bu ürünlerin biyolojik aktivitelerinde önemli roller üstlenir. Arı ürünleri, bu değerli sekonder metabolitler açısından zengin doğal kaynaklar olarak kabul edilir. İlaç, gıda ve kozmetik endüstrilerinde arı ürünlerinin tercih edilmesinin temel nedenlerinden biri, bu ürünlerin içerdiği sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler, farklı biyolojik etkileri nedeniyle geniş çaplı araştırmalara konu olmakta ve bilim dünyasının ilgisini çekmektedir.

Sekonder metabolitler arasında fenolik bileşikler en önemli grubu oluşturur. Fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler, terpenler, stilbenler, lignanlar, ksantonlar, lignin ve alkaloidler gibi çeşitli bileşikler, sekonder metabolitlere örnek olarak verilebilir. Özellikle fenolik ve flavonoid bileşiklerin, antikanser, antibakteriyel, antimikrobiyal ve antioksidan gibi önemli biyolojik aktiviteler sergilediği, yapılan bilimsel çalışmalarla kanıtlanmıştır (İzol, 2025)

İKİNCİ BÖLÜM

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Apiterapi

2.1.1. Apiterapinin Kullanım Amaçları:

Apiterapi, arı ve arı ürünlerinin, koruyucu sağlık uygulamalarında ve bazı hastalıkların tedavisinde tamamlayıcı bir yöntem olarak kullanılması biçimidir. Başlıca arı ürünleri bal, balmumu, arı poleni, propolis, arı sütü, apilarnil ve arı zehridir. Çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde ve önlenmesinde destekleyici bir rol oynamayı amaçlar. Kullanım amaçlarından bazıları şunlardır (Sforcin, 2007; Orsolic, 2009; Wu, Li, Liu, 1991; Watanabe vd. 1996; Vucevic vd. 2007; Abuharfeil vd. 2008; Al-Waili, 2003; Banskota vd. 2001).

- **Bağışıklık Sistemini Güçlendirme** (Pasupuleti vd. 2017).
- **Enflamasyonu Azaltma** (Sobral vd. 2017).
- **Ağrı Yönetimi** (Ali and Kunugi, 2020).
- **Yara İyileşmesi** (Burlando and Cornara, 2013).
- **Cilt Sorunları** (Al-Waili vd. 2012).
- **Solunum Yolu Hastalıkları** (Oduwole vd. 2018).
- **Nörolojik Hastalıklar** (Ali and Kunugi, 2020).

2.1.2. Balın Apiterapi Özellikleri

Apiterapi, arı ürünlerinin (bal, arı sütü, polen, propolis, arı zehri vb.) tıbbi amaçlarla kullanılmasıdır. Bal, binlerce yıldır şifa kaynağı olarak kullanılmış, özellikle doğal tedavi yöntemlerinde önemli bir yer edinmiştir. Balın apiterapi özellikleri, içerdiği bileşikler ve biyolojik aktiviteleri sayesinde geniş bir yelpazeye yayılmaktadır. Bal, apiterapinin en bilinen ve en çok kullanılan arı ürünlerinden biridir. İçeriğindeki zengin bileşenler sayesinde çeşitli sağlık sorunlarına karşı destekleyici özellikler sunar (Harissis, 2009).

Bal, güçlü antibakteriyel özelliklere sahiptir. Balın içeriğindeki doğal şekerler, peroksit bileşenleri ve fenolik bileşikler, bakteri ve virüsleri öldürme kapasitesini artırır. Örneğin; Manuka balı Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) gibi antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı etkili olduğu literatürde yer almaktadır (Molan, 2001). Genel olarak bal, flavonoidler, fenolik asitler ve vitamin C gibi güçlü antioksidanlar içerir. Bu maddeler, serbest radikalleri nötralize ederek hücreleri oksidatif strese korur ve yaşlanmayı yavaşlatır. Bu nedenle bal, anti-aging (yaşlanma karşıtı) etkileriyle dikkat çeker (İzol vd. 2025a; Alvarez-Suarez vd. 2014). Bununla birlikte bal, özellikle içeriğindeki fenolik bileşikler nedeniyle güçlü anti-inflamatuar özellikler gösterir. Balın düzenli tüketimi, iltihaplanmayı azaltabilir ve romatizmal hastalıklar, artrit gibi durumların tedavisinde yardımcı olabilir (Al-Waili vd. 2003). Bal, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle yara iyileşmesinde de kullanılır. Bal, topikal olarak uygulandığında yaraların hızlı bir şekilde iyileşmesine yardımcı olabilir. Ayrıca cilt bakımında, akne tedavisinde ve sivilce izlerinin tedavisinde de etkili olduğu bilinmektedir (Patocka vd. 2014).

Bilindiği üzere bal prebiyotik özelliklere sahiptir bu nedenle sindirim sistemi üzerinde olumlu etkiye sahiptir. Sindirimi iyileştirir ve bağırsak florasını dengelemeye yardımcı olur. Ayrıca balın, mide ülserlerinin tedavisinde de etkili olduğu gösterilmiştir (Alvarez-Suarez vd. 2013).

Bal, içerdiği vitaminler (özellikle B ve C vitaminleri), mineraller, enzimler ve diğer besin bileşenleri sayesinde bağışıklık sistemini güçlendirir. Düzenli bal tüketimi, soğuk algınlığı ve grip gibi enfeksiyonlara karşı koruma sağlayabilir (Banyai vd. 2017). Kolesterol seviyelerini düzenleyerek ve damar sertliğini azaltarak kalp sağlığını destekler. Ayrıca balın kan basıncını dengeleme ve kan şekerini stabil tutma gibi olumlu etkileri de bulunmaktadır (Al Waili vd. 2013). Bal, içerdiği çeşitli vitaminler, mineraller, amino asitler, karotenoidler, organik asitler, aromatik bileşikler ve enzimler sayesinde sindirimi kolay, besleyici ve birçok hastalığa karşı koruyucu özellikler taşıyan fonksiyonel bir gıdadır. Kimyasal bileşimi, şekerler, proteinler, su, organik asitler, mineraller, vitaminler, fenolik bileşikler ve serbest amino asitler gibi hem makro hem de mikro düzeyde birçok önemli bileşenden oluşur. Bu zengin içerik, balın

sadece bir tatlandırıcı değil, aynı zamanda sağlığı destekleyen önemli bir besin kaynağı olmasını sağlar (Silva vd. 2016).

2.1.3. Propolis

Bal arılarının doğadan topladıkları bitki salgıları ve polen gibi maddeleri, ürettikleri enzimler ve bal mumu ile karıştırmak oluşturdukları doğal bir arı ürünüdür (Pellati vd. 2011, İzol vd. 2024). Propolis 15-20 derecede mum, 30-40 derecede yapışkan ve sakız kıvamındadır.

Bal arıları, kovanlarının içindeki küçük çatlakları kapatmak ve dış etkenlere karşı koruma sağlamak amacıyla özenle bitki reçineleri toplarlar. Bu reçineler, kovana taşınarak propolis adı verilen doğal bir maddeye dönüştürülür. Arılar, propolisi esas olarak kovanın steril kalmasını sağlamak ve istenmeyen canlıların girişini engellemek için antiseptik bir bariyer olarak kullanırlar. Arıların yaşamı için hayati öneme sahip olan propolis, geleneksel ve alternatif tıp uygulamalarında, hastalıkların hafifletilmesi ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi amacıyla yaygın olarak değerlendirilmektedir. Propolisin kimyasal yapısı, arıların topladığı bitki türleri, coğrafi konum ve mevsimsel değişiklikler gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Yapılan ayrıntılı analizler, propolisin içinde 300'den fazla farklı bileşik tespit edildiğini ortaya koymuştur (Anjum vd. 2019). Bu bileşikler arasında fenolik maddeler, aromatik asitler, uçucu yağlar, balmumu ve amino asitler bulunmaktadır. Propolisin biyolojik aktivitesinin temelini ise, fenolik bileşikler içindeki flavonoidler ve hidroksinamik asit türevleri oluşturmaktadır.



Şekil 2.1. Arı Ürünü Propolis

Propolis kelimesi, Yunanca "pro" (ön) ve "polis" (şehir) sözcüklerinden türetilmiştir ve bal arılarının kovanlarını savunma işlevini ifade eder (Sforcin and Bankova, 2011).



Şekil 2.2. Bir Kovan İçinde Arı Propolisi

Arılar, propolisi kovanlarındaki çatlakları ve yarıkları kapatmak, kovan iç yüzeylerini ince bir tabaka halinde kaplayarak temizlenmesini ve dezenfekte edilmesini sağlamak için kullanırlar. Ayrıca, kovanın peteklerini yapıştırmak, çerçeveleri onarmak ve peteklerdeki yavru gözlerini dezenfekte etmek amacıyla da propolis kullanılır. Propolis, kovanın genel hijyenini koruyan ve zararlılara karşı savunma sağlayan önemli bir doğal bileşiktir. Propolis, bal arılarının kovanlarının soğuktan korunması amacıyla, kovandaki delikleri kapatarak kışa hazırlık yapmalarına yardımcı olur. Ayrıca, kovanın dışarıdan gelecek yabancı canlılardan korunmasında önemli bir rol oynar. Eğer kovana giren yabancı canlılar, kovandan atılamayacak kadar büyükse, bu canlılar propolis ile mumyalanarak kokuşmalarının önüne geçilir (İzol and Turhan, 2024; Ghisalberti, 1979; Bankova vd. 2000; Velikova vd. 2000; Bogdanov, 2012c). Propolisin bileşimi, toplandığı bölgenin bitki örtüsüne, iklim koşullarına ve mevsime bağlı olarak değişir. Bu nedenle, propolisin görünümü ve bileşimi de zamanla farklılık gösterebilir. Renk olarak sarımsı yeşilden, kırmızı ve koyu kahverengiye kadar değişen tonlar alabilir. Ayrıca, her propolis örneği kendine özgü farklı aromatik kokular taşır (Bankova vd. 2000).

2.1.4. Arı Ekmeği

Polen, çiçekli bitkilerin erkek organı olan stamenin uç kısmında bulunan anterlerde yer alan ve bal arıları tarafından toplanan, buruşuk, yapışkan ve yağlı yapıda erkek hücre taşıyan çiçek tozlarıdır. (Anonim, 2006). Arı ekmeği (perga), bal arılarının topladıkları polenleri kovanda peteklerde depolayıp, kendi enzimleriyle fermente ederek oluşturduğu bir üründür (Akhmetova vd. 2012; Connor and Muir, 2013).

Normal polenden farklı olarak, arıların enzimatik işlemleriyle fermente olan bu polen, besin bileşenlerini dönüştürür ve yaklaşık iki hafta içinde fermente olarak olgunlaşır (Vasquez and Olofsson, 2009; Connor and Muir, 2013). Bu süreç sonucunda arı ekmeği, ham polenle kıyaslandığında daha düşük protein içeriğine sahip olurken, daha fazla laktik asit içerir.

Arı ekmeği, vitaminler, mineraller ve iz elementler bakımından oldukça zengin bir içeriğe sahiptir. İçerdiği besin bileşenleri ve fenolik bileşikler sayesinde, arı ekmeği, normal polenden daha değerli bir besin olarak kabul edilir (Connor and Muir, 2013; Basualdo vd. 2014). Bunun yanı sıra, üreme hormonlarını destekleyici etkisi nedeniyle cinsel gücü artırıcı ve kas gücünü artırmaya yardımcı bir takviye olarak kullanılmaktadır. İçeriğindeki asetilkolin, tansiyon düzenleyici özelliklere sahip olup, kronik kabızlık tedavisinde de etkili bir yardımcıdır (Nagai vd. 2004; Aydın vd 2017; Kowalski vd. 2017).



Şekil 2.3. Arı Ekmeği

2.1.5. Polen

Polen, tohumlu bitkilerin çiçeklerinin erkek üreme organlarında meydana gelen, arılar tarafından bitkilerden toplanır. Arılar, bu çiçek tozlarını vücutlarında

biriktirerek kendi salgılarıyla bir araya getirip sıkıştırır ve böylece arı poleni olarak adlandırılan bir ürün ortaya çıkar. Kovana getirilen bu arı poleni, besin değeri açısından dünyanın en değerli ürünlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Arılar için dışarıdan sağlanan yegâne protein kaynağı olması nedeniyle polen, arıların beslenmesi, sağlığı ve gelişimi üzerinde kritik bir role sahiptir. Polen, yapısında temel amin asitler, yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar, makro ve mikro elementler, vitaminler, polifenoller, fosfolipitler, peptitler ve organik asitler gibi çeşitli bileşenleri barındırmaktadır (İzol vd. 2025b; Sönmez vd 2023).



Şekil 2.4. Polen

Bal arıları, ihtiyaçlarını gidermek üzere bitkilerden polen ve nektar toplarken, aynı zamanda bu bitkilerin tozlaşmasına da aracılık ederler. Arılar çiçeklerden nektar alımı yaparken, vücutlarındaki tüylere yapışan polen tanecikleri, orta bacaklarında bulunan özel bir yapı sayesinde toplanır. Toplanan bu polenler, arının ağzından salgılanan bal ile nemlendirilerek arka bacaklarında yer alan polen sepetçiklerinde biriktirilir (Tutkun, 2011; İzol vd. 2024). Arılar, arka bacaklarında topladıkları polenleri, bu bacaklarında bulunan fırça ve tarak benzeri özelleşmiş yapılar ve bacaklarını birbirine sürterek polen sepetine yerleştirme işlemini uçuş halindeyken dahi devam ettirebilirler. Uçuşa başlayan bir arı, kovana sadece polen yüküyle dönebileceği gibi hem polen hem de nektar taşıyarak da geri gelebilir. Kovana ulaştıklarında ise, topladıkları polen taneciklerini petek hücrelerinin içine bırakırlar. Polen, sepetçiğe doldurulduktan sonra, arılar tarafından bozulmasını önlemek amacıyla ince bir bal ve balmumu katmanıyla örtülür. Arıların büyüme ve gelişim

süreçlerini tamamlayabilmeleri için elzem olan polen, özellikle salgı bezlerinin gelişmesinde temel rol oynayan bir protein kaynağıdır (Sorkun vd 2001).

2.1.6. Arı Sütü

Arı sütü, kraliçe arıyı ve arı larvalarını beslemek amacıyla, beş ila on beş günlük genç işçi arıların boğaz ve üst çene bölgelerindeki özel salgı bezlerinde (hipofaringeal ve mandibular bezler) üretilen doğal bir arı ürünüdür. Arı sütünün temel bileşenleri incelendiğinde, büyük oranda su, karbonhidratlar ve proteinlerden oluştuğu görülmektedir. Asidik bir karakteristiğe sahip olan arı sütünün pH değeri 3,6 ile 4,2 aralığındadır (İzol ve Çağlayan, 2023; Erzincan vd. 2025).

Sağlıklı yaşam arayışı, dünya çapında hastalıkların tedavi ve önlenmesinde doğal yöntemlerin tercih edilmesi, metabolizmayı destekleyen takviye gıdaların kullanılması ve kaliteli beslenmeye verilen önemin artmasıyla kendini göstermektedir. Yüzyıllardır kullanılan arı ürünlerinden biri olan arı sütü, son yıllarda bu ilgiye dahil olmuş ve sağlık alanındaki yararlarıyla dikkat çekmiştir. Arı sütü, hem insan hastalıklarının tedavisinde hem de hayvan sağlığında büyüme düzenleyici olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu besleyici madde, kraliçe arının hayatı boyunca, yumurta evresinden ölümüne kadar beslenmesinde kullanılırken, aynı zamanda yumurta ve genç larvaların gelişimi için de gereklidir (İnci, 1999; Tutkun, 2006).



Şekil 2.5. Arı Sütü (Royal Jelly)

Arı sütü, insan sağlığı üzerinde çeşitli önemli etkileri bulunan değerli bir fonksiyonel besindir. İşçi arılar tarafından alt çene ve boğaz bölgelerindeki bezlerden salgılanan bu arı ürünü, antibakteriyel, iltihap karşıtı, kan damarlarını genişletici ve kan basıncını düzenleyici, antioksidan, yüksek kolesterolü önleyici ve tümör

oluşumunu engelleyici gibi belirgin fonksiyonel özelliklere sahip olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Arı sütünün bu biyolojik aktiviteleri, içeriğinde bulunan yağ asitleri, proteinler ve fenolik bileşenlerden ileri gelmektedir (Artık ve Konar, 2018a, 2018b).

Arı sütü, kayda değer düzeyde besin içeriğine sahip bir doğal üründür. Beş ila on beş günlük genç işçi arılar tarafından hipofaringeal bezlerden salgılanan bu madde, kraliçe arının dişi yumurtalarının gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli kullanım alanlarına sahip olan arı sütü, özellikle çocukların sağlıklı gelişimini desteklemek ve yaşlı bireylerde genel sağlık koşullarını iyileştirerek yaşam süresini uzatmaya yardımcı olmak amacıyla değerlendirilebilmektedir (Silici, 2018).

2.1.7. Beyaz Bal

Beyaz bal, çeşitleri arasında nadir bulunan ve oldukça değerli bir bal türüdür. Diğer ballara göre çok daha hafif bir aromaya ve beyaz renge sahip olmasıyla dikkat çeker. Beyaz bal, peteğinden elde edilen ve genellikle yüksek rakımlı bölgelerde yetişen özel çiçeklerin nektarından elde edilen bu bal, benzersiz bir üretim sürecinden geçer. Beyaz bal, arıların topladığı özel çiçek nektarlarının kovan içerisinde doğal bir fermentasyon sürecine girmesiyle elde edilir. Çiçeklerden alınan nektar, kovanlarda depolanarak arılar tarafından işlenir. Beyaz balın renginin beyaz olmasının nedeni, bu çiçeklerin içeriğinde bulunan belirli enzimlerdir. Bu balın yapım süreci, diğer ballara göre daha zahmetli ve uzun bir süreç gerektirir. Özellikle yüksek rakımlı bölgelerde yapılan üretim, balın lezzetini ve kalitesini artırır (Karakaya ve Yılmaz, 2020).



Şekil 2.6. Beyaz Bal

Beyaz bal petekten süzildükten sonra bir süre bekletilir. Bu süreçte balın içindeki polenler yapısal olarak yoğunlaşır. Yoğunlaşma sonucunda bal, polen türüne

ve miktarına da bağılı olarak beyaz bal halini alır. Süzme balın içindeki polen miktarı ne kadar fazlaysa bal da o kadar beyazlaşır. (Dağ vd 2020).

2.2. Enzimler

Enzimler, özel bir substrat molekülüne bağlanarak ve onunla etkileşime girerek kimyasal reaksiyon hızını artıran, % 100 verim sağlayan, hiçbir yan ürün oluşturmayan biyolojik katalizörlerdir. Ribozimler hariç büyük bölümü protein yapısındadır. Enzim substrat etkileşimi, substratın enzimin aktif bölgesine bağlanmasıyla gerçekleşir. Enzimler, çoğu zaman belirli bir substrat türüne spesifik olarak çalışmaktadır. İstisnalar hariç, canlı sistemlerdeki tüm kimyasal tepkimeler enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (Yapıcı ve İzol, 2023).

Enzimlerin katalitik işlev gören bölgesi, polipeptit zincirinden oluşan protein kısmıdır. Ancak, pek çok enzim etkili bir şekilde çalışabilmek için sadece protein yapısıyla sınırlı kalmayıp, farklı yardımcı moleküllere de ihtiyaç duyar. Bu yardımcı moleküller, metal iyonları, protein dışı organik bileşikler veya her ikisini içerebilir. Yardımcı molekül eğer metal iyonu ise kofaktör eğer organik molekül ise koenzim olarak adlandırılır.

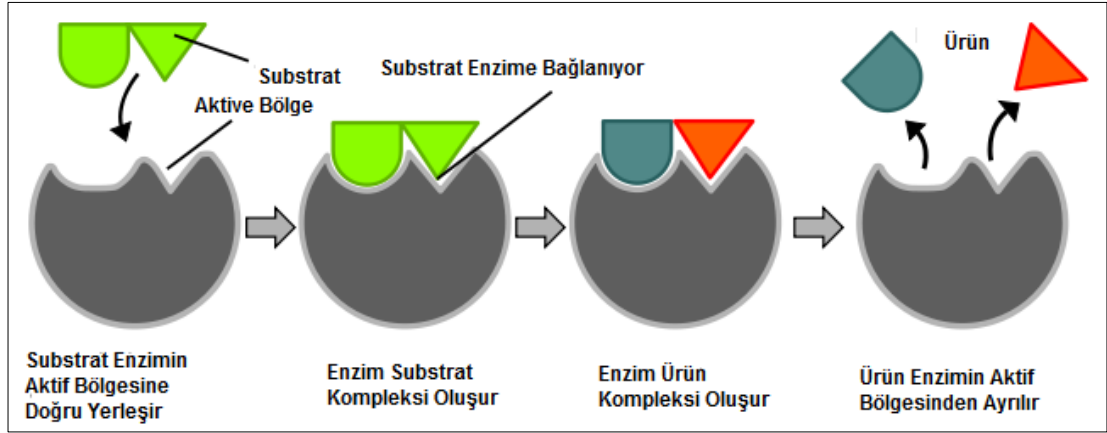
Koenzim enzimin aktif bölgesine sıkı bir şekilde bağlanmış ise “prostetik grup” olarak adlandırılır. Enzimin protein kısmı olan apoenzim, bir koenzim ile birleştiğinde “holoenzim” adını alır ve bu bütünlük enzimatik aktivitenin gerçekleşmesi için gereklidir.

Koenzimlerin yapısında genellikle vitaminlerin aktif formları bulunur. Bu nedenle, vitaminler organizma açısından büyük önem taşır; çünkü metabolik olayların enzimler aracılığıyla düzenlenmesine katkı sağlarlar (Lehninger, 1993; Keha ve Küfrevioğlu, 2005; Berg vd. 2013).

Enzimlerin önemi şu şekilde özetlenebilir;

- **Hızlandırıcılar:** Enzimler, biyolojik reaksiyon hızını artırarak hücresel süreçleri daha etkili hale getirmektedir.

- **Spesifiklik:** Her enzim, belirli bir substrat veya substrat grubu ile spesifik bir etkileşime girer, bu da biyolojik süreçlerin düzenlenmesine katkı sağlamaktadır.
- **Regülasyon:** Enzimler, hücrel aktiviterin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. İhtiyaç duyulan anlarda aktive olmakta ve gereksiz durumlarda inhibe olabilmektedir.
- **Enerji Üretimi:** Enzimler, hücrelerde enerji üretiminde (örneğin, glikoliz, Krebs döngüsü) kritik bir rol oynamaktadır.
- **DNA Replikasyonu ve Protein Sentezi:** Enzimler, DNA replikasyonu, transkripsiyon ve translasyon gibi genetik materyal üzerindeki süreçleri düzenlemektedir.
- **Bağışıklık Sistemi:** Bağışıklık sistemine dahil olan enzimler, mikroorganizmalarla savaşarak vücudu koruma görevini yerine getirmektedir. Bu nedenlerden dolayı enzimler, yaşamın temel süreçlerini düzenlemede kritik bir rol oynamakta ve biyolojik sistemlerin işleyişini mümkün kılmaktadır (Keha ve Küfrevioğlu, 2014). Enzimlerin substrat ile etkileşimi üzerine iki farklı model önerilmiştir. İlk model, 1894 yılında Emil Fischer tarafından öne sürülen "anahtar-kilit" modelidir. Bu modelde, enzimin aktif bölgesi, substratla birebir uyumlu bir şekilde şekil alır ve substrat, tıpkı bir anahtarın kilite girmesi gibi enzime bağlanır. Yani, substrat enzimin aktif bölgesine tam olarak uyum sağlayacak şekilde "şekil" alır, tıpkı doğru anahtarın doğru kilidi açması gibi. Bir diğer model ise, 1958'de Daniel Koshland tarafından geliştirilen "indüklenmiş uyum" modelidir. Bu modelde, enzim başlangıçta substratla bağlanmadan serbest bir durumda bulunur. Ancak substrat, enzimin aktif bölgesine bağlandığında enzim yapısal olarak değişir ve substratla daha uyumlu hale gelir. Yani enzim, substratın bağlanmasıyla aktif bölgesinde şekil değiştirir ve bu şekilde, substratla daha etkin bir şekilde etkileşir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, enzim eski haline geri döner ve substratla olan bağlantısı sona erer (Nelson ve Cox, 2004; Megep, 2006).



Şekil 2.7. Enzim ile substrat arasında Anahtar-Kilit Modeli (Göçer, 2014)

2.2.1 Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (AChE; E.C.3.1.1.7), sinir ucu üzerinde biriken kimyasal maddeleri parçalayarak bunları uzaklaştırır. Bu mekanizma, bir bakıma ortamı temizler ve sinir iletimi için gerekli olan alanı açar. Böylece, elektron taşıyıcılarının engellenmeden işlevini sürdürmesi sağlanır ve sinir iletimi kesintiye uğramaz (Göçer vd. 2013)

Alzheimer hastalığı, son yıllarda yaygınlığı artan ve nörodejeneratif bir rahatsızlık olarak bilinen bir demans türüdür. Bu hastalık, hafıza kaybı ve bilişsel işlev bozukluklarıyla karakterizedir. Beyindeki asetilkolin seviyelerinin azalması, Alzheimer hastalığının en belirgin biyokimyasal değişikliklerinden biri olarak kabul edilmektedir (Akıncıoğlu vd. 2013).

Alzheimer hastalığı, demansın bir türü olup, hafıza kaybı, algılama güçlüğü, konuşma bozuklukları, yargılama yetisinin azalması, soyut düşünme ve problem çözme becerilerinde gerileme gibi belirtilerle karakterizedir (Şahin and Yazıcı, 2007). Günümüzde Alzheimer hastalığını tamamen ortadan kaldıran kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Mevcut tedaviler, hastalığın semptomlarını hafifletmeye yöneliktir. Bu amaçla yaygın olarak AChE inhibitörleri, özellikle Donepezil ve Rivastigmin kullanılmaktadır (Göçer vd. 2013). Ancak, yapılan araştırmalar bu ilaçların hepatotoksisite ve gastrointestinal rahatsızlıklar gibi yan etkilere yol açabileceğini göstermektedir. Bu sebeple, son yıllarda daha güvenli ve etkili alternatif tedavi

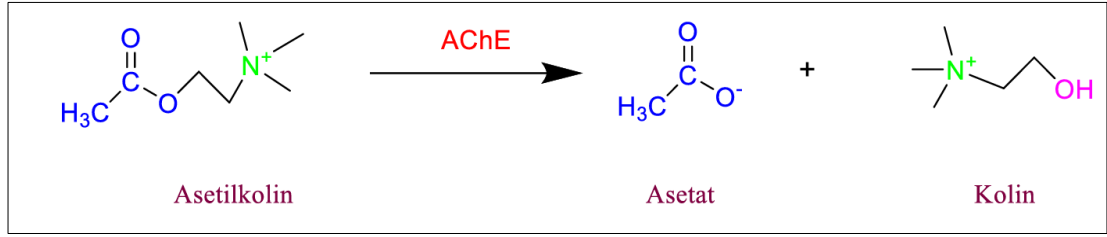
arayışları artmış ve özellikle doğal kaynaklı AChE inhibitörleri ön plana çıkmıştır (Akıncıoğlu vd. 2013).

Aminotetralin türevlerinin dopaminerjik, serotonerjik ve adrenerjik sistemler üzerinde biyolojik aktivite gösterdiği bilinmektedir (Akıncıoğlu vd. 2013). Ayrıca, birçok herbisit ve pestisit de AChE inhibitörü olarak işlev görmektedir. AChE, sinir hücrelerinin sağlıklı bir şekilde çalışabilmesi için asetilkolini asetat ve koline parçalayarak sinaptik iletişimi düzenleyen bir enzimdir. Diğer birçok nörotransmitterin aksine, asetilkolin parçalanarak uzaklaştırılır; serotonin, dopamin ve norepinefrin gibi nörotransmitterler ise sinaptik boşluk tarafından geri emilir. Hem tıp alanında hem de tarım sektöründe çeşitli AChE inhibitörleri kullanılmaktadır. Ancak, bu inhibitörlerin olası yan etkileri nedeniyle, doğal bileşiklerden elde edilen yeni ve güvenli alternatiflere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Akıncıoğlu vd. 2013).

AChE glikoprotein yapısına sahip bir enzimdir ve vücutta beyin, sinir hücreleri, kas dokusu ile eritrositlerde bulunur. Bu enzim, özellikle beyinde yüksek konsantrasyona sahiptir. AChE, glikoprotein olduğu için, yapısında N-bağlı oligosakkaritler bulunur. Bu tür bağlanma genellikle proteinin asparagin (Asn) kalıntısındaki amino gruplarına olur. Bağlı olan şekerler genel olarak şunlardır;

- N-asetilglukozamin
- Mannoz
- Galaktoz
- N-asetilneuraminik asit
- Fukoz

Sinaptik boşluklarda, asetilkolin moleküllerini kolin ve asetat bileşiklerine parçalayarak, sinir uçlarında biriken kimyasal bileşenlerin temizlenmesinde rol oynar (Gülçin vd. 2019). Asetilkolinesteraz (AChE), doğal bir nörotransmitter olan asetilkolini (ACh) hızla asetik asit ve koline dönüştürerek ya da hidrolize ederek etkisini sonlandırır. AChE'nin ana işlevi, asetilkolinin sinapslar arasındaki yayılmasını ve yakınlardaki reseptörleri uyarma etkisini engelleyerek nöronal iletimi ve sinyalleme sonlandırmaktır. Ayrıca, AChE, organofosfatlar gibi bileşikler tarafından inhibe edilebilir ve bu özellik, pestisitler ve sinir ajanları için önemli bir hedef haline getirir (McHardy vd. 2017; Halis, 2021).



Şekil 2.8. Asetilkolinesteraz Enzimi kataliz mekanizması (İzol, 2023)

AChE, nörotransmitter asetilkolini hidrolize ederek, sinaptik iletimin sonlanmasını sağlayan bir enzimdir. AChE'nin biyolojik aktiviteleri, merkezi sinir sistemi (CNS), nöromusküler kavşaklar ve diğer birçok biyolojik süreçte önemli roller oynamaktadır (Massoulie vd. 1993).

AChE inhibitörleri, AChE enzimini inhibe ederek, asetilkolinin sinaptik boşluklarda birikmesini ve nörotransmitterin etkinliğinin uzun süre devam etmesini sağlar. Bu, özellikle nörolojik hastalıkların tedavisinde önemli bir tedavi stratejisidir. AChE inhibitörleri, Alzheimer hastalığı, myastenia gravis gibi hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Cummings, 2004).

2.2.2. Bütirilkolinesteraz (BChE)

Bütirilkolinesteraz (BChE; EC 3.1.1.8), aynı zamanda psödokolinesteraz olarak bilinen bir enzimdir. Kolinesteraz ailesinin bir üyesi olan bu enzim, esas olarak karaciğer ve diğer bazı dokularda üretilir. En temel işlevi, sinir sisteminde kritik rol oynayan bazı kimyasal bileşiklerin (asetilkolin ve bütirilkolin gibi) parçalanmasını sağlayarak nörolojik işlevlerin düzenlenmesidir. Bu sayede, sinir hücreleri arasındaki iletişim uygun bir şekilde sonlandırılır ve nörotransmitterlerin aşırı birikmesi engellenir. Ayrıca, organofosfatlar gibi toksik bileşiklere karşı vücuda koruma sağlama işlevi de vardır. Bazı ilaçlar, sinirsel iletimi etkileyerek belirli terapötik etkiler yaratmak amacıyla bu enzimleri hedef alır. Örneğin, kolinesteraz inhibitörleri, Alzheimer hastalığı gibi nörolojik bozuklukların tedavisinde kullanılır. Bu ilaçlar, BChE'nin etkinliğini engelleyerek asetilkolin seviyelerinin artmasını sağlar. Artan asetilkolin, sinirsel iletimin daha verimli bir şekilde gerçekleşmesine yardımcı olur ve böylece Alzheimer hastalığı gibi durumlarda bilişsel işlevlerin iyileşmesine katkı sağlar (Massoulie vd. 1993)

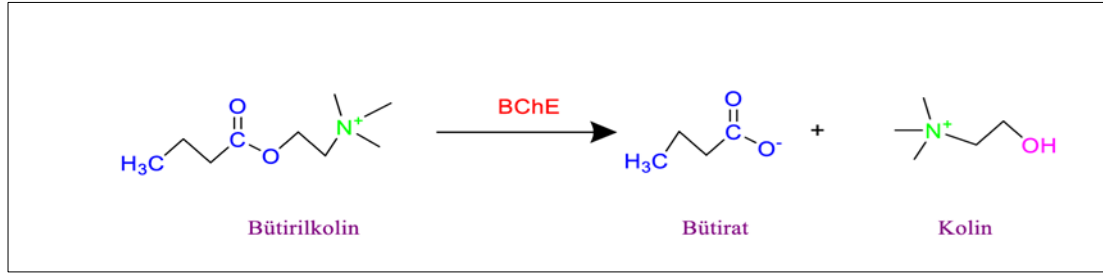
BChE, karmaşık yapılı, dört alt birimden oluşan (tetramerik) bir glikoproteindir ve yaklaşık 342 kDa'dır. Bu enzim, vücudumuzun çeşitli dokularında, özellikle beyin, kalp, kaslar, akciğerler, ince bağırsak ve yağ dokusunda bulunur (Barta vd. 2001). BChE, plazmada ve çeşitli dokularda bulunan bir serin esterazdır ve karaciğer bu enzimin başlıca üretim yeridir. Karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır ve plazmada bulunur. Ayrıca BChE, pankreas ve bazı diğer dokularda da daha düşük seviyelerde sentezlenebilir (Furtado-Alle vd. 2023).

BChE'nin temel işlevi, bütirilkolini bütirat ve kolin'e parçalamaktır. Ancak, bu enzimin fonksiyonları bununla sınırlı değildir. Asetilkolini de hidrolize edebildiği ve toksik maddeleri etkisiz hale getirme (detoksifikasyon) kapasitesine sahip olduğu da bilinmektedir (Masson vd. 2010)

BChE ve AChE, kolinerjik sistemin düzenlenmesinde birlikte rol oynayan iki önemli enzimdir. Kolinerjik sistem, sinir iletiminde önemli bir rol oynar. Her iki enzim de bu sistemin dengelenmesinde kritik öneme sahip olsa da, AChE'nin rolü daha detaylı bir şekilde araştırılmış ve anlaşılmıştır. BChE'nin işlevleri ise hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Saxena vd.2025).

AChE ve BChE enzimleri, yapı olarak birbirine çok benzerler, Bu benzerlik, her iki enzimi hedefleyen ilaç geliştirme çalışmalarında zorluk teşkil etmektedir. Bu benzerlik, her iki enzimi de inhibe etmeyi amaçlayan ilaçların geliştirilmesinde spesifiklik sorunlarına yol açar, çünkü genellikle her iki enzimi de etkileyebilecek ilaçlar, tedaviye dair istenmeyen yan etkiler yaratabilir (Gülçin vd. 2020).

BChE, esas olarak asetilkolin ve bütirilkolin gibi nörotransmitterleri hidrolize eder. Bu süreç, sinir hücresindeki uyarıların sona ermesini ve nörolojik yanıtların düzgün bir şekilde düzenlenmesini sağlar. Özellikle, sinir hücrelerinin birbirine ilettiği elektriksel sinyallerin sonlanması için bu nörotransmitterlerin hızlıca yıkılması önemlidir. Aksi takdirde, sinirsel iletim aşırı uyarı ve kontrolsüz bir şekilde devam eder ve bu durum nörolojik bozukluklara, kas spazmlarına veya felç gibi ciddi sorunlara yol açabilir (Gibbs vd. 2013; Soreq and Seidman, 2001; Lockridge, 2004).



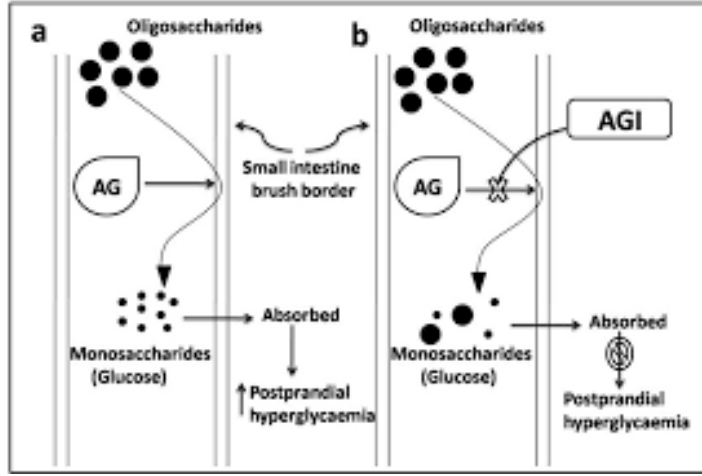
BChE, AChE ile birlikte merkezi sinir sisteminde önemli roller üstlenen bir enzimdir. BChE, özellikle Alzheimer hastalığının ilerleyen evrelerinde AChE'den daha aktif hale gelerek, asetilkolin düzeylerinin korunmasında kritik bir rol oynar (Greig vd. 2002). Bu nedenle, BChE inhibitörleri, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır.

AChE inhibitörleri genellikle erken evre Alzheimer hastalığında daha etkili olurken, BChE inhibitörleri hastalığın ilerleyen aşamalarında daha aktif hale gelir. Bu nedenle, kombine AChE ve BChE inhibitörleri daha kapsamlı bir tedavi yaklaşımı sunabilir (Darvesh vd. 2003).

2.2.3. α -Glikozidaz

İnsanların yaşam tarzındaki değişikliklerle birlikte diyabet, kanser, kalp damar hastalıkları ve beyin damar hastalıkları gibi sağlık sorunları giderek daha yaygın hale gelmiş ve bu durum, insan sağlığı üzerinde ciddi tehditler oluşturmuştur. Ağız yoluyla alınan ilaçlardan biri olan α -glikozidaz inhibitörleri, bu hastalıkların önlenmesi ve yönetilmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu bağlamda, daha güvenli ve etkili α -Glikozidaz inhibitör peptitlerinin keşfi, α -glikozidaz ile bu inhibitör peptitler arasındaki etkileşim mekanizmasını anlamak açısından oldukça önemli hale gelmektedir. α -Glikozidaz inhibitör peptitlerinin, ince bağırsak mukozasında α -Glikozidaz aktivitesini inhibe ederek ana etki mekanizmalarını gerçekleştirdiğini göstermektedir (Li vd. 2023; Chen vd. 2020; Wang vd. 2024; Zhang vd. 2025).

Biyoaktif peptitler, esas olarak oligosakkaritler ve enzimlerle bağlanarak rekabetçi inhibisyon oluşturur. Bu peptitler, enzimin katalitik bölgesindeki amino asitleri, hidrofobik etkiler, hidrojen bağları ve van der Waals kuvvetleri aracılığıyla modüle ederek, enzimin katalitik aktivitesini engeller ve böylece glikoz alımını azaltır (Karimi vd. 2020).



Şekil 2.9. α -glukozidaz inhibitörlerinin etki prensibi AG: α -glukozidaz AGI: α -glukozidaz inhibitörü (Prasad Patil vd. 2015)

Şekil 2. 10'da verilen görsel gösteriyor ki; **a** α -glukozidaz normal şartlarda, karbonhidratları parçalayarak glukozu dönüştürür ve böylece karbonhidratların sindirimi ve emilimi gerçekleştirirken, **b** α -glukozidaz inhibitörü (AGI), enzimin aktivitesini engeller veya azaltır. Bu durumda karbonhidratların parçalanması yavaşlar veya durur, bu da glukoz emiliminin azalmasına ve kan şekeri seviyelerinin kontrolüne yardımcı olur (Prasad Patil vd. 2015).

Diyabet, kandaki glukoz seviyelerinin anormal derecede yükseldiği ve bu durumun metabolizmayı olumsuz etkileyerek çeşitli sağlık sorunlarına yol açtığı bir hastalıktır. Günümüzde en yaygın görülen hastalıklardan biri olan diyabetin temelinde hiperglisemi yatmaktadır; yani kandaki şeker oranının yükselmesi durumu. Hiperglisemi, kan glukoz miktarının yükselmesinin ardından mitokondrilerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini tetikleyerek hücresel düzeyde oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olur. Bu da mitokondriyal işlev bozukluklarına yol açar. Oksidan maddeler ve oksidatif stres, diyabetin gelişiminde önemli rol oynayan faktörler arasında yer almaktadır (Brownlee, 2001; Baynes and Thorpe, 1999).

Kandaki karbonhidrat konsantrasyonunun artışını önlemek amacıyla, α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerinin aktivitelerinin azalması gerekmektedir. Bu sebeple, diyabet tedavisinde bu enzimlerin inhibe edilmesi, hastalığın kontrol altına alınmasında etkili bir yöntem olarak uygulanmaktadır. Bu tedavi yaklaşımı, hem

diyabetin hem de hipergliseminin yönetilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (İzol ve Yapıcı, 2023; Gülçin vd. 2019).

Glikozidazlar, karbonhidratların sindiriminde önemli rol oynayan enzimlerdir. α -Glikozidaz ve β -Glikozidaz gibi enzimler, kompleks karbonhidratları ve disakkaritleri glikoz gibi basit şekerlere parçalayarak kan şekerinin yükselmesine neden olur. Glikozidaz inhibitörleri ise bu enzimleri inhibe ederek karbonhidratların sindirimini yavaşlatır ve postprandiyal (yemek sonrası) hiperglisemiye kontrol altına alır (Van de Laar, 2008).

α -glikozidaz inhibitörleri, ince bağırsakta bulunan α -glikozidaz enzimini inhibe ederek karbonhidratların emilimini geciktirir. Bu sayede, özellikle diyabet hastalarında kan şekeri kontrolüne yardımcı olur.

2.3. Fenolik Bileşikler

Fenolik Bileşikler, bitkilerde doğal olarak bulunan ve geniş bir biyolojik aktivite yelpazesine sahip bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkilerin savunma mekanizmalarına yardımcı olurlar ve aynı zamanda antioksidan özellikleri ile sağlık üzerinde olumlu etkilere sahiptirler. Fenolik bileşikler, iki ana grupta incelenebilir: flavonoidler ve non-flavonoidler. Flavonoidler, bitkilerde bolca bulunan ve sağlık açısından pek çok yarar sağlayan bileşiklerdir. Non-flavonoidler arasında ise fenolik asitler, stilbenler, lignanlar ve tanenler gibi moleküller bulunur (Shahidi and Ambigaipalan, 2015).

Fenolik bileşikler, yapılarında bir veya daha fazla hidroksil (-OH) grubu taşıyan aromatik halkalar içeren organik moleküllerdir. Bitkiler tarafından ikincil metabolitler olarak üretilirler ve güçlü antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikanser özelliklere sahip oldukları bilinmektedir (Manach vd. 2004). Bu bileşikler, bitkilerin kendilerini çevresel tehditlere karşı koruma mekanizmasının bir parçasıdır. Ultraviyole ışınlar, patojen saldırıları ve çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı bitkilerde savunma amacıyla sentezlenirler (Cheynier, 2012).

2.3.1. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Fenolik bileşikler, sahip oldukları yapısal özelliklere göre farklı gruplara ayrılmaktadır: Fenolik bileşikler, bitkilerde yaygın olarak bulunan, bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip aromatik halkalardan oluşan sekonder metabolitlerdir. Bu bileşikler, yapısal özelliklerine göre çeşitli alt gruplara ayrılır:

Basit fenoller; fenol, katekol ve hidrokinon gibi temel yapı taşlarından oluşur. Bu bileşikler birçok bitkide doğal olarak bulunur ve özellikle antioksidan ve antibakteriyel özellikleri ile bilinir (Balasundram vd. 2006).

Fenolik asitler; iki ana türe ayrılır:

- **Hidroksibenzoik Asit Türevleri:** Gallik asit, vanilik asit ve protokatekuik asit gibi bileşikler içerir.
- **Hidroksisinamik Asit Türevleri:** Kafeik asit, ferulik asit ve kumarik asit bu gruba dahildir. Bu bileşikler, özellikle meyveler, sebzeler ve tahıllarda yaygın olarak bulunmakta olup, güçlü antioksidan etkiler göstermektedir (Shahidi and Naczki, 2004).
- **Flavonoidler,** doğada en yaygın bulunan fenolik bileşikler arasında yer alır ve çeşitli alt sınıflara ayrılır.

Bunlar arasında flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, antosiyaninler ve flavanoller bulunur;

Flavonlar: Flavonoid grubunun önemli bir alt sınıfıdır. Bitkilerde sarı renk oluşumunda rol oynayan flavonlar, çevresel streslere karşı koruyucu görev üstlenen sekonder metabolitlerdir. İlk olarak 1930'lu yıllarda "vitamin P" olarak adlandırılmışlardır. Günümüzde ise antioksidan, antienflamatuar ve kardiyoprotektif etkileri nedeniyle geniş çapta araştırılmaktadır (Harborne and Williams, 2000). Flavonlar, temel Flavonlar, temel olarak 2-fenilokromen-4-on iskeletine sahiptir ve C₆-C₃-C₆ karbon iskeleti gösterir. İki aromatik halka (A ve B) ile bir heterosiklik C halkası içerir. Apigenin, luteolin, chrysin ve baicalein bu gruba dahil olan temel flavonlardır (Panche vd. 2016).

Flavonoller: Flavonoller, flavonoidlerin önemli bir alt grubudur ve bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerdir. Güçlü antioksidan özelliklerinin yanı sıra, UV koruması, patojenlere karşı direnç ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle dikkat çekmektedirler. Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve sekonder metabolitler arasında yer alan fenolik bileşiklerdir. Flavonoller, bu grubun en yaygın ve en fazla araştırılmış alt sınıflarından biridir. Hem bitki gelişimi hem de insan sağlığı açısından önemli biyolojik işlevlere sahiptirler (Kumar and Pandey, 2013).

Flavanonlar: Flavanonlar, flavonoidlerin temel alt sınıflarından biridir ve birçok bitkisel gıdada doğal olarak bulunur. Karakteristik kimyasal yapıları, biyosentez yolları ve önemli biyolojik aktiviteleri sayesinde hem bitki fizyolojisinde hem de insan sağlığında önemli roller üstlenirler. Flavonoidler, bitkilerde sekonder metabolit olarak bulunan ve özellikle çevresel streslere karşı koruyucu görevler üstlenen polifenolik bileşiklerdir. Flavanonlar ise bu grupta flavon ve flavonollere göre daha doymuş bir yapıya sahip olan bileşiklerdir ve turunçgiller gibi meyvelerde bolca bulunur (Ross and Kasum, 2002).

İzoflavonlar: İzoflavonlar, flavonoid sınıfına ait, özellikle baklagillerde yoğun olarak bulunan fenolik bileşiklerdir. Fitoöstrojenik yapıları sayesinde hem bitki hem de insan sağlığı açısından önemli biyolojik etkilere sahiptirler. İzoflavonlar, özellikle baklagiller (*Fabaceae*) ailesine ait bitkilerde bulunan, flavonoid türevi bileşiklerdir. Fitoöstrojen olarak görev yapabilmeleri, yani insan vücudundaki östrojen reseptörlerine bağlanarak hormon benzeri etki gösterebilmeleri, bu bileşiklere olan ilgiyi artırmıştır (Messina, 1999).

Antosiyaninler: Antosiyaninler, flavonoid sınıfına ait suya çözünür pigmentlerdir ve bitkilere kırmızı, mor ve mavi renkleri kazandırır. Aynı zamanda antioksidan özellikleri ve potansiyel sağlık faydaları nedeniyle hem bitki hem de insan biyolojisi açısından önemlidirler. Antosiyaninler, özellikle meyve, sebze, çiçek ve yaprak gibi bitki kısımlarında renk verici bileşikler olarak bulunurlar. Bu renklenme, hayvanları cezbetmek (tozlaşma, tohum yayma) ve çevresel streslere karşı koruma sağlamak gibi önemli biyolojik işlevlere sahiptir (Gould vd. 2009).

Lignanlar: Özellikle keten tohumu ve susam gibi bitkilerde bulunan lignanlar, östrojen benzeri etkilere sahiptir. Antioksidan özellikleri sayesinde kanser riskini azaltıcı etkileri olduğu bilinmektedir (Adlercreutz, 2007).

Stilbenler: Bu grubun en bilinen bileşiği resveratroidir. Kırmızı şarap, üzüm kabuğu ve fındık gibi besinlerde bulunur. Özellikle kalp sağlığını destekleyici etkileri ile bilinmektedir (Burns vd. 2002). Bilindiği üzere fenolik bileşiklerin insan sağlığı üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır (Gülçin, 2012). Fenolik bileşikler, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücre hasarını önler. Bu özellikleri sayesinde yaşlanma sürecini yavaşlattıkları ve çeşitli kronik hastalıklara karşı koruma sağladıkları belirlenmiştir (Rice-Evans vd. 1997).

2.3.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, vücudun çevresel ve diğer streslere tepki olarak ürettiği “kararsız radikal moleküller” olarak nitelendirilen serbest radikallerin hücrelere verdiği zararı önleyebilen ve yavaşlatabilen bileşiklerdir. Antioksidanların, serbest radikallere karşı bir nevi savaşçı olduğu söylenebilir. Antioksidanlar, serbest radikallerle etkileşime girerek hücre hasarını önleyen ve vücudu oksidatif strese karşı koruyan bileşiklerdir. Serbest radikallerin hücresel yapıları bozarak yaşlanma sürecini hızlandırdığı ve çeşitli hastalıkların gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Antioksidanların, bu zararlı etkileri azaltarak hücrelerin bütünlüğünü koruduğu ve yaşlanmayı geciktirdiği ifade edilmiştir (Gülçin, 2020; Pizzino vd. 2017).

Antioksidanlar doğal olabileceği gibi yapay da olabilir. Bitkisel besinlerin antioksidan açısından daha zengin olduğu bilinir. Vücut tarafından üretilen antioksidanlara endojen, dışarıdan aldıklarımıza eksojen antioksidan denir. Vücutta serbest radikallerin artmasına neden olan bazı etmenler bulunur. İç kaynaklı sebeplerden biri iltihaplanmadır. Dış sebepler arasında çevre kirliliği, ultraviyole ışınlarına maruz kalma, sigara dumanı sayılabilir. Serbest radikallerin yarattığı oksidatif stres; kalp krizi, kanser, solunum hastalıkları, artrit, felç, immün sistemi hastalıkları, amfizem, Parkinson, inflamatuvar ve diğer iskemik hastalıklarla bağlantılıdır. Antioksidanların, kalp hastalıkları, kanser, diyabet ve Alzheimer gibi kronik hastalıkların önlenmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresin bu

hastalıkların gelişiminde rol oynadığı ve antioksidanların bu süreci dengeleyerek hastalık riskini azalttığı belirtilmiştir ((Halliwell and Gutteridge, 2015; Apak vd. 2004; İzol, 2025). Antioksidanların, bu serbest radikalleri nötralize etmeye yardımcı olarak genel sağlığa fayda sağladığı bilinir (Apak vd. 2004). Bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi açısından da antioksidanlar önemli bir rol oynar. Enfeksiyonlara karşı vücudun savunmasını artırdığı ve bağışıklık sisteminin daha etkili çalışmasına katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Gombart vd. 2020). Ayrıca, antioksidanların cilt sağlığı üzerindeki olumlu etkileri de dikkat çekicidir. Çevresel faktörlerin ve UV ışınlarının cilt hücrelerine verdiği zararı azaltarak cilt yaşlanmasını geciktirdiği ve genel cilt sağlığını desteklediği ifade edilmiştir (Poljšak vd. 2011).

2.4. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, vücutta metabolik süreçler sırasında oluşan ve hücrelere zarar verebilecek reaktif oksijen türleri (ROS) ya da reaktif azot türleri (RNS) olarak bilinen moleküllerdir. Bu radikaller, hücre DNA'sına, proteinlere ve lipidlere zarar vererek hücresel yaşlanma, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok sağlık sorununa yol açabilir (Molan, 2001).

ROS, vücudumuzda çeşitli savunma mekanizmaları tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Bu mekanizmalar arasında süperoksit dismutaz ve katalaz gibi spesifik enzim sistemleri ile ürik asit ve tokoferol gibi suda ve lipitte çözünebilen, protein yapısında olmayan bazı bileşikler yer almaktadır (Lichtenthaler vd. 2003).

Bununla birlikte, serbest radikallerin kaynağı yalnızca hücresel metabolizma sırasında oksijen kullanılarak gerçekleşen reaksiyonlarla sınırlı değildir. Sigara ve alkol tüketimi, aşırı yağlı gıdalarla beslenme, uzun süre güneş ışığına maruz kalma, hava kirliliği ve endüstriyel kimyasallar gibi çeşitli çevresel faktörler de serbest radikallerin aşırı miktarda üretilmesine yol açmaktadır. Ayrıca yaşlanma sürecinde serbest radikallerin neden olduğu zararların önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Bunların yanı sıra, serbest radikallerin kalp-damar hastalıkları, akciğer ve karaciğer rahatsızlıkları ile kanser de dahil olmak üzere yaklaşık çok çeşitli hastalığın oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir (Bjelaković vd. 2007; Herbert, 1997; Gülçin, 2002).

Antioksidanları daha iyi anlayabilmek için önce serbest radikallerin ne olduğuna dair bir temel bilgiye sahip olmak gereklidir. Serbest radikaller, üzerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip olan, aktif ve dengesiz atom, iyon veya moleküllerdir. Bu kararsız yapılar, dengenin sağlanması için eksik olan elektronu almak üzere başka moleküllerle etkileşime girerler. Genellikle serbest radikaller, kimyasal formüllerinin sağ üst köşesine bir nokta ile gösterilirler. Bu bileşiklerin en önemli özelliği, kısa ömürlü ve kararsız olmalarına rağmen, yüksek reaktivite göstererek diğer moleküllere saldırarak onları da serbest radikal haline getirmeleridir. Bu süreç, hücre ve dokularda zarara yol açarak birçok sağlık sorununa, özellikle oksidatif stres ve bununla bağlantılı hastalıkların gelişmesine neden olur. Bu nedenle serbest radikaller, "oksidan moleküller" olarak da adlandırılmaktadır (Gülçin, 2020).

2.4.1. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları

1. Endojen (İçsel) Kaynaklar

Elektron taşıma zinciri sırasında oksijenin tam olarak indirgenememesi sonucu, özellikle **süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$)** gibi serbest radikaller oluşur. Bu fizyolojik süreç, vücutta serbest radikal üretiminin ana kaynağıdır. Bununla birlikte Enzimatik Reaksiyonlar da Serbest radikal oluşumuna etki eder. Örneğin; NADPH oksidaz, Ksantin oksidaz, Sitokrom P450 enzimleri özellikle inflamasyon sırasında daha çok aktive olur ve Serbest radikal konsantrasyonunun artmasına sebep olur. Fagositik Hücre Aktivitesi (Savunma Yanıtı) sırasında, Makrofajlar ve nötrofiller, enfeksiyonlara karşı savunma sırasında büyük miktarda ROS üretir (örn. süperoksit, hidrojen peroksit). Bu sürece "**oksidatif patlama**" denir. Bunun yanında, lipid peroksidasyonu sırasında serbest radikallerin çoklu doymamış yağ asitlerinden hidrojeni koparıp lipid radikalleri oluşur. Peroksizomlar H_2O_2 üretimi olurken, endoplazmik retikulumda da oksidatif reaksiyonlar aracılığıyla radikal oluşumu gözlenir. Tüm bu belirtilen metabolizmada gerçekleşen endojen kaynaklı serbest radikal oluşumuna sebep olan metabolik olaylardır (Pham-Huy vd. 2008; Chandimali vd. 2025).

2. Ekzogen (Dışsal) Kaynaklar

İyonize radyasyon, X-ışınları, gama ışınları gibi iyonize radyasyon su moleküllerini parçalayarak **hidroksil radikali (OH[•])** gibi son derece reaktif radikaller oluşturabilir. Güneşten gelen UV ışınları hücre bileşenleriyle etkileşerek ROS oluşumuna neden olabilir (özellikle cilt hücrelerinde). Egzoz gazları, sigara dumanı, pestisitler, ağır metaller (örneğin civa, kadmiyum), çevresel toksinler serbest radikal oluşumunu tetikler. İlaçlar ve Yabancı Kimyasallar (Xenobiotikler) Bazı ilaçlar karaciğerde metabolize edilirken ROS üretimi artabilir (örn. asetaminofen yüksek dozda). Aşırı fiziksel aktivite sırasında artan oksijen tüketimi mitokondriyal ROS üretimini artırabilir. Bunların hepsi ekzogen kaynaklı ROS üretimine sebep olan dış etkenler arasında yer alır (Pham-Huy vd. 2008; Chandimali vd. 2025).

Serbest radikaller, vücut besinleri işlerken ve tepki verirken hücreler tarafından üretilen atık maddelerdir. Vücut serbest radikalleri verimli bir şekilde işleyemez ve ortadan kaldıramazsa oksidatif stres oluşur. Bu da hücrelere ve vücut işlevlerine zarar verebilir. Serbest radikaller, aynı zamanda reaktif oksijen türleri olarak bilinir. (Shahidi, 1997; Güçlü vd 2009).

2.5. DES ve NADES

Derin Ötektik Çözücüler (DES), hidrojen bağı alıcısı (HBA) ve hidrojen bağı vericisi (HBD) özelliklerine sahip en az iki bileşiğin belirli oranlarda karıştırılmasıyla oluşturulan, çevre dostu alternatif çözücü sistemleridir. Bu çözücüler, bileşenler arasındaki güçlü hidrojen bağları sayesinde, kimyasal reaksiyon gerektirmeksizin kararlı sıvı faz oluştururlar. Genellikle basit karıştırma yoluyla elde edilen bu sistemler, çoğu zaman ilave saflaştırma işlemleri gerektirmez (Hansen vd. 2021; Płotka-Wasyłka vd. 2020).

DES'ler, düşük uçuculuk, ayarlanabilir polarite, düşük buhar basıncı ve yüksek termal stabilite gibi özellikleriyle dikkat çeker. Bu avantajlar, onları toksik ve maliyetli iyonik sıvılara karşı sürdürülebilir bir alternatif hâline getirmektedir (Xu vd., 2015). Ayrıca, yeşil kimya yaklaşımlarına uyumları ve biyolojik sistemlerle olan yüksek etkileşim kapasiteleri nedeniyle biyolojik ekstraksiyonlar gibi çevre dostu uygulamalarda tercih edilmektedir (Monti vd. 2021).

Tablo 2.1. DES oluşumunda H bağı alan ve veren bazı maddeler (Abbott, 2003)

Hidrojen Bağ Donörleri (H vericileri)	- Asitler ($\text{HO}_2\text{C-R}_1$); Oksalik asit ($\text{HO}_2\text{CCO}_2\text{H}$); Malonikasit ($\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CO}_2\text{H}$); Laktik asit; Malik asit Nikotinik asit - Amidler ($\text{H}_2\text{N-C=O-R}_2$); Üre ($\text{NH}_2\text{CONH}_2$); Tiyoüre ($\text{NH}_2\text{CSNH}_2$) - Alkoller ($\text{HO-R}_3$); Gliserin ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$); Etilen glikol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$)
Hidrojen Bağ Akseptörleri (H alıcıları)	Kolin klorür, Beatin, Glisin, Alanin, Histidin

Bazı DES sistemleri tamamen doğal kökenli bileşenlerden oluşturulabilir. Bu tür sistemler "Doğal Derin Ötektik Çözücüler" (NADES) olarak adlandırılmakta olup; organik asitler, şekerler, polioller, aminler ve aminoasitler gibi doğal metabolitlerin bir araya getirilmesiyle hazırlanmaktadır (Choi vd. 2011; Dai vd. 2013). NADES'ler, bitki ve hayvan organizmalarında yaygın bulunan bileşenlerle üretilbildiğinden dolayı hem biyolojik uyumluluğa sahiptir hem de biyobozunurluk açısından avantaj sağlar. Düşük erime noktaları sayesinde bu çözücüler genellikle oda sıcaklığında sıvı hâlde bulunabilir (Abbott vd. 2004; Kutlu vd. 2021).

DES'ler geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir ve biyodizel üretimi, aromatik hidrokarbonların ayrıştırılması, gaz arıtımı, biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu ve metal iyonlarının çözünürlüğünün artırılması gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Tang vd 2015). DES'lerin diğer önemli kullanım alanları şunlardır:

- Nanopartiküllerin stabilizasyonu (Iqbal vd. 2020)
- Polifenollerin ekstraksiyonu (Barbieri vd. 2020)
- Çevresel kirleticilerin giderilmesi ve azeotrop ayrımı (Kussainova and Shah, 2020; Pena-Pereira and Namieśnik, 2014; Shi vd. 2020)
- Biyotoksik metal tespiti (da Silva vd. 2020; Perna vd. 2020)
- Metal işleme ve biyodizelin saflaştırılması (Smith vd. 2014)
- Polar organometalik kimya ve biyokataliz uygulamaları (Perna vd. 2020)
- Bileşiklerin izolasyonu ve fraksiyonlanması (Tan vd 2018; Wang vd. 2017; Zhou vd. 2018; Zuo vd. 2018; Chen vd. 2020; Hong vd. 2020)

- Kapsülleme işlemlerinin kolaylaştırılması (Mano vd. 2015, 2017; Di Pietro vd. 2019).

Bütün bu sebeplerden dolayı, DES'ler, özellikle biyokataliz, organik sentez ve elektrokimyasal süreçlerde kullanılmaktadır (Smith vd. 2014; Gurkan vd. 2019; Svigelj vd. 2021). Geleneksel çözücülere kıyasla daha düşük toksisiteye ve daha yüksek çevresel uyumluluğa sahip olmaları, yeşil kimyanın temel çözücüler arasında yer almalarını sağlamaktadır (Svigelj vd. 2021).

2.5.1. Doğal Derin Ötektik Çözücüler (NADES)

Son yıllarda sürdürülebilir çözücü sistemlerine olan ilgi artmış ve doğal derin ötektik çözücüler (NADES) bu bağlamda öne çıkan bir araştırma alanı hâline gelmiştir. NADES'ler, doğada yaygın olarak bulunan şekerler, organik asitler, amino asitler ve alkoller gibi bileşiklerin belirli oranlarda bir araya getirilmesiyle elde edilir. Bu çözücüler, toksik olmayan yapıları, biyobozunurluk özellikleri ve geniş çözünürlük yelpazesi sayesinde geleneksel organik çözücülere çevre dostu bir alternatif sunmaktadır (Paiva vd. 2014).

2.5.2. Bitkisel Ekstraksiyon Uygulamaları

NADES sistemleri, özellikle fenolik bileşikler, flavonoidler ve alkaloidler gibi bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerin ekstraksiyonunda yaygın biçimde kullanılmaktadır. Dai ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışma, geleneksel çözücülere kıyasla NADES sistemlerinin fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimini artırdığını ve elde edilen ekstraktların antioksidan özelliklerini daha iyi koruduğunu ortaya koymuştur. Zainal-Abidin ve ekibi (2017) ise Curcuma longa bitkisinden NADES kullanılarak elde edilen kurkuminin hem verim hem de çevresel sürdürülebilirlik açısından başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir.

Bu çözücüler, yüksek polariteleri sayesinde hem organik hem de inorganik birçok bileşiği çözebilme kapasitesine sahiptir. Tamamen doğal bileşenlerden oluşmaları dolayısıyla düşük maliyetli, biyobozunur, uçucu olmayan, yanıcı olmayan ve çevreyle uyumlu çözücüler olarak öne çıkmaktadırlar (Liu vd. 2018).

NADES sistemleri üç temel yöntemle hazırlanabilir:

1. Dondurarak kurutma
2. Vakumla buharlaştırma
3. Isıtma ve karıştırma (Meneses vd. 2019)

Abbott ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan çalışmada, DES sistemlerinin oluşumuna ilişkin çeşitli sınıflamalar yapılmış ve bu çözücülerin yapısal özelliklerine göre kategorilere ayrıldığı belirtilmiştir. Söz konusu sınıflandırmalara ilişkin özet bilgiler Tablo 2.1’de sunulmaktadır.



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu bölümde, tez kapsamında kullanılan kimyasallar, laboratuvar cihazları ve analiz ekipmanlarının yanı sıra; enzim inhibisyonu çalışmaları ile antioksidan kapasite analizlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanış süreçleri detaylandırılmıştır. Ayrıca, bu analizlerde uygulanan yöntemlerin temel ilkeleri ve çalışma prensipleri, alt başlıklar altında sistematik bir biçimde açıklanmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta olup, Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan başlıca kimyasallar arasında çözücülerden aseton, etanol ve metanol; derin ötektik çözücü (DES) hazırlamak amacıyla kullanılan kolin klorür, glikoz ve sitrik asit yer almaktadır. Ayrıca, enzim inhibisyon analizlerinde asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzimleri, 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), BHA, BHT, α - tokoferol, trolox, 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside, asetiltiyokolin iyodat (AChI) ve bütiriltiyokolin iyodat (BChI) kullanılmıştır.

Antioksidan aktivite analizlerinde ise 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH $\cdot$) radikali, neokuprin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), trikloroasetik asit (TCA), potasyum ferrisiyanür ($K_3Fe(CN)_6$), bakır(II) klorür ($CuCl_2$), amonyum asetat (CH_3COONH_4) gibi reaktiflerin yanı sıra; karşılaştırmalı analizlerde antioksidan referans bileşik olarak bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), α -tokoferol ve trolox kullanılmıştır.

3.1.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Tablo 3.1’de araştırma süresince yararlanılan cihaz ve aletler, markaları ile birlikte verilmiştir.

Tablo 3.1. Araştırma Süresince Yararlanılan Cihaz ve Aletler

Cihaz	Marka
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1208
Derin dondurucular (-30 ve -86°C)	Sanyo, Japan
pH metre	Thermo
Hassas terazi	Denver Instrument
İnkübatör	Wiseven
Otomatik pipetler	Eppendorf ve Socorex
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Vorteks	Fisons, Whirlimixer
Saf su cihazı	Firstreem Calypso MK 1 Glass Still
Magnetik karıştırıcı	Jeio Tech
LC-MSMS sistemi	Shimadzu LCMS-8040
HPLC	Shimadzu Prominence
Otomatik pipet	Eppendorf ve Socorex
Etüv	Memmert UN55
Ultrasonic Banyo	Nüve

3.1.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanış Yöntemleri

Bu bölümde, çalışmada kullanılan kimyasal çözeltilerin hazırlanış yöntemleri, kullanım amaçları ve uygulandıkları deneysel protokoller detaylandırılarak alt başlıklar halinde sunulmuştur. Çalışmada beyaz balın farklı çözücülerdeki formlarının enzim inhibisyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Bu kapsamda aşağıdaki çözeltiler hazırlanmış ve analizlerde kullanılmıştır:

- **Beyaz bal-etanol çözeltisi:** 11 mg bal, 1,1 mL etanolde çözölmüştür.

3.1.3.1. Enzim Aktivitesi Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- **Asetilkolinesteraz (AChE) Enziminin İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler**
 1. 1 M Tris-HCl Tampon Çözeltisi (pH: 8): Tris bazlı tampon çözeltisinin hazırlanması için 30,27 g Tris bazı hassas terazide tartılmış ve 200 mL distile su içerisinde, 5 mM olacak şekilde 0,370 g EDTA ile birlikte çözölmüştür.

Çözeltinin pH değeri pH metre ile 8.00'e ayarlanmış ve ardından toplam hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır.

2. 10 mM Asetilkolintiyoiyodat Çözeltisi: 0,145 g asetilkolintiyoiyodat hassas terazide tartılarak 50 mL distile su içinde çözülmüş ve kullanılmaya hazır hâle getirilmiştir.
3. 10 mM DTNB (5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)) Çözeltisi: DTNB çözeltisi için 0,01 g DTNB ile birlikte 0,5 g sodyum sitrat tartılmış, ardından bu bileşikler 50 mL distile suda çözündürülerek kullanıma uygun hale getirilmiştir.

Bütirilkolinesteraz (BChE) Enziminin İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

1. 50 mM Fosfat Tamponu (pH: 8): Disodyum fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi hazırlamak için 1,7745 g madde tartılarak 200 mL distile suda çözülmüş, pH değeri pH metre yardımıyla 8.00'e ayarlanmıştır. Son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlanarak tampon çözelti hazırlanmıştır.
2. 0,5 mM Bütirilkolin İyodat Çözeltisi: Bütirilkolin iyodat çözeltisi için 0,008 g madde tartılmış ve 50 mL distile su içerisinde çözülerek stok çözelti elde edilmiştir.
3. 0,35 mM DTNB Çözeltisi: 7 mg DTNB, hassas terazide tartılmış ve 50 mL distile su içerisinde tamamen çözülerek analizlerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

α -Glikozidaz Enziminin İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

1. Sodyum Fosfat Tamponu (Aktivite ölçmesi için, 0,1 M): 5,99 g sodyum fosfat tartıldı ve 450 mL distile su içerisinde çözüldü. pH'sı 6,9'a ayarlandıktan sonra son hacim distile su ile 500 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.
2. Nitrophenyl β -D-glucopyranoside substrat çözeltisinin hazırlanması (5 mM'lık): 37,6 mg ilgili substrattan tartılıp 0,1 M'lık 25 mL fosfat tamponundan çözülerek hazırlandı enzimlerin altına gidecek

3.1.4. Antioksidan ve Radikal Giderme Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

Bu alt bölümde, antioksidan kapasite tayininde kullanılan kimyasal çözeltilerin hazırlanış yöntemleri ve kullanılan bileşenler detaylandırılmıştır.

3.1.4.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler:

1. 0,2 M Fosfat Tamponu (pH 6,6): Tampon çözelti elde etmek için 6,24 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) hassas terazide tartılmış ve yaklaşık 180 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür. pH değeri, pH metre ile 6,6'ya ayarlandıktan sonra, toplam hacim 200 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.
2. %1 Potasyum Ferrisiyanür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) Çözeltisi: Bu çözeltinin hazırlanmasında 1,5 g potasyum ferrisiyanür tartılarak 150 mL distile su içerisinde çözülmüş ve homojen hale getirilmiştir.
3. %10 Trikloroasetik Asit (TCA) Çözeltisi: TCA çözeltisi için 10 g trikloroasetik asit tartılarak distile su içinde çözülmüş, ardından hacim 100 mL'ye tamamlanarak kullanıma uygun hâle getirilmiştir.
4. %0,1 FeCl_3 Çözeltisi: FeCl_3 çözeltisinin hazırlanmasında 85 mg FeCl_3 tartılmış ve 50 mL distile su içerisinde çözülerek analizlerde kullanılacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.4.2. Kuprak (CUPRAK) Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler

Bu analizde, örneklerin indirgeme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla CUPRAK metoduna uygun şekilde çeşitli çözeltiler hazırlanmış ve analiz sürecinde kullanılmıştır. Çözelti hazırlama adımları şu şekildedir:

1. 0,01 M CuCl_2 Çözeltisi: Analizlerde kullanılmak üzere, 47 mg CuCl_2 hassas terazide tartılarak ölçülmüş ve 50 mL distile su içerisinde tamamen çözündürülerek kullanıma hazır hâle getirilmiştir.
2. $7,5 \times 10^{-3}$ M Etanolik Neokuprin Çözeltisi: Neokuprin çözeltisi için 78 mg madde hassas şekilde tartılmış ve 50 mL mutlak etanol içerisinde çözülerek analizde kullanılacak şekilde hazırlanmıştır.
3. 1 M Amonyum Asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) Tamponu (pH 6,5): Tampon çözeltinin hazırlanmasında, 7,7 g amonyum asetat distile su içerisinde çözülmüş ve yaklaşık 80 mL hacme ulaşması sağlanmıştır. pH değeri pH metre yardımıyla

6,5'e ayarlandıktan sonra, son hacim 100 mL'ye distile su eklenerek tamamlanmıştır.

3.1.4.3. ABTS⁺ Radikali Giderme Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Bu analizde, örneklerin antioksidan kapasitelerini belirlemek amacıyla ABTS⁺ radikali giderme yöntemine uygun şekilde çeşitli çözeltiler hazırlanmış ve deneysel süreçte kullanılmıştır:

1. 0,1 M Fosfat Tamponu (pH 7,4): Yaklaşık 2,75 g disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) tartılarak 180 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Elde edilen çözeltinin pH değeri pH metre yardımıyla 7,4'e ayarlanmış, ardından son hacim 200 mL'ye distile su eklenerek tamamlanmıştır.
2. 2 mM ABTS Çözeltisi: ABTS çözeltisini hazırlamak amacıyla yaklaşık 1,1 mg ABTS, pH 7,4'e ayarlanmış fosfat tampon içerisinde çözülmüştür. Karışım tamamen çözündükten sonra üzerine distile su ilave edilerek son hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır.
3. 2,5 mM Potasyum Persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) Çözeltisi: Yaklaşık 70 mg potasyum persülfat, 0,1 M fosfat tampon içerisinde çözülmüş ve karışım manyetik karıştırıcı yardımıyla homojen hâle getirilmiştir. Son olarak, distile su ilavesiyle çözeltinin hacmi 100 mL'ye ulaşacak şekilde ayarlanmıştır.

3.1.4.4. DPPH Serbest Radikal Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

3 M'lık DPPH[•] çözeltisinin hazırlanışı: 40 mg DPPH[•] 100 mL etanolda manyetik karıştırıcı ile tamamen çözününceye kadar bir gece etanolda karıştırıldı.

3.1.5. NADES Çözeltilerinin Hazırlanması

Bu çalışmada, doğal derin ötektik çözücüler (NADES) elde etmek amacıyla hidrojen bağı alıcısı olarak kolin klorür (ChCl), hidrojen bağı vericisi olarak ise sitrik asit (CA) ve glikoz (G) kullanılmıştır. Çözücüler hazırlanırken ChCl bileşeni, öncelikle etüvde kurutularak nemden arındırılmıştır.

Elde edilen karışımlar, yaklaşık 80 °C sıcaklıktaki su banyosunda, homojen ve berrak bir sıvı oluşana dek karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan NADES çözeltileri, dış ortamla temas etmeyecek şekilde hava geçirmez amber renkli cam şişelere alınarak

oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Beyaz bal'dan 0.25 g alınarak falkon tüplere konuldu. Daha sonrasında hazırlanmış olan NADES'lerden 5 mL eklendi. Çalışmalar yapılana kadar buzdolabında +4°C 'de tutuldu.

3.2. Yöntem

Bu bölümde, çalışmada kullanılan enzim inhibisyonu ve antioksidan aktivitelerin belirlenmesine yönelik yöntemler başlıklar halinde açıklanmıştır.

3.2.1. Enzim İnhibisyonu Çalışmaları

a) AChE ve BChE Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Beyaz balın asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BChE) enzimleri üzerindeki inhibe edici etkisi araştırılmıştır. Bu analizler, Ellman ve arkadaşları tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir (Ellman, 1961). Yöntem kapsamında AChE ve BChE enzimleri, asetilkolini sırasıyla tiyokolin ve asetata parçalayarak katalizler. Ortaya çıkan tiyokolin, 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girerek 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit isimli sarı renkli bir bileşik oluşturur. Bu bileşiğin absorbansı 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Her örnek için 0. ve 5. dakikalarda absorbans değerleri kaydedilmiştir (Göçer, 2014).

b) α -Glikosidaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

α -Glikozidaz enzim aktivitesi, Tao ve arkadaşlarının (2013) daha önce yapmış oldukları prosedürlerine göre α -glikozidaz enziminin substratı olarak kullanılan p-NPG kullanılarak belirlendi ve 405 nm'de absorbanslar spektrofotometrik olarak ölçüldü. α -Amilaz enziminin aktivitesi ise Xiao ve arkadaşları (2006) tarafından kaydedilen prosedürlerine göre belirlendi. 580 nm'de absorbansları ise spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.2. Antioksidan Çalışmaları

Bu çalışmada beyaz balın antioksidan potansiyelini değerlendirmek amacıyla dört farklı spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır. Kullanılan yöntemler Fe^{3+} - Fe^{2+} ve

Cu^{2+} - Cu^+ indirgenme yöntemi ve ABTS^+ ve DPPH radikali giderme aktiviteleri yöntemleridir. Her yöntem aşağıda detaylı biçimde açıklanmıştır.

a) Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Yöntemi

Bu yöntemde beyaz bal stok çözeltisi maserasyon (1 mg/mL)ve NADES yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstraler 10, 20, 30 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde her bir tüpe pipetlenmiştir. Ayrıca her bir tüpe sırasıyla 2 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2 mL %1 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ çözeltisi eklenmiştir. Karışımlar 50 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından, her tüpe 2 mL %10 TCA çözeltisi, 2 mL distile su ve 0,5 mL %0,1 FeCl_3 çözeltisi ilave edilmiştir. Absorbans değerleri 700 nm'de, distile suyla hazırlanan kör çözeltiye karşı ölçülmüştür.

b) CUPRAC (Cu^{2+} - Cu^+) İndirgeme Yöntemi

Bakır(II) iyonlarının indirgenmesi esasına dayanan bu analiz, Apak ve arkadaşlarının (2006) yöntemine ufak modifikasyonlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Beyaz bal stok çözeltisi 1 mg/mL olarak hazırlanmış ve bu stoktan 10, 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda örnekler alınmıştır. Deney tüplerine sırasıyla 0,4 mL CuCl_2 çözeltisi (0,01 M), 0,4 mL etanolik neokuprin çözeltisi ($7,5 \times 10^{-3}$ M) ve 0,4 mL $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tampon çözeltisi (1 M) eklenmiştir. Toplam hacim 2 mL'ye distile su ile tamamlanmış, karışımlar oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve absorbanslar 450 nm'de, distile su körüne karşı ölçülmüştür.

c) ABTS^+ (2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) Radikal Giderme Aktivitesi

Bu analiz, Re ve arkadaşlarının (1999) geliştirdiği protokole dayalı olarak uygulanmıştır. İlk olarak 6 mM konsantrasyonda ABTS çözeltisi hazırlanmış ve içerisine 2,4 mM potasyum persülfat çözeltisi eklenerek karışım oda sıcaklığında 12–16 saat bekletilmiştir. ABTS^+ radikal çözeltisinin absorbansı 734 nm'de $0,70 \pm 0,02$ olacak şekilde, pH 7,4 ve 0,1 M fosfat tamponu ile ayarlanmıştır.

Beyaz bal stok çözeltisi 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış ve bu stoktan alınan örnekler 10, 20 ve 40 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Her bir örnekten 1 mL alınarak 2 mL ABTS^+ çözeltisiyle karıştırılmış, ardından karışım karanlık

ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Absorbans değerleri etanol körüne karşı 734 nm’de ölçülmüştür.

d) DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Aktivitesi

DPPH radikali ile antioksidan aktivite ölçümünde 0,5 mM DPPH çözeltisi kullanılmıştır. Beyaz bal stok çözeltisi 1 mg/mL olarak hazırlanmış, bu stoktan sırasıyla 15, 25 ve 35 µg/mL konsantrasyonlarda örnekler alınmıştır. Her örnek 1 mL DPPH çözeltisiyle karıştırılmış ve toplam hacim 3 mL’ye etanol ile tamamlanmıştır. Karışımlar karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümleri, etanol körüne karşı 517 nm’de gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubunda yalnızca DPPH çözeltisi ve etanol kullanılmıştır (Göçer ve Gülçin, 2011).

3.2.3. LC-MS/MS Sistemi ile Beyaz Bal’ın Sekonder Metabolit Profilinin Belirlenmesi

Yöntemi Arı ürünlerinin LC-MS/MS ile sekonder metabolitlerini belirlemek için Yılmaz’ın metot validasyonu yaparak oluşturduğu yöntem uygulandı (Yılmaz, 2020). Bu yöntemin uygulamasından önce arı ürünleri ekstratlarından 10 mg/mL derişimde stok çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler sisteme verilmeden önce 0,22 µm por genişliğine sahip teflon (PTFE) filtreden süzülerek viallere alındı ve sisteme enjekte edildi. Kullanılan LC-MS/MS sisteminde sekonder metabolitlerin farklı alıkonma sürelerine sahip olmaları için ters faz dolgu kolon kullanıldı. Bunun için apolar polaritede bir C18 analitik kolon (Agilent Poroshell 120 EC-C18, 150 mm × 2,1 mm, 2,7 µm) ve mobil faz olarak polar %0,1 formik asit (v/v) içeren 5 mM amonyum format çözeltisi (Mobil Faz A) ile metanol ile hazırlanmış %0,1 formik asit (v/v) içeren 5 mM amonyum format çözeltisi (Mobil Faz B) kullanıldı. Uygulanan mobil faz akışı gradient olarak belirlenmiş ve program Tablo 3.2’de belirtilmiştir. Mobil faz akışı hızı 0,5mL/dk, enjeksiyon hacmi 5 µL ve kolon sıcaklığı 30 °C olarak ayarlandı. İyonizasyon için elektrosprey iyonizasyon (ESI) kullanıldı ve nebulizasyon ve parçalanma ürünlerinin oluşumu için yüksek saflıkta (%99,999) N₂ gazı kullanıldı. Arayüz ve blok sıcaklıkları sırasıyla 350, 400 °C olarak ayarlandı. Kalitatif ve kantitatif ölçümlerde çoklu reaksiyon görüntüleme (MRM) tekniği kullanıldı.

Tablo 3.2. Uygulanan gradient sistem programı

Zaman(dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
0	80	20
25	0	100
35	0	100
45	80	20

3.2.4. HPLC Sistemi ile Beyaz Bal Örneğinin Şeker Profilinin Belirlenmesi

Beyaz Bal örneğinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC, Shimadzu Prominence 2010) sistemi ile şeker profilinin belirlenmesi analizi TS 13359 standına (Balda fruktoz, glukoz, sakaroz, turanoz ve maltoz muhtevası tayini) göre gerçekleştirildi. Bu işlem için 5,0 g Beyaz Bal numunesi üzerine 40 mL saf su eklendi ve karışım ısıtılmadan çözüldü. Çözelti 100 mL balon joje içerisine aktarıldı ve üzerine 25mL metanol eklendi. Daha sonra karışım balon joje şişe referans çizgisine kadar saf su ile dolduruldu. HPLC yönteminde ise kolon olarak NH₂ analitik kolon (SilUR 250x4,6 mm, 5µm) kullanıldı. Mobil Faz A olarak saf su, Mobil Faz B olarak ise asetonitril kullanıldı. Sistem akışı %30 Mobil Faz A %70 Mobil Faz B oranında izokrotik olarak sağlandı. Akış hızı 1,0 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon fırın sıcaklığı 30 °C olarak ayarlandı. Dedektör olarak kırılma indeksi dedektörü kullanıldı. Standart bileşikler ile oluşturulan kalibrasyon denklemi ile örnek içerisindeki şeker oranları belirlendi.

3.2.5. Beyaz Bal Örneğindeki Prolin Muhtevasının Belirlenmesi

Beyaz Bal örneğinin içerdiği prolin miktar TS 13357 metoduna (Balda prolin muhtevasının tayini) göre spektroskopik olarak gerçekleştirildi. Örneğin ölçüme hazırlanması için 5,0 g Beyaz Bal örneği bir erleninde tartıldı. Üzerine 50 mL saf su eklendi ve tamamen çözünme gerçekleştikten sonra 100mL'lik bir balon jöjeye aktarıldı. Sonra balon jöjenin işaret çizgisine kadar saf su ile dolduruldu 10 dk karıştırıldı. Spektrofotometrik ölçümler için bir UV-Vis spektrofotometre (Shimadzu UV-1800) kullanıldı. Referans standart olarak kullanılan prolin çözeltisinden (0,8 mg/mL) ve Beyaz Bal çözeltisinden 0,5 mL, prolin çözeltisinden 0,5 mL ve blank olarak 0,5 mL saf su deney tüplerine aktarıldı. Üzerlerine 1 mL ninhidrin çözeltisi ile 1 mL formikasit eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra analiz tüpleri 10 dakika süre ile 70 °C'daki su banyosunda bekletildi. Bu süre içerisinde her bir analiz tüpüne

hazırlanmış olan %50 (v/v) su:2-propanol çözeltisinden 5'er mL ilave edildi, ağızları kapatıldı ve oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Yaklaşık 45 dakika sonra numune ve standart çözeltilerinin 520 nm dalga boylarında göstermiş olduğu absorbens değerleri ölçüldü.

3.2.6 Beyaz Bal Örneğinin Diastaz Sayısı ve Nem Miktarının Belirlenmesi

Beyaz Bal örneğinin diastaz sayısının belirlenmesi Phadebas metoduna (Güzel ve Bahçeci 2020) göre belirlendi. Bu metoda göre; 1 g bal örneği 100 mL'lik bir balon joje içerisine alındıktan sonra 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 5.2) ile çözülüp balon joje referans çizgisine kadar tampon çözelti ile dolduruldu ve 10 dakika daha karıştırıldı. Bu çözeltiden bir deney tüpüne 5 mL alınarak 40°C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 dakika bekletildi. Aynı işlem kör deneme amacıyla bal örneği kullanılmadan 5 mL'lik sodyum asetat tamponu için de gerçekleştirildi. Bir pens yardımıyla her iki çözeltiye de Phadebas tabletinden konuldu ve kronometre ile süre tutulmaya başlanmıştır. Tabletlerin çözünmesi için hızlı bir şekilde tüpler tekrar su banyosu içerisine alındı. Tam olarak 30 dakika sonunda 1 mL 0,5 M sodyum hidroksit ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Santrifujleme (4500 g, 10 dakika, 4°C) işleminin ardından spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800) 620 nm dalga boyunda saf suya karşı absorbens değerleri ölçüldü. Kör denemeden elde edilen absorbens değerinin örneğin absorbens değerinden çıkarılması ile ΔA_{620} değeri belirlendi ve eşitlik x ile diastaz sayısı hesaplandı.

$$\text{Diastaz sayısı} = 35,2 \times A_{620} - 0,46$$

Beyaz Bal örneğinin sahip olduğu nem miktarı TS 13365 metoduna göre gerçekleştirildi. Bu metoda göre 10 g beyaz bal örneği kapaklı bir kap içerisine alındı ve tamamen şeffaf oluncaya kadar 50 °C sıcaklıkta su banyosunda bekletildi. Ardından su ile kalibre edilmiş refraktometre (ATAGO DR-A1) aracılığıyla örneğin sahip olduğu değer ölçüldü ve oda sıcaklığına karşılık gelen düzeltme faktörü ile gerçek değer hesaplandı.

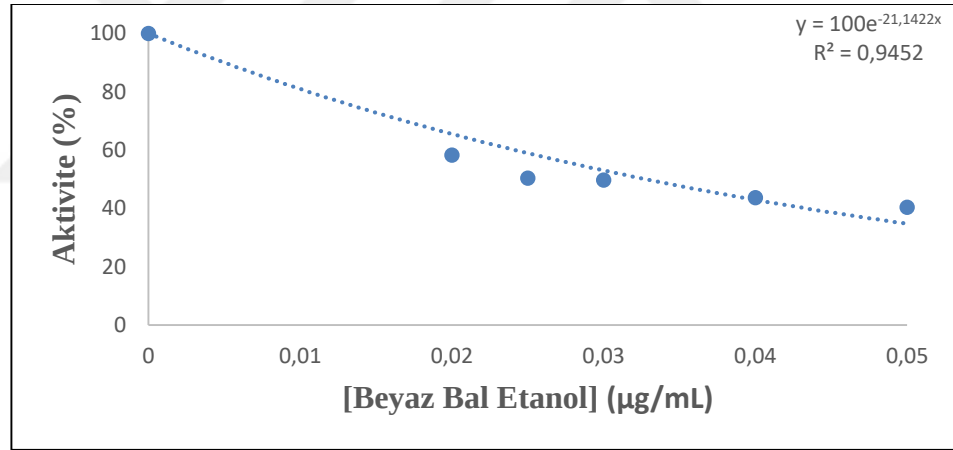
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR

4.1. Asetilkolinesteraz (AChE), Bütilkolinesteraz (BChE) ve α -Glikozidaz Enzimleri ile İlgili Yapılan Çalışma Bulguları

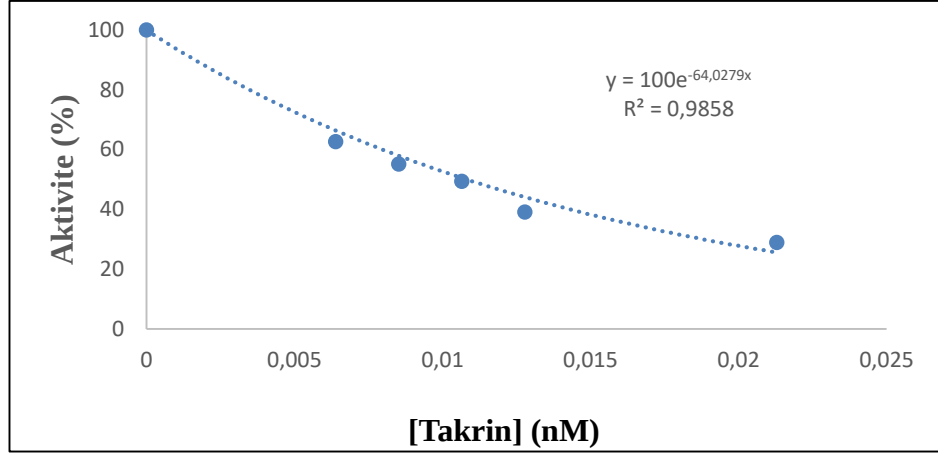
4.1.1. AChE Enzimi Üzerine Beyaz Balın İnhibisyon Etkisi

Doygun substrat konsantrasyonunda AChE enzmi için Beyaz Bal'ın inhibisyon etkisi araştırıldı. Ölçümler Ellman yöntemiyle yapıldı (Ellman, 1961) . AChE enzimi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Beyaz Bal için Aktivite (%)-[Beyaz bal] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan Beyaz Bal konsantrasyonu (IC₅₀ değeri) hesaplandı. Şekil 4.1'de verilen grafiğin üstel denklemi kullanılarak hesaplama yapıldı.



Şekil 4.1. AChE Enziminin 5 farklı Beyaz Bal Konsantrasyonunda IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Beyaz Bal] grafiği

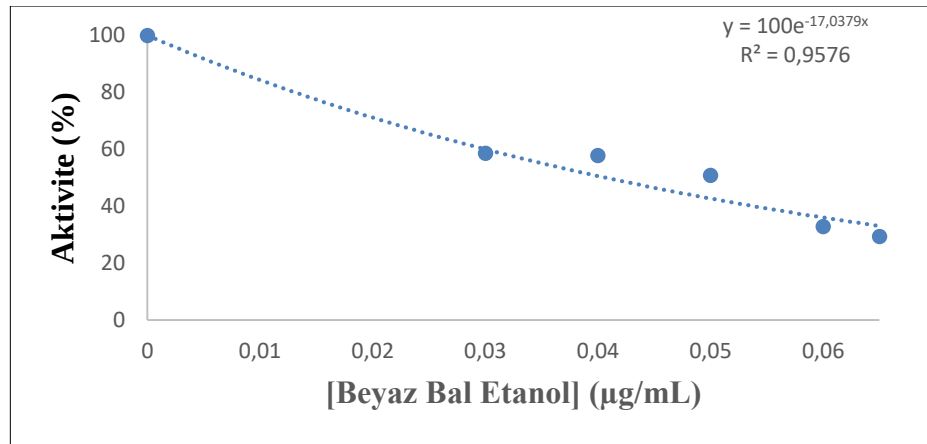
Ayrıca pozitif kontrol olarak Takrin molekülünün AChE üzerine inhibisyon çalışılarak Aktivite (%)-[Takrin] grafiği çizilerek Takrin içinde IC₅₀ değeri hesaplandı



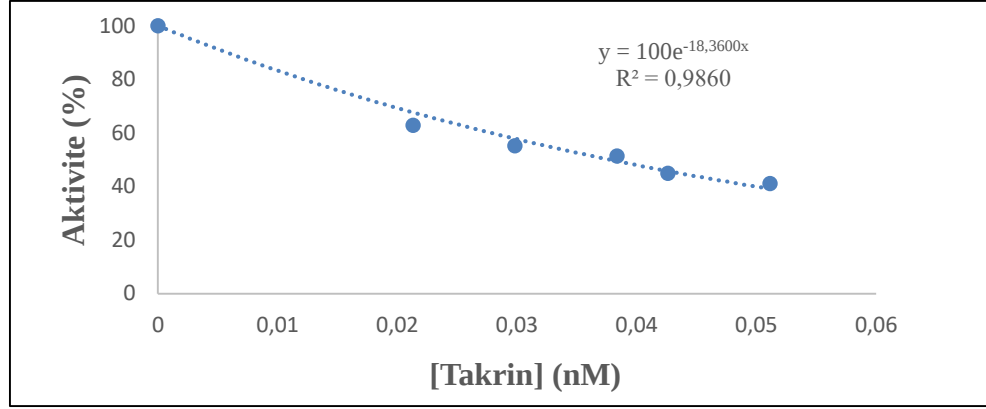
Şekil 4.2. AChE Enzminin 5 farklı Takrin Konsantrasyonunda IC₅₀ değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Takrin] grafiği

4.1.2. BChE Enzimi Üzerine Beyaz Balın İnhibisyon Etkisi

Doygun substrat konsantrasyonunda BChE enzmi için Beyaz Bal'ın inhibisyon etkisi araştırıldı. Ölçümler BChE yöntemiyle yapıldı. BChE enzmi üzerine inhibisyon etkisi gösteren Beyaz Bal için Aktivite (%)-[Beyaz bal] grafikleri çizildi. Daha sonra bu grafikten %50 inhibisyona sebep olan Beyaz Bal konsantrasyonu (IC₅₀ değerleri) hesaplandı. Şekil 4.3'ten elde edilen denklemden Beyaz Bal için IC₅₀ değeri hesaplandı.



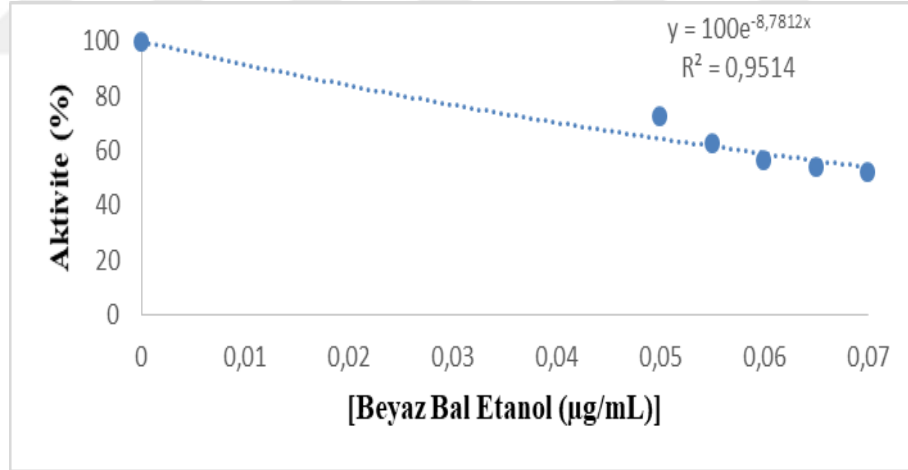
Şekil 4.3. BChE Enziminin Aktivitesi 5 Farklı Beyaz Bal Konsantrasyonunda IC₅₀ Değerinin Bulunması İçin Çizilen Aktivite (%)-[Beyaz Bal] Grafiği



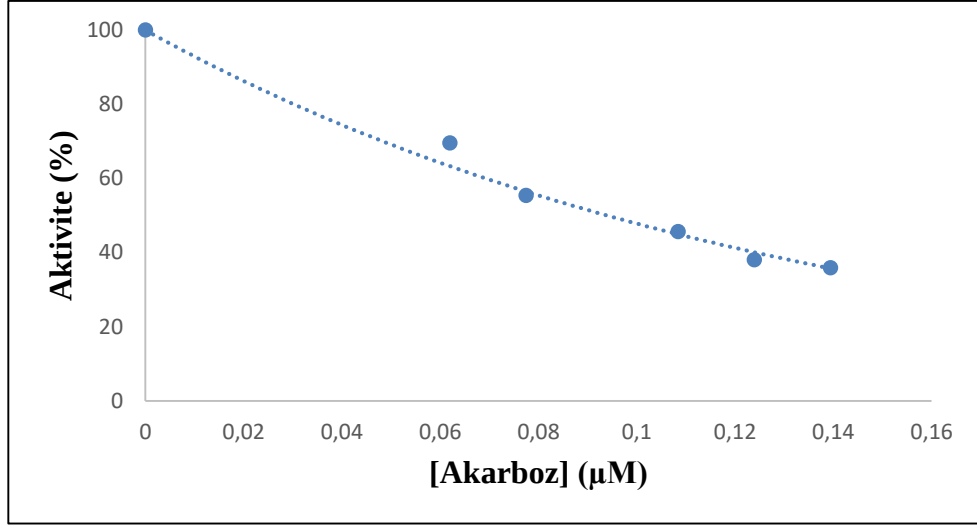
Şekil 4.4. BChE Enzim Aktivitesi Kullanılarak Çalışılan 5 Farklı Takrin Konsantrasyonunda Çizilen Aktivite (%)-[Takrin] Grafiği

4.1.3. α -Glikozidaz Enzimi Üzerine Beyaz Balın İnhibisyon Etkisi

α -Glikozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren Beyaz Bal'a ait Aktivite (%) grafiği oluşturulmuştur. Bu grafik doğrultusunda, %50 inhibisyona neden olan Beyaz Bal konsantrasyonu (IC_{50}) hesaplanmıştır. Şekil 4.5'te sunulan grafik denkleminde yararlanılarak Beyaz Bal için IC_{50} değeri belirlenmiştir.



Şekil 4.5. α -Glikozidaz Enzminin 5 farklı Beyaz Bal Konsantrasyonunda IC_{50} değerinin bulunması için çizilen Aktivite (%)-[Beyaz Bal] grafiği



Şekil 4.6. α -Glikosidaz Enziminin Aktivitesi Üzerine Takrin'in İnhibitör Etkisini Belirlemek Amacıyla (%)-[Akarboz] Beş Farklı Konsantrasyonda Uygulanan Örneklerle Elde Edilen Aktivite (%)–[Akarboz] Grafiği.

Tablo 4.1. AChE, BChE ve α -Glikozidaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Beyaz Bal'ın %50 İnhibisyona Sebep Olan Beyaz Bal'ın IC₅₀ Değerleri

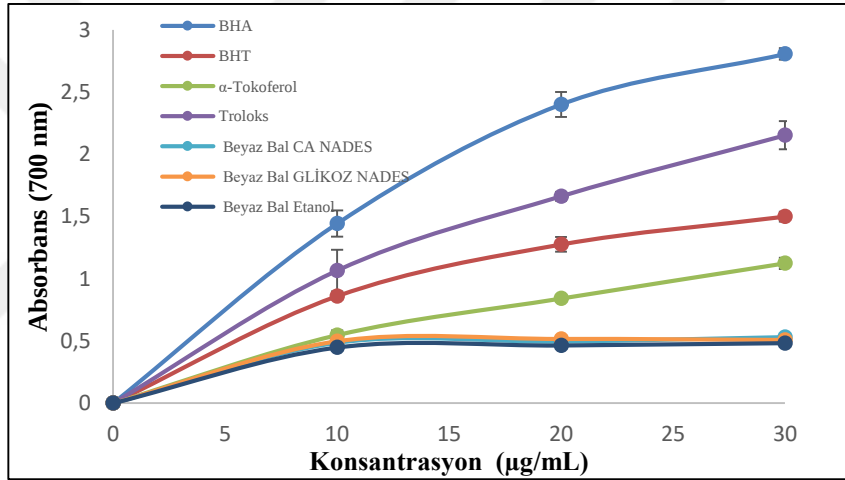
	AChE		BChE		α - Glikozidaz	
	IC ₅₀ (μg/mL)	R ²	IC ₅₀ (μg/mL)	R ²	IC ₅₀ (μg/mL)	R ²
Beyaz Bal	163,89	0,9452	203,37	0,9576	394,59	0,9514
Takrin*	108,23	0,9858	3,77	0,9860	-	-
Akarboz**	-	-	-	-	93,95	0,9862

***:nM, **:μM**

4.2. Antioksidan Çalışmalar ile İlgili Araştırma Bulguları

4.2.1. Fe^{3+} - Fe^{2+} İndirgeme Kuvveti Bulguları

Antioksidan aktivitenin değerlendirilmesinde kullanılan bu biyoanalitik yöntemde, test çözeltisinin sarı rengi, ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme yetenekleri nedeniyle farklı tonlarda yeşile dönüşmektedir (Gülçin, 2006b; Gülçin vd. 2006a). Bu çalışmada kullanılan Beyaz Bal örneklerinin indirgeme kapasitesinin, artan konsantrasyonlar ile birlikte doğru orantılı olarak yükseldiği gözlemlenmiştir. Beyaz Bal'ın indirgeme potansiyeli, 10–30 $\mu\text{g/mL}$ aralığında hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin 700 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri aracılığıyla belirlenmiştir (Şekil 4.7.).



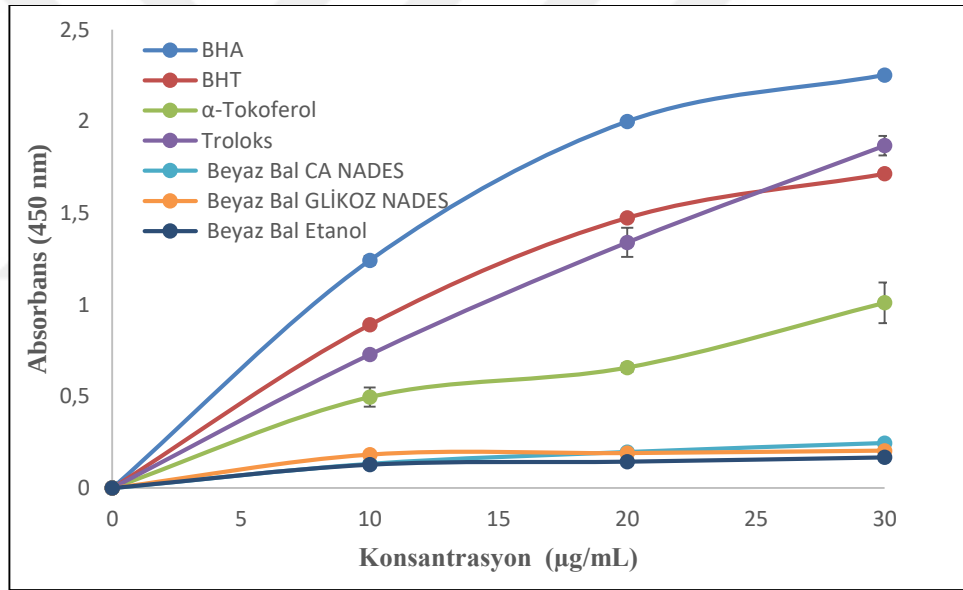
Şekil 4.7. 10–30 $\mu\text{g/mL}$ Aralığındaki Farklı Konsantrasyonlarda Hazırlanan Beyaz Bal Örneklerinin Ferrik İyonlarını (Fe^{3+}) İndirgeme Kapasitelerinin, Standart Antioksidanlar Olan BHA, BHT, A-Tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırılması

Beyaz Bal'ın ferrik iyonlarını (Fe^{3+}) ferröz iyonlarına (Fe^{2+}) indirgeme kapasitesine ilişkin grafik Şekil 4.7'te sunulmuştur. Bu grafiğe ek olarak, Beyaz Bal, standart antioksidanlar (BHA, BHT, α -tokoferol, trolox) 30 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda elde edilen absorbans değerleri Tablo 4.2'de verilmiş ve karşılaştırmalı analiz gerçekleştirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda, bu konsantrasyonda ferrik indirgeme gücü açısından sıralama **BHA > Trolox > BHT > α -Tokoferol > Beyaz Bal CA NADES > Beyaz Bal Glikoz NADES > Beyaz Bal Etanol** şeklinde

belirlenmiştir. Tablo 4.2’de yer alan yüksek absorbans değerlerinin daha yüksek indirgeme kapasitesini yansıttığı ifade edilmelidir.

4.2.2. Cu^{2+} - Cu^+ İndirgeme Kuvveti (Kuprak Metodu) Bulguları

Beyaz Bal’ın kuprik iyonları (Cu^{2+}) üzerindeki indirgeme kapasitesinin, artan konsantrasyonla doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu indirgeme kapasitesi, 10–30 $\mu\text{g/mL}$ aralığında hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki Beyaz Bal çözeltilerinin 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçülerek değerlendirilmiştir (Şekil 4.5). Ayrıca, Beyaz Bal ve standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) indirgeme kapasitelerine ilişkin grafik Şekil 4.8’de sunulmuştur. Her bir örnek için 20 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerleri Tablo 4.2’de verilmiş ve bu veriler üzerinden karşılaştırmalı analiz gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.8. 10–30 $\mu\text{g/mL}$ Aralığında Hazırlanan Farklı Konsantrasyonlardaki Beyaz Bal Örneklerinin Kuprik İyonlarını (Cu^{2+}) İndirgeme Aktivitelerinin, Standart Antioksidanlar Olan BHA, BHT, A-Tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırılması

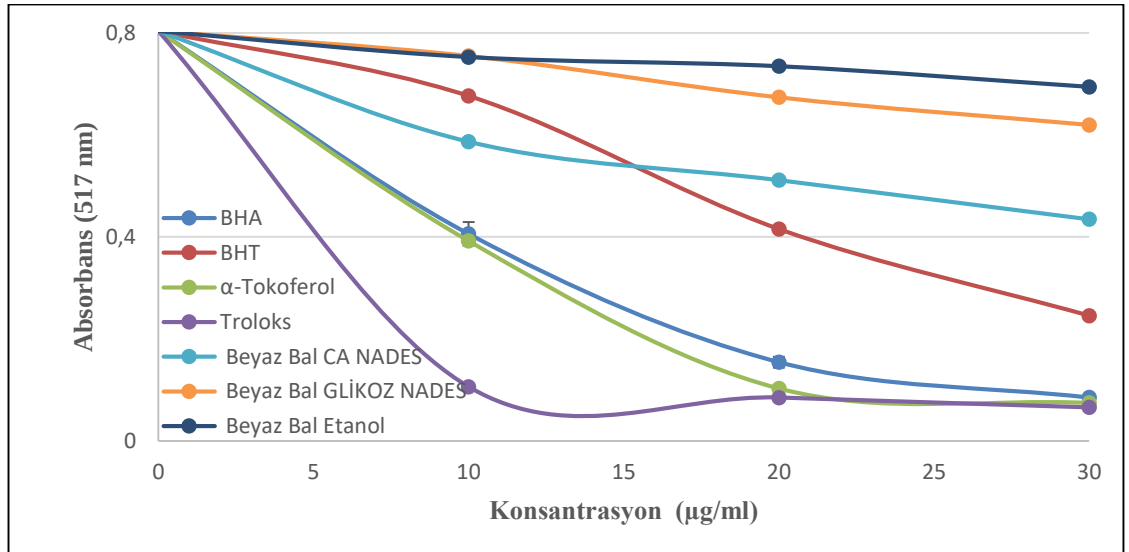
Bu konsantrasyonda (30 $\mu\text{g/mL}$), Beyaz Bal ile standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme aktiviteleri karşılaştırıldığında, indirgeme kapasitesine göre sıralamanın **BHA > Trolox > BHT > α -tokoferol > Beyaz Bal CA NADES > Beyaz Bal Glikoz NADES > Beyaz Bal Etanol** şeklinde olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.2. Beyaz Bal'ın 30 µg/ml Konsantrasyonunda İndirgeme Kapasitelerinin Standart Antioksidanlarla Mukayesesi

Antioksidanlar	Fe ³⁺ indirgeme	Cu ²⁺ indirgeme
	λ_{700}	λ_{450}
BHA	2,806±0,045	2,252±0,018
BHT	1,500±0,039	1,714±0,138
α -Tokoferol	1,123±0,045	1,010±0,111
Trolox	2,153±0,114	1,868±0,053
Beyaz Bal CA NADES	0,530±0,005	0,245±0,046
Beyaz Bal NADES	0,507±0,016	0,204±0,002
Beyaz Bal Etanol	0,482±0,007	0,168±0,005

4.2.3. DPPH Serbest Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları

Beyaz Bal ile çalışmada kullanılan standart antioksidan bileşikler (BHA, BHT, α -tokoferol ve trolox) için DPPH serbest radikali giderme aktivitelerinin belirlenmesine yönelik olarak, öncelikle standart eğri oluşturulmuştur ($r^2 = 0,9969$) (Şekil 4.9).



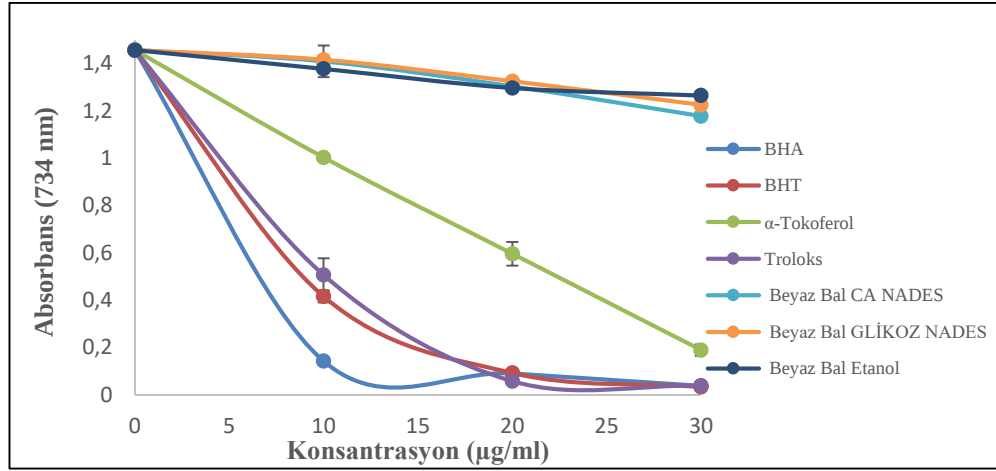
Şekil 4.9. DPPH Radikal Giderme Aktivitesi Tayini İçin Hazırlanan Standart DPPH Grafiği

Beyaz Bal çözeltisinin DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 4.9'da görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

Beyaz Bal çözeltisinin DPPH radikali giderme aktivitesi grafiği çizildikten sonra her bir standart, Bal-Etanol için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri hesaplandı (**Tablo 4.3**) Beyaz Bal'ın ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediler **Trolox > α -Tokoferol > BHA BHT > Beyaz Bal CA NADES > Beyaz Bal Glikoz NADES > Beyaz Bal Etanol**

4.2.4. ABTS Radikal Giderme Aktivitesi Bulguları

DPPH serbest radikali giderme aktivitesine benzer şekilde, ABTS^{•+} radikalini giderme yöntemi de sulu karışımların, içeceklerin, bitki ekstraktlarının veya saf maddelerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Miller, 1996; Gülçin vd., 2007b). Bu yöntemin uygulanabilmesi için öncelikle ABTS'den ABTS^{•+} radikalini oluşturulması gerekmektedir. ABTS'nin kimyasal yapısı Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Bu amaçla, 0,1 M ve pH 7,4 olan fosfat tamponu içerisinde 2 mM'lık ABTS çözeltisi hazırlanmış ve üzerine 2,45 mM'lık potasyum persülfat çözeltisi ilave edilmiştir (Gülçin, 2007). Hazırlanan karışım, ışıkla temasını engellemek amacıyla alüminyum folyo ile sarılmış bir erlen içinde, oda sıcaklığında ve manyetik karıştırıcı eşliğinde 12 saat karıştırılmıştır. Oluşan ABTS^{•+} çözeltisi, 734 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değeri $0,750 \pm 0,025$ olacak şekilde fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Bu aşamadan sonra, Beyaz Bal çözeltisi ile birlikte BHA, BHT, α -tokoferol ve trolox gibi standart antioksidan bileşiklerin ABTS^{•+} radikal giderme aktivitelerinin tayini amacıyla grafik oluşturulmuştur (**Şekil 4.10.**). Pozitif kontrol olarak BHA, BHT, α -Tokoferol ve Trolox kullanıldı (**Tablo 4.3.**)



Şekil 4.10. Farklı Konsantrasyonlardaki Beyaz Bal'ın (10-30 µg/ml) ABTS^{•+} Giderme Aktivitesinin Birer Standart Antioksidan Olan BHA, BHT, α-tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırması

Beyaz Bal çözeltisinin ABTS^{•+} radikali giderme aktivitesi çizildikten sonra (Şekil 4.10) her standart ve beyaz bal için ayrı ayrı IC₅₀ değerleri hesaplandı (Çizelge 4.3). Bal Etanol ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde ABTS^{•+} giderme aktivitesi sergilediler: **BHA > BHT > α Tokoferol > Trolox > Beyaz Bal CA NADES > Beyaz Bal Glikoz NADES > Beyaz Bal Etanol** şeklindedir.

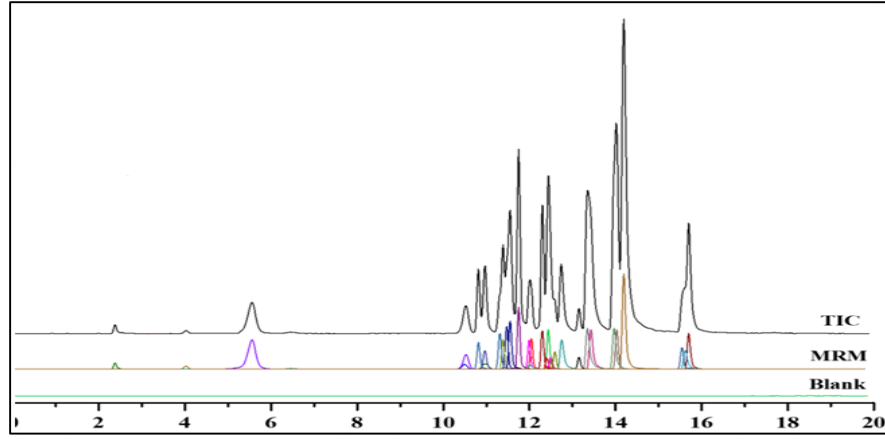
Tablo 4.3. Beyaz Bal Çözeltisinin DPPH[•] ve ABTS^{•+} Radikal Giderme Aktivitelerine ait IC₅₀ Değerlerinin, Standart Antioksidanlar Olan BHA, BHT, α-tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırılması.

Antioksidanlar	DPPH [•] Giderme		ABTS ^{•+} Giderme	
	IC ₅₀	R ²	IC ₅₀	R ²
BHA	9,05	0,9958	5,03	0,9739
BHT	19,2	0,9422	5,21	0,9986
α-Tokoferol	8,11	0,9875	11,75	0,9507
Trolox	6,90	0,9274	5,29	0,9894
Beyaz Bal CA NADES	31,64	0,9619	108,28	0,9544
Beyaz Bal Glikoz NADES	81,53	0,9873	130,75	0,9614
Beyaz Bal Etanol	141,43	0,9734	135,88	0,9755

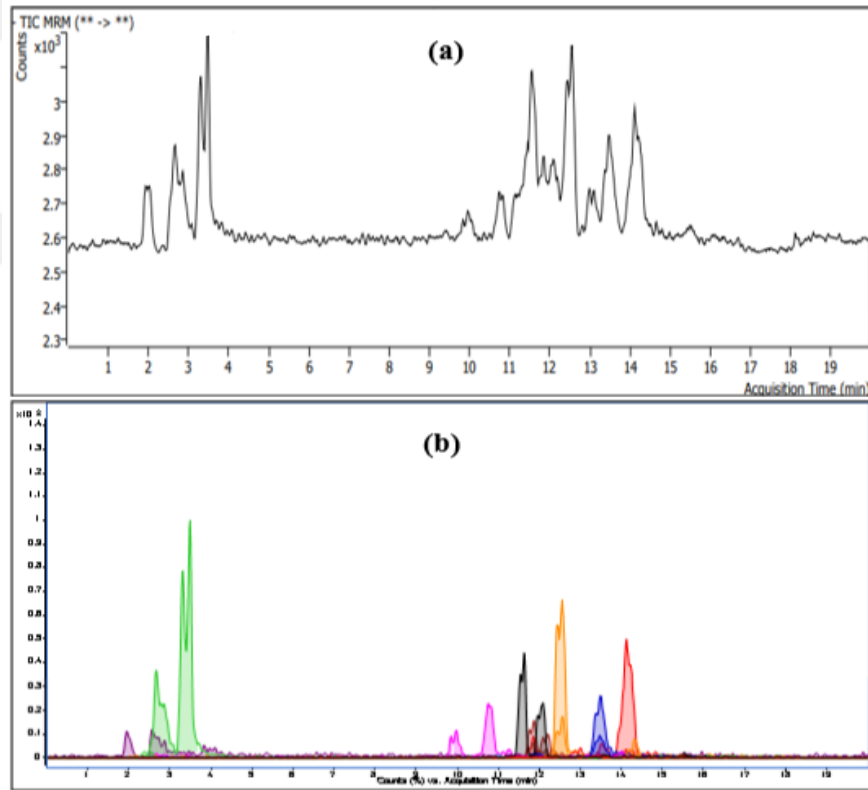
4.3. Beyaz Bal Örneğinin Sekonder Metabolit Profili

LC-MSMS tekniği ile 35 adet sekonder metabolitin kalitatif ve kantitatif analizini gerçekleştirildi. Oluşturulan standart kromatogramı (toplam iyon ve MRM

kromatogramları) Şekil 4.11’de paylaşılmıştır. Beyaz bal örneğine ait toplam iyon ve MRM kromatogramları ise Şekil 4.12’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.11. LC-MS/MS tekniği ile oluşturulan standart toplam iyon (a) ve MRM kromatogramları



Şekil 4.12. Beyaz bal örneğine ait toplam iyon (a) ve MRM (b) kromatogramları

Metotda belirlenen analitlere ait alıkonma süreleri, takip edilen parçalanma iyonları, çarpışma enerjileri, uygulanan potansiyel polariteleri, validasyon

parametreleri ve beyaz bal örneğinin sahip olduğu sekonder metabolit profili **Tablo 4.4**'de paylaşılmıştır.



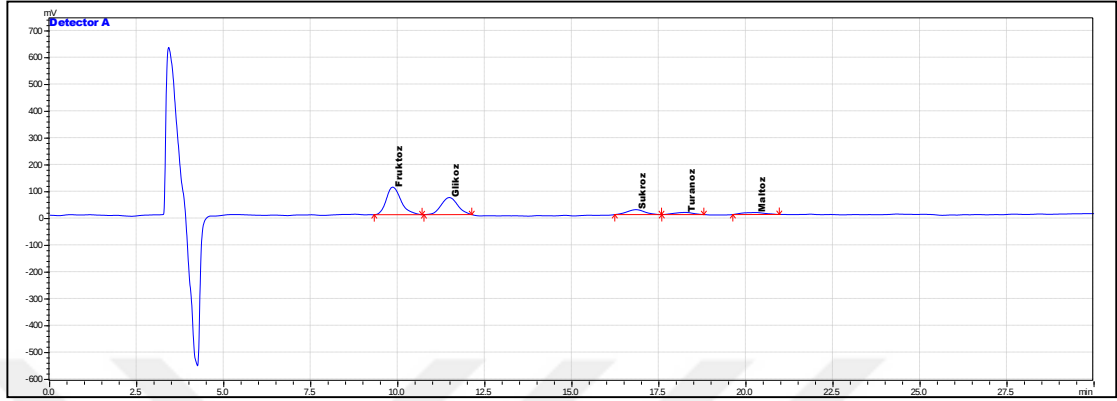
Tablo 4.4. Beyaz bal örneğinin sekonder metabolit profili

Analitler	Akılınma Süresi (dk)	Moleküler İyon ^a (m/z)	Parçalanma İyonu ^a (m/z)	CE ^b	Polarite	R ²	Kalibrasyon (ng/mL)	Arağı LOD/LOQ ^c (ng/mL)	Kantitatif Sonuç (µg analit/G Ekstre)
1. Kinik Asit	2,664	168,9	79,0 / 124,9	12 / 24	–	0,9994	100 – 2000	54,54/181	0,991
2. Fumarik Asit	3,971	352,9	190,9	14	–	0,9997	100 – 2000	33,91/ 113	0,046
3. Gallik Asit	5,577	137,0	93,1 / 65,4	14 / 96	–	0,9994	100 – 2000	50,76/ 169	<LOD
4. Piogallol	6,624	178,8	134,8	14	–	0,9996	100 – 2000	43,34/ 144	<LOD
5. Kerasyanin Klorür	11,842	166,9	151,9 / 122,9	12 / 8	+	0,9992	100 – 2000	62,17/ 207	0,149
6. Siyanidin-3-O-glukozit	11,148	169,9	122,8 / 181,8	10 / 14	+	0,9997	100 – 2000	33,27/ 110,	0,027
7. Klorojenik Asit	10,787	300,8	283,4 / 228,7	34 / 28	–	0,9997	100 – 2000	37,9/ 126	0,008
8. Kateşin	10,891	163,0	118,9 / 92,8	14 / 34	–	0,9995	100 – 2000	46,03/ 153	<LOD
9. Peonidin-3-O-glukozit	11,089	222,8	163,9 / 207,8	8 / 10	+	0,9938	100 – 2000	176,78/589	<LOD
10. 4-Hidroksibenzoik Asit	11,305	193,0	134,0 / 177,9	10 / 14	–	0,9986	100 – 2000	82,035/ 273	<LOD
11. Epikateşin	11,370	358,8	160,8 / 196,6	14 / 14	–	0,9989	100 – 2000	74,11/247	<LOD
12. Epigallokateşin Gallat	11,568	592,8	284,7	28	–	0,9993	100 – 2000	58,89/ 196	<LOD
13. Kafeik Asit	11,563	447,1	284,8 / 283,8	18 / 26	–	0,9957	100 – 2000	147,60/492	<LOD
14. Vanilik Asit	11,637	289,1	244,9 / 202,9	12 / 18	–	0,9991	100 – 2000	65,94/ 219	<LOD
15. Siringik Asit	11,591	460,9	298,8	16	–	0,9990	100 – 2000	68,47/ 228	<LOD
16. Viteksin	11,772	289,0	244,9 / 202,9	12 / 18	–	0,9989	100 – 2000	74,54/248	<LOD
17. Naringin	11,988	456,8	304,9 / 168,8	16 / 14	–	0,9998	100 – 2000	23,12/ 77	<LOD
18. Ellagik Asit	11,964	430,9	310,9 / 340,6	22 / 22	–	0,9996	100 – 2000	41,012/ 136	<LOD
19. Hesperidin	12,088	579,0	270,8 / 458,6	26 / 34	–	0,9996	100 – 2000	43,23/ 144	0,071
20. p-Kumarik Asit	12,333	609,0	300,9	22	–	0,9996	100 – 2000	42,13/ 140	<LOD
21. Sinapik Asit	12,431	302,9	124,7 / 284,9	8 / 22	–	0,9993	100 – 2000	56,74/ 189	<LOD
22. Taksofilin	12,499	316,9	150,9 / 178,8	18 / 24	–	0,9983	100 – 2000	92,24/ 307	<LOD
23. Ferulik Asit	12,505	284,9	132,9 / 150,9	26 / 36	–	0,9997	100 – 2000	32,10/ 107	<LOD
24. Rosmarinik Asit	12,555	300,9	150,7 / 178,7	16 / 20	–	0,9998	100 – 2000	29,65/ 98	0,898
25. Vanilin	12,464	268,9	224,8 / 116,8	20 / 42	–	0,9994	100 – 2000	50,43/ 168	0,044
26. Mirisetin	12,716	270,9	150,8 / 118,8	14 / 28	–	0,9991	100 – 2000	67,35/ 224	<LOD
27. Rezveratrol	12,504	314,9	299,8 / 150,6	20 / 30	–	0,9947	100 – 2000	163,45/544	0,002
28. Luteolin	13,400	252,8	208,8 / 106,6	22 / 24	–	0,9419	100 – 2000	559,31/1864	<LOD
29. Kuersetin	13,384	268,9	168,8 / 212,8	24 / 28	–	0,9159	100 – 2000	682,58/2275	<LOD
30. Apigenin	14,010	226,8	184,8 / 142,9	14 / 14	–	0,9322	100 – 2000	607,49/2024	<LOD
31. Naringenin	14,038	366,9	216,9 / 148,9	8 / 14	–	0,9360	100 – 2000	588,92/1963,	<LOD
32. İzorhamnetin	14,122	151,0	135,8 / 91,9	10 / 20	–	0,9538	100 – 2000	495,69/1652	<LOD
33. Krişin	15,663	190,9	85,0 / 92,9	22 / 22	–	0,9841	100 – 2000	286,10/953	<LOD
34. Galangin	15,575	114,9	71,1	4	–	0,8995	100 – 2000	752,73/2509	<LOD
35. Kurkumin	16,396	124,9	96,6 / 106,7	14 / 14	–	0,9963	100 – 2000	136,31/ 54	<LOD

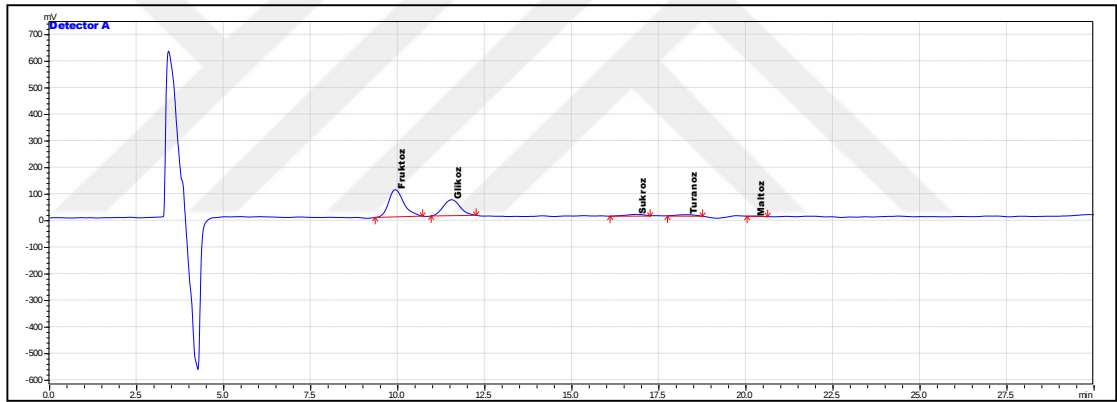
^a Standart bileşiklerin moleküler ve parçalanma iyonları (kütle/yük oranı), ^b İlgili parçalanma iyonlarına ait çarpışma enerjileri, ^c Saptama Limiti / Miktar Tespit Limiti.

4.4. Beyaz Bal Örneğinin Şeker Profili

TS 13359 standına göre elde edilen standart kromatogram ve Beyaz Bal örneğine ait kromatogram Şekil 13-14’de paylaşılmıştır.



Şekil 4.13. Şeker standartları ile oluşturulan standart kromatogram



Şekil 4.14. Beyaz Bal örneğine ait HPLC kromatogramı

Gerçekleştirilen analiz neticesinde 100 g Beyaz Bal örneğinde 41,20 g fruktoz, 29,05 g glukoz, 4,02 g sakaroz, 4,50 g turanoz ve 0,40 g maltoz içeriği belirlenmiştir.

4.5. Beyaz Bal Örneğinin Prolin, Diastaz Sayısı ve Nem Muhteiyatı

TS 13357 metoduna göre gerçekleştirilen prolin analizi sonucunda 100 g Beyaz Bal örneğinde 30,4 mg prolin tespit edilmiştir. Phadebas metoduna göre gerçekleştirilen analizde ise diastaz sayısı 13,02 olarak belirlenmiştir. TS 13365 metoduna göre gerçekleştirilen analizde ise 100 g Beyaz Bal örneğinde 15,8 g su muhteiyatı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.5. Beyaz bal örneğinin prolin, diastaz sayısı ve nem miktarı

Parametre	Değer	Birim	TGK Sınır Değeri
Prolin	304,26	mg/kg	≥ 300
Diastaz Sayısı	13,02	Göthe	≥ 8
Nem	15,8	%	≤ 20

TGK: Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (2022)



BEŞİNCİ BÖLÜM

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Asetilkolinesteraz (AChE), insanlarda bulunan kolinesteraz izoformlarının ilki olup kolinerjik sinapslarda asetilkolinin parçalanmasından sorumludur ve beyin fonksiyonlarının yaklaşık %80'ini etkilediği bildirilmiştir (Shidore vd. 2016). Hem eritrositlerde hem de beyin dokusunda yüksek miktarda bulunan bu enzim, kolin esterlerine yönelik güçlü hidrolitik aktivitesi sayesinde asetilkolini asetat ve koline kadar hızla çözebilmektedir (Kaplay, 1976; Chatonnet and Lockridge, 1989). Sinaptik aralıkta biriken asetilkolini parçalayıp nörotransmitter olarak etkisini sonlandıran AChE, ilk kez 1914 yılında Henry H. Dale tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra Otto Loewi'nin kurbağa kalpleri üzerinde gerçekleştirdiği deneyler, asetilkolinin sinir iletiminde görev alan bir kimyasal haberci olduğunu ortaya koymuş ve bu çalışma 1936'da Nobel Ödülü ile onurlandırılmıştır. Söz konusu bulgular, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda asetilkolin metabolizmasının kritik bir rol oynadığını göstermiştir (Jokanović and Maksimović, 1997). AChE aktivitesindeki aşırı artışın yol açtığı bu bozuklukların tedavisinde günümüzde donepezil ve takrin gibi sentetik inhibitörler kullanılmakla birlikte, bu ilaçların çeşitli istenmeyen yan etkilere neden olabildiği de raporlanmıştır (Bal vd 2020).

Alzheimer hastalığı, beyinde asetilkolin düzeylerinin azalmasıyla karakterizedir; bu azalma, sinaptik iletimin aksamasına yol açar. Hastalığın ilerlemesini durdurmak veya yavaşlatmak amacıyla asetilkolin yıkımının engellenmesi; dolayısıyla AChE inhibitörlerinin kullanımı kritik öneme sahiptir. Hastalığın patojeninde kolinerjik sistemin temel elemanları olan AChE ve BChE enzimlerinin aşırı aktivitesi, sinaptik aralıktaki asetilkolin ve bütirilkolin düzeylerinin düşmesine yol açarak bilişsel fonksiyon kaybını hızlandırmaktadır (Ferreira-Vieira vd. 2016). Alzheimer tedavisinde geliştirilen ve kullanılan farmasötikler, asetilkolin seviyesini dengelemeyi hedefler (Heinrich and Teoh, 2004). Sinaptik boşlukta görevini tamamlayan asetilkolin; AChE tarafından kolin ve asetata hidrolizlenerek inaktive edilir.

Literatürde, AChE inhibitörlüğüne yönelik tasarlanmış sentetik moleküller yaygın olarak incelenmişse de bunların başlıca yan etkileri arasında gastrointestinal rahatsızlıklar, hepatotoksisite, bulantı, kusma, ishal ve baş dönmesi yer alır (Schulz, 2003; Mukherjee vd. 2007). Bu olumsuz etkiler, daha güvenli ve etkin doğal AChE inhibitörlerine yönelimi artırmaktadır.

Bu bilgiler ışığında, beyaz balın AChE ve BChE enzimleri üzerine inhibitör potansiyelleri araştırılmıştır. Beyaz balın AChE ve BChE enzimleri inhibisyon çalışmaları Ellman metodu (Ellman, 1961) kullanılarak belirlenmiş; IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar pozitif kontrol olan tacrin molekülü ile mukayase edilmiş sonuçların tamamı Tablo 5.1.'de verilmiştir. Beyaz balın AChE ve BChE enzimi üzerine gerçekleştirilen inhibisyon çalışmasında elde edilen bulguların ileride gerçekleştirilecek ilaç tasarım çalışmalarına rehberlik edebilecek ve yeni fikirler sunabilecek nitelikte olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 5.1. AChE, BChE ve α - Glikozidaz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerinde İnhibisyon Etkisi Gösteren Beyaz Bal'ın %50 İnhibisyona Sebep Olan Beyaz Bal Konsantrasyonları IC₅₀ Değerleri.

	AChE		BChE		α - Glikozidaz	
	IC ₅₀ (μ g/mL)	R ²	IC ₅₀ (μ g/mL)	R ²	IC ₅₀ (μ g/mL)	R ²
Beyaz Bal	163,89	0,9452	203,37	0,9576	394,59	0,9514
Takrin*	108,23	0,9858	3,77	0,9860	-	-
Akarboz**	-	-	-	-	93,95	0,9862

*:nM, **:μM

Ayrıca bu çalışmada, beyaz balın α -Glikozidaz enzimi üzerine inhibisyon etkisi incelenmiş ve inhibisyon potansiyelinin bir ifadesi olan IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. IC₅₀ değerinin μ M seviyede olduğu, çizilen % Aktivite/[Beyaz Bal] grafiğinde verilen denklemden hesaplanarak tespit edilmiştir. Bu durum, beyaz balın içerdiği biyoaktif bileşiklerin enzimi inhibe edici özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

α -Glikozidaz enzimi bilindiği üzere, bağırsak mukozasındaki disakkaritlerin glikoz monomerlerine parçalanmasında görev alan metabolik açıdan önemli bir enzimdir. Bu enzimin aktivitesinin inhibisyonu, karbonhidrat emilimini geciktirerek yemek sonrası (postprandiyal) kan glukoz yükselmelerini önlemede önemli bir unsur olarak kabul edilmektedir. (Lebovitz, 1997; Maharramov vd. 2021). Özellikle Beyaz bal'ın α -Glikozidaz enzimi üzerine mikromolar seviyede inhibisyon etkisinin olması, tip 2 diyabetin beslenme temelli kontrolünde potansiyel bir yardımcı olma özelliğini ortaya çıkarmıştır. Beyaz bal'ın elde edilen mikromolar seviyedeki IC₅₀ değeri, özgün bileşen profiline sahip olduğunu göstermektedir. Özgün bileşen profili, balın floral kaynağına, arı türüne ve işlenme koşullarına bağlı olarak değişebilir. Beyaz balın da benzer bir potansiyele sahip olabileceği, ancak bu etkinin içerdiği spesifik fenolik bileşiklere ve sinerjistik etkilere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Çalışmanın diğer bir ayağında LC-MS-MS, HPLC tekniklerle içerdiği molekül çeşitliliği ve miktar analizleri de yapılmıştır.

Beyaz balın fonksiyonel gıda olarak etkili olacağı α -Glikozidaz enzimini inhibe etmesi açısından önemlidir. Çünkü bu durum metabolizmada glisemik kontrolü destekleyici etki sağlar. Bununla birlikte kolinerjik enzimler (AChE ve BChE) için inhibisyon potansiyel taşımasında nörodejenaratif etkiler için iyileştirici ya da yavaşlatıcı etki yapabileceği düşünülmektedir. Çalışma *in vitro* koşullarda yapılmış ve elde edilen bu verilerin *in vivo* ortama nasıl yansıdığı, biyoaktif bileşiklerin biyoyararlanımı ve metabolizmadaki stabilitesi gibi faktörler gelecekte yapılacak hayvan deneyleri ve klinik çalışmalarla yön verebilir.

Erzurum Narman bölgesine ait beyaz bal örneğinin hem kolin esteraz (AChE, BChE) hem de α -glikozidaz enzimleri üzerinde ölçülebilir bir inhibitör etki sergilediğini göstermiştir. Sonuçlar **Tablo 5.1**'de verilmiştir. IC₅₀ değerlerine göre, Beyaz Bal'ın AChE inhibisyonu için 163,89 μ g/mL, BChE için 203,37 μ g/mL ve α -glikozidaz için 394,59 μ g/mL olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak tacrin molekülü kullanılmıştır.

Tez kapsamında enzim inhibisyonu çalışmalarını takiben antioksidan çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Antioksidan çalışmalarda kullanılan Beyaz bal örnekleri yani hazırlanan ekstratlar farklı metotlarla hazırlanmıştır. Geleneksel

maserasyon yöntemi ile hazırlanan ekstre etanol ile hazırlanmıştır. Bunun yanında ayrıca, NADES metodu ile iki ayrı ekstre Beyaz Bal CA NADES ve Beyaz Bal Glikoz NADES hazırlanmış antioksidan potansiyelleri değerlendirilmiştir. Çalışmalarda pozitif kontrol olarak BHA, BHT, Trolox ve α -tokoferol gibi moleküller kullanılmıştır.

Antioksidan çalışmaların ilk basamağı olarak, Beyaz Bal ekstralarının indirgeme potansiyeli araştırılmıştır. Fe^{3+} ve Cu^{2+} iyonlarını indirgeme metotları genellikle bal gibi doğal ürünlerin elektron verme kapasitesini, yani indirgeme gücünü ortaya koymak için kullanılır. Elektron donörü olarak davranabilen bileşenleri içeren doğal ürünlerin, serbest radikallerle mücadele yönünden güçlü potansiyele sahip olduğu bilinmektedir (Gheldof vd. 2002).

Beyaz balın hem ferrik Fe^{3+} hem de Cu^{2+} iyonlarını üzerine anlamlı indirgeme kapasitesi göstermesi, onu doğal bir antioksidan kaynağı olarak öne çıkarmaktadır. Beyaz Balın İndirgeme kapasitesi sadece serbest radikalleri uzaklaştırmakla kalmaz, aynı zamanda oksidatif stresle ilişkili hastalıkların (örneğin diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, bazı nörodejeneratif bozukluklar) önlenmesinde destekleyici rol oynayabilir. Yapılan çalışmada, beyaz balın 30 $\mu g/mL$ konsantrasyonunda absorbans değerleri standart moleküllerle mukayese edildiğinde Ferrik (Fe^{3+}) iyonları indirgeme gücü açısından sıralama **BHA > Trolox > BHT > α -Tokoferol > Beyaz Bal CA NADES > Beyaz Bal Glikoz NADES > Beyaz Bal Etanol** şeklinde belirlenmiştir. Ayrıca yine 30 $\mu g/mL$ konsantrasyonda Beyaz Bal ile standart antioksidanların kuprik iyonlarını (Cu^{2+}) kupröz iyonlarına (Cu^+) indirgeme aktiviteleri karşılaştırıldığında, indirgeme kapasitesine göre sıralamanın **BHA > Trolox > BHT > α -tokoferol > Beyaz Bal CA NADES > Beyaz Bal Glikoz NADES > Beyaz Bal Etanol** şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar **Tablo 5.2.**'de verilmiştir. Yüksek absorbans değeri yüksek indirgeme kapasitesini göstermektedir.

Tablo 5.2. Beyaz Bal'ın 30 µg/ml Konsantrasyonunda İndirgeme Kapasitelerinin Standart Antioksidanlarla Mukayesesi

Antioksidanlar	Fe ³⁺ indirgeme (λ 700)	Cu ²⁺ indirgeme (λ450)
BHA	2,806±0,045	2,252±0,018
BHT	1,500±0,039	1,714±0,138
α-Tokoferol	1,123±0,045	1,010±0,111
Trolox	2,153±0,114	1,868±0,053
Beyaz Bal CA NADES	0,530±0,005	0,245±0,046
Beyaz Bal NADES	0,507±0,016	0,204±0,002
Beyaz Bal Etanol	0,482±0,007	0,168±0,005

Beyaz bal antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için indirgeme metotlarının çalışılmasının yanısıra DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) serbest radikal süpürme yöntemleri de çalışılmıştır. Çalışılan her iki yöntem doğal ürünlerin radikalleri nötralize etme yani radikal giderme potansiyelini belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır (Gülçin, 2012)

DPPH yöntemi, sabit bir mor renkli radikal olan DPPH'nin, antioksidan moleküllerle reaksiyona girerek sarımsı renge dönüşmesi prensibine dayanır. Bu dönüşüm, elektron veya hidrojen atomu transferi yoluyla gerçekleşir (Gulcin, 2020). Beyaz balın DPPH radikalini süpürebilmesi, beyaz balın içerdiği bileşenlerin elektron/hidrojen verici özellikte olduğunu ve serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesine katkıda bulunduğunu gösterir. Bu etki, özellikle fenolik bileşikler, flavonoidler, askorbik asit ve bazı enzimatik içerikler sayesinde gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmada, Beyaz Bal'ın ve kullanılan standart antioksidan moleküller sırasıyla şu şekilde DPPH radikali giderme aktivitesi sergilediler **Trolox > α-Tokoferol > BHA > BHT > Beyaz Bal CA NADES > Beyaz Bal Glikoz NADES > Beyaz Bal Etanol**

Tablo 5.3. Beyaz Bal Çözeltisinin DPPH[•] ve ABTS^{•+} Radikal Giderme Aktivitelerine Ait IC₅₀ Değerlerinin, Standart Antioksidanlar Olan BHA, BHT, α -tokoferol ve Trolox ile Karşılaştırılması.

Antioksidanlar	DPPH-Giderme		ABTS ^{•+} Giderme	
	IC ₅₀	R ²	IC ₅₀	R ²
BHA	9,05	0,9958	5,03	0,9739
BHT	19,2	0,9422	5,21	0,9986
α-Tokoferol	8,11	0,9875	11,75	0,9507
Trolox	6,90	0,9274	5,29	0,9894
Beyaz Bal CA NADES	31,64	0,9619	108,28	0,9544
Beyaz Bal Glikoz NADES	81,53	0,9873	130,75	0,9614
Beyaz Bal Etanol	141,43	0,9734	135,88	0,9755

ABTS yöntemi ise geniş spektrumlu bir radikal giderme metodudur. ABTS bileşiği, potasyum persülfat (K₂S₂O₈) gibi bir oksidanla reaksiyona sokularak ABTS^{•+} (mavi-yeşil renkli katyon radikali) haline getirilir (Gülçin, 2020). Bu radikal, maksimum absorbansını genellikle 734 nm dalga boyunda verir. Numune eğer radikali giderme kapasitesine sahip ise bu radikal katyonla reaksiyona girer elektron veya hidrojen verir ve böylece ABTS^{•+} radikali nötralize edilir (Gülçin, 2020). Nötralizasyon oranı, çözeltinin renginin açılmasıyla kendini belli eder. Renk kaybı spektrofotometrik olarak 734 nm’de ölçülür. Absorbans azaldıkça antioksidan aktivite varlığı ispatlanmış olur. Çalışmada Beyaz bal ekstraktları üzerine denenen bu metodun sonuçları sırasıyla şu şekilde ABTS^{•+} giderme aktivitesi sergilediler: **BHA > BHT > α Tokoferol > Trolox > Beyaz Bal CA NADES > Beyaz Bal Glikoz NADES > Beyaz Bal Etanol** şeklindedir. Radikal giderme çalışmalarının bütün sonuçları **Tablo 5.3.**’de verilmiştir.

Çalışmanın bu aşamasına kadar tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, Beyaz bal AChE ve BChE üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu durum nörodejeneratif hastalıklarda kullanılan sentetik inhibitörlere kıyasla daha zayıf olsa da, Beyaz balın doğal ürün olması nedeni ile umut vericidir. Beyaz balın α -Glikozidaz inhibisyonu göstermesi ise karbonhidrat metabolizmasına olan olası etkisini desteklemekte, diyabet yönetimi açısından alternatif bir katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir. Beyaz bal ekstraktları indirgeme kapasitesi ve radikal giderme kapasitesi çalışmalarında standartlara kıyasla orta düzeyde antioksidan aktivite göstermiştir. Bu durum, balın içerdiği fenolik bileşikler, flavonoidler ve enzimler ile ilişkilendirilebilir. Ancak beyaz

balın düşük renk yoğunluğu ve polifenol içeriği, aktivite düzeyinin sınırlı olmasının bir nedenidir.

Çalışmanın devamında, beyaz bal numunesinin sekonder metabolit profili, şeker bileşimi ve kalite parametreleri modern analitik tekniklerle belirlenmiştir. LC-MS/MS analizleri, Yılmaz (2020) tarafından validasyonu yapılmış yöntem doğrultusunda gerçekleştirilmiş ve sekonder metabolit çeşitliliği ayrıntılı biçimde ortaya konulmuştur. Uygulanan gradient mobil faz programı sayesinde bileşiklerin farklı alıkonma sürelerine göre etkin ayrımı sağlanmış, çoklu reaksiyon görüntüleme (MRM) tekniği kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizler yapılmıştır.

Şeker profili, HPLC yöntemiyle belirlenmiş; fruktoz (%41,2) ve glukoz (%29,05) oranlarının yüksek olduğu, sakkaroz (%4,02), turanoz (%4,50) ve maltoz (%0,40) düzeylerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler beyaz bal numunesinin tipik monofloral özellikler taşıdığını göstermektedir.

Prolin miktarı UV-Vis spektrofotometri yöntemiyle yaklaşık 304,26 mg/kg olarak bulunmuş, bu durum balın olgunluk derecesi ve katkısızlığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Diastaz aktivitesi Phadebas tablet metodu kullanılarak belirlenmiş ve diastaz sayısı yaklaşık 13,02 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, balın enzim aktivitesinin ilgili mevzuat limitlerini sağladığını göstermektedir.

Refraktometrik yöntemle saptanan nem içeriği ise yaklaşık %15,8 olarak ölçülmüş ve bu sonuç balın fermantasyon riskinin düşük düzeyde olduğunu ve raf ömrü açısından uygun stabiliteye sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Genel olarak, elde edilen tüm analiz sonuçları, beyaz bal örneğinin hem kimyasal bileşimi hem de kalite parametreleri açısından güvenilir, olgun ve katkısız bir bal özelliği olduğunu göstermektedir. Bu veriler, ürünün kalite kontrol süreçlerine katkı sağlamakla birlikte, ticari değerinin artırılması açısından da önem arz etmektedir.

Beyaz balın biyolojik aktiviteleri ve kimyasal içeriği çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, beyaz balın AChE, BChE ve α -glukozidaz enzimleri üzerinde orta düzeyde inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular, beyaz balın özellikle nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi metabolik bozukluklarda destekleyici potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Antioksidan aktivite açısından değerlendirildiğinde, beyaz balın hem indirgeme kapasitesi hem de radikal giderme kapasitesi (DPPH[•], ABTS^{•+}) yöntemlerinde standart moleküllere kıyasla daha düşük olmakla birlikte, anlamlı düzeyde antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca beyaz balın sekonder metabolit profili de LC-MS-MS cihazı ile detaylı olarak analiz edilmiş, en yüksek oranda tespit edilen bileşiğin kinik asit olduğu belirlenmiştir. Kinik asit, literatürde antioksidan, antimikrobiyal ve antiinflamatuvar özellikleriyle bilinen bir fenolik asittir. (Ercan ve Doğru, 2022; Li vd. 2024). Bu bulgu, beyaz balın biyolojik aktivitesine katkı sağlayabilecek önemli bir kimyasal bileşeni işaret etmektedir. Beyaz balın şeker profili, HPLC yöntemi kullanılarak incelenmiş ve glikoz, fruktoz ve süktroz oranlarının bal için kabul edilen sınırlar içerisinde yer aldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, analiz edilen Beyaz bal örneğinin doğal olduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, beyaz balın hem kimyasal bileşimi hem de biyolojik aktiviteleri açısından fonksiyonel bir gıda olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. ve Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, (1), 70-71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>
- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. ve Tambyrajah, V. (2004). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical Communications*, (1), 70-71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>
- Ahmed, S. ve diğerleri. (2020). Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-11.
- Akhmetova, R., Sibgatullin, J., Garmonov, S. ve Akhmetova, L. (2012). Technology for extraction of bee-bread from the honeycomb. *Procedia Engineering*, 42, 1822-1825.
- Akıncıoğlu, A., Akbaba, Y., Göçer, H., Göksu, S., Gülçin, İ. ve Supuran, C. T. (2013). Novel sulfamides as potential carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21, 1379-1385.
- Akıncıoğlu, A., Topal, M., Gülçin, İ., Göksu, S. (2013). Novel sulphamides and sulphonamides incorporating the tetralin scaffold as carbonic anhydrase and acetylcholine esterase inhibitors. *Archiv der Pharmazie*, 347, 68-76.
- Al-Habori, M., Al-Meer, A. ve Al-Mamary, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*, 22, 1041-1047.
- Ali, M. A., & Kunugi, H. (2020). Apitherapy for Parkinson's disease: A focus on the effects of bee venom and royal jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4460.
- Aljadi, A. M. ve Kamaruddin, M. Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85(4), 513-518. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00596-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00596-4)
- Alvarez-Suarez, J. M. ve diğerleri. (2014). Honey as a source of dietary antioxidants: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(4), 470-478.
- Al-Waili, N. S. ve diğerleri. (2003). The antimicrobial and healing properties of honey. *Journal of Medicinal Food*, 6(2), 85-88.
- Al-Waili, N. S. ve diğerleri. (2013). Honey and cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Nutrition*, 143(4), 494-502. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0285>
- Al-Waili, N. S., Salom, K., Al-Ghamdi, A. A., & Ansari, M. J. (2012). Honey and microbial infections: A review supporting the use of honey for microbial control. *Journal of Medicinal Food*, 15(12), 1079-1096.
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N. ve Dash, C. K. (2019).

Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(1), 1695-1703.

- Anonim. (2003b). Bal Yaraları İyileştiriyor. <http://www.hekimce.com/konu.php?konu=1833>
- Antinelli, J. F., Zeggane, S., Davico, R., Rognone, C., Faucon, J. P. ve Lizzani, L. (2003). Evaluation of (E)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. *Food Chemistry*, 80(1), 85-89.
- AOAC (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International. 20th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. ve Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanism and electron transfer (ET)-based assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(5), 997-1027.
- Aslantürk, Ö. S. (2010). *Aydın Yöresi'nde Kullanılan Bazı Tıbbi Bitkilerin Antioksidant ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması* [Doktora Tezi]. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Atayoğlu, A. T., Soylu, M., Silici, S. ve İnanç, N. (2016). Glycemic index values of monofloral Turkish honeys and the effect of their consumption on glucose metabolism. *Turkish Journal of Medicinal Sciences*, 46, 483-488.
- Atkins, C. A., Patterson, B. D. ve Graham, D. (1972). Plant carbonic anhydrases. Preparation and some properties of monocotyledon and dicotyledon enzyme types. *Plant Physiology*, 50, 218-223.
- Banerjee, S. K. ve Bonde, C. G. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Bridelia Retusa* Spreng Bark: Impact of dielectric constant and geographical location. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 817-822.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L. ve Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2019). The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry*, 155, 1–11.
- Banyai, K. ve diğerleri. (2017). The immunological effects of honey: A review. *Journal of Apicultural Research*, 56(2), 169-179.
- Baracchi, D. ve Turillazzi, S. (2010). Bireylerde zehir ve kütiküler peptitlerdeki farklılıklar *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) MALDI-TOF MS. *Journal of Insect Physiology*, 56, 366-375.
- Baracchi, D., Brown, M. J. F. ve Chittka, L. (2015). *Bombus* arılarında kendi kendine ilaç tedavisi için davranışsal kanıt? *F1000Research*, 4, 73.

- Baynes, J. W., & Thorpe, S. R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, 48(1), 1–9. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.1.1>
- Beretta, G. ve diğerleri. (2007). Antioxidant activity of different floral origin honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9153-9160.
- Berger, M. M. (2005). Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*, 24(2), 172-183.
- Beydemir, Ş. ve Gülçin, İ. (2004). Effect of melatonin on carbonic anhydrase from human erythrocyte *in vitro* and from rat erythrocyte *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 193-197.
- Beydemir, Ş., Çiftçi, M. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2002). Effects of gentamicine sulfate on enzyme activities of carbonic anhydrase from human erythrocytes *in vitro* and from rat erythrocytes *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 966-969.
- Beydemir, Ş., Hisar, O., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö. İ. ve Supuran, C. T. (2005). Effects of low molecular weight plasma inhibitors rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) on human erythrocyte carbonic anhydrase-II isozyme activity *in vitro* and rat erythrocytes *in vivo*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 35-39.
- Bhandari, B., D'Arcy, B. ve Kelly, C. (1999). Rheology and crystallization kinetics of honey: present status. *International Journal of Food Properties*, 2(3), 217-226.
- Bi, W., Tian, M. ve Row, K. H. (2019). Evaluation of natural deep eutectic solvents in the extraction of bioactive natural products. *Journal of Separation Science*, 42(2), 201-213.
- Birt, D. F. ve diğerleri. (2001). Dietary flavonoids and cancer prevention. *Cancer Detection and Prevention*, 25(4), 322-328.
- Bleha, R., Shevtsova, T., Kružík, V., Brindza, J. ve Sinica, A. (2019). Morphology, physicochemical properties and antioxidant capacity of bee pollens. *Czech Journal of Food Sciences*, 37(1), 1-8. <https://doi.org/10.17221/139/2018-CJFS>
- Bogdanov, S. (2009). Honey composition. *The Honey Book*, 1-9.
- Bogdanov, S. (2011b). Royal jelly, bee brood: composition, health, medicine: a review. *Lipids*, 3(8), 8-19.
- Bogdanov, S. (2012a). Honey as nutrient and functional food. *Proteins*, 1100, 1400-2700.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R. ve Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677-689.
- Bogdanow, S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 30*, 748-753.
- Bottcher, K., Waheed, A. ve Sly, W. S. (1994). Membrane-associated carbonic anhydrase from the Crab Gill: Purification, characterization, and comparison with mammalian CAs. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 312, 429-435.

- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813–820
- Brudzynski, K. ve Sjaarda, C. (2015). Antimikrobiyal peptitler içeren bal glikoproteinleri, ana arı sütü proteini 1'in jelleinleri, balın hücre duvarı litik ve bakterisidal aktivitelerinden sorumludur. *PLoS ONE*, 10, e0120238.
- Burlando, B., & Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306–313.
- Burlando, B., & Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306
- Burt, E., Darlington, M. V., Graf, G. ve Meyer, H. J. (1992). Isolation, purification and characterization of an insect carbonic anhydrase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22, 285-291.
- Chandimali, N., Bak, S. G., Park, E. H., Lim, H. J., Won, Y. S., Kim, E. K., ... & Lee, S. J. (2025). Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: A review. *Cell death discovery*, 11(1), 19
- Chen, L., Wang, X., & Liu, Y. (2020). An overview on the role of bioactive α -glucosidase inhibitors in diabetes management. *Journal of Functional Foods*, 65, 103734. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7480666/>
- Chen, Y. C., Sugiyama, Y., Abe, N., Kuruto-Nima, R., Nozawa, R. ve Hirota, A. (2005). DPPH radical scavenging compounds from Dou-Chi, a soybean fermented food. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69, 999-1006.
- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, 11(2-3), 153-177.
- Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y. ve Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiology*, 156(4), 1701-1705.
- Connor, L. J. ve Muir, R. G. (2013). Pollen and Bee Bread. *American Bee Journal*, 153, 727-729.
- Coşkun, P. (2022). Balın geleneksel kullanımı, terapötik özellikleri ve antioksidan aktivitesi. *Uluslararası Gıda, Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 2(2), 42-55.
- Cui, K., Luo, X. ve Murthy, M. R. V. (2004). Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28*, 771-799.
- Cummings, J. L. (2004). Alzheimer's Disease: Pathophysiology and Therapeutic Implications. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*, 18(4), 5-14.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dağ, A., Gürcan, E. K., & Öztürk, F. (2020). Determination of pollen diversity and physicochemical properties of Turkish honeys. *Apidologie*, 51(3), 370–382.

- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R. ve Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61-68.
- Darvesh, S., Hopkins, D. A. ve Geula, C. (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 131-138.
- Doner, L. W. (1977). Balın şekerleri-bir inceleme. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28, 443-456.
- Dustmann, J. H. (1979). Balın antibakteriyel etkisi. *Apiacta*, 14, 7-11.
- Ellefson, W., Lilla, Z. ve Crowley, R. (2006). Quantification and evaluation of antioxidants in food and botanical products. *International Conference on Nutraceuticals and Functional Foods*, 5-8 Kasım, Reno, Nevada.
- Ercan, L., & Doğru, M. (2022). Antioxidant and antimicrobial capacity of quinic acid. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11(4), 1018-1025.
- Erejuwa, O. O. ve diğerleri. (2014). Honey and its anti-inflammatory and antioxidant properties: a review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014*, 1-13.
- Erzincan, R., Caglayan, C., Kandemir, F.M., İzol, E., Gür, C., İleritürk, M. (2025). Hepatoprotective Effects of Royal Jelly Against Vincristine-Induced Hepatotoxicity in Rats: A Biochemical and Molecular Study. *Life*, 15(3), 459.
- Feldstein, J. B. ve Silverman, D. N. (1984). Purification and characterization of carbonic anhydrase from the saliva of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 259, 5447-5453.
- Fratini, F., Cilia, G., Turchi, B., & Felicioli, A. (2016). Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9), 839-843.
- Furtado-Alle, L., Tureck, L. V., de Oliveira, C. S., Hortega, J. V., & Souza, R. L. (2023). Butyrylcholinesterase and lipid metabolism: Possible dual role in metabolic disorders. *Chemico-Biological Interactions*, 383, 110680.
- Gheldof, N., Wang, X. H., & Engeseth, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 5870-5877.
- Gould, K. S. ve diğerleri. (2009). *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*. Springer Science & Business Media.
- Göçer, H., Akıncıoğlu, A., Öztaşkın, N., Göksu, S. ve Gülçin, İ. (2013). Synthesis, antioxidant, and antiacetylcholinesterase activities of sulfonamide derivatives of dopamine-related compounds. *Archiv der Pharmazie*, 346, 783-792.
- Greig, N. H. ve diğerleri. (2001). Pharmacological basis for the therapeutic use of cholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Drugs & Aging*, 18(11), 871-880.

- Greig, N. H., Utsuki, T., Yu, Q. S., Zhu, X., Holloway, H. W., Perry, T. ve Brossi, A. (2002). A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: Attention to butyrylcholinesterase. *Current Medicinal Chemistry*, 9(10), 1187-1197.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gülçin, İ. (2006). Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sciences*, 78(8), 803-811.
- Gülçin, İ. (2007). Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L tyrosine and L Dopa. *Amino Acids*, 32(3), 431-438.
- Gülçin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715.
- Gülçin, İ., Elmastaş, M., & Aboul Enein, H. Y. (2007). Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil Ocimum basilicum L Family Lamiaceae assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21(4), 354-361.
- Gülçin, İ., Kaya, R., Goren, A. C., Akincioglu, H., Topal, M., Bingol, Z. ve Alwasel, S. (2019). Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts: polyphenol contents analysis by LC-MS/MS. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1511-1526.
- Güler, A. (2006). *Bal arısı (Apis mellifera L.) Yetiştiriciliği Hastalıkları ve Ürünleri*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Kitabı No: 55.
- Güzel, N., & Bahçeci, K. S. (2020). Çorum yöresi ballarının bazı kimyasal kalite parametrelerinin değerlendirilmesi. *Gıda*, 45(2), 230-241.
- Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M. ve Gurkan, B. (2021). Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications. *Chemical Reviews*, 121(3), 1232-1285.
- Harborne, J. B. ve Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Hayyan, M., Hashim, M. A. ve Hayyan, A. (2015). In vitro and in vivo toxicity profiling of deep eutectic solvents. *PLoS ONE*, 10(2), e0117934.
- Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L. ve Katan, M. B. (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57(1), 43-46.
- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huang, M. T. ve diğerleri. (2013). Antioxidant and anti-inflammatory properties of tannins. *Molecules*, 18(8), 10142-10156.
- Inci, H., İzol, E., Yılmaz, M. A., İlkaya, M., Bingöl, Z. ve Gülçin, İ. (2023). Chemical content and biological activities of bee products. *Chemistry & Biodiversity*, 20, e202300654.

- İzol, E. (2025). Molecular docking-guided in-depth investigation of the biological activities and phytochemical and mineral profiles of endemic *Phlomis capitata*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 105(7), 3760-3775.
- İzol, E. (2016). Bazı *Allium* (Yabani Sarımsak) türlerinin aflatoksin, ağır metal ve sekonder metabolit içeriklerinin ICP-MS ve LC-MS/MS ile belirlenmesi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Dicle Üniversitesi.
- İzol, E. (2022). Arı ürünlerinin sağlıklı beslenmedeki önemi. Haspolat, Y. K. ve Ertuğrul, S. (Ed.), *Sağlıklı Yaşam ve Beslenme* içinde (s. 313-323). Orient Publications.
- İzol, E. (2023). Bazı Arı Ürünlerinin (Bal, Polen, Propolis, Arı Sütü ve Arı Ekmeği) LC-MS/MS ile Sekonder Metabolitlerinin ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Doktora tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- İzol, E., Bursal, E., Yapıcı, İ., Yılmaz, M. A., Yılmaz, İ. ve Gülçin, İ. (2024). Chemical content by LC-MS/MS, antiglaucoma, and antioxidant activity of propolis samples from different regions of Türkiye. *Journal of Food Biochemistry*, 2024(1), 7488590.
- İzol, E., Turhan, M. (2024). In-depth phytochemical profile by LC-MS/MS, mineral content by ICP-MS, and in-vitro antioxidant, antidiabetic, antiepilepsy, anticholinergic, and antiglaucoma properties of Bitlis propolis. *Life*, 14, 1389.
- İzol, E., Turhan, M., Yılmaz, M. A., Çağlayan, C. ve Gülçin, İ. (2025b). Determination of antioxidant, antidiabetic, anticholinergic, antiglaucoma properties and comprehensive phytochemical content by LC-MS/MS of Bingöl honeybee pollen. *Food Science & Nutrition*, 13(3), e4531.
- İzol, E., Yapıcı, İ. (2023). Bioactive phenolic content of bee bread. *3rd International Black Sea Modern Scientific Research Congress Full Texts Book* (s. 1109-1114). Konya, Türkiye.
- İzol, E., Yılmaz, M. A. ve Gülçin, İ. (2025a). Chemical characterization by chromatography techniques and comprehensive biological activities of Artvin bee products. *ChemistrySelect*, 10(18), e202501545.
- Karimi, A., Azizi, M. H. ve Gavligi, H. A. (2020). Mısır tohumu proteininden hidrolizatın ultrafiltrasyon ile fraksiyonlanması: İn vitro antidiyabetik ve antioksidan aktivite. *Food Science & Nutrition*, 8, 2395-2405.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2005). *Biyokimya*. Aktif Yayınevi.
- Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ. (2014). *Biyokimya*. Aktif Yayınevi.
- Keilin, D. ve Martin, T. (1944). Activity of purified carbonic anhydrase. *Nature*, 153, 107-108.
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., & Błażej, S. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170–180.

- Kim, Y. M., Jeong, Y. K., Wang, M. H., Lee, W. Y., & Rhee, H. I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on α -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition*, 21(6), 756–761.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: Chemical composition and therapeutic application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 297425.
- König, B. (1988). Farmakoforus böceği olarak bal arısı. *Entomologia Generalis*, 14, 145-148.
- Krungkrai, S. R., Suraveratum, N., Rochanakij, S. ve Krungkrai, J. (2001). Characterization of carbonic anhydrase in *Plasmodium falciparum*. *International Journal of Parasitology*, 31, 661-668.
- Kumar, S. ve Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750.
- Kunugi, H., & Ali, A. M. (2019). Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: From animal models to humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4662.
- Kutlu, N., Atalay, F. S. ve Şahin, S. (2021). Derin ötektik çözücülerle ekstraksiyon uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 16(1), 29-43.
- Kwakman, P. H. S. ve Zaat, S. A. J. (2012). Balın antibakteriyel bileşenleri. *IUBMB Life*, 64, 48-55.
- Lebovitz, H. E. (1997). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 26(3), 539-551
- Lehninger, A. L. (1993). *Principles of Biochemistry* (2. baskı). Worth Publishers.
- Li, S., Cai, Y., Guan, T., Zhang, Y., Huang, K., Zhang, Z., ... & Guan, X. (2024). Quinic acid alleviates high-fat diet-induced neuroinflammation by inhibiting DR3/IKK/NF- κ B signaling via gut microbial tryptophan metabolites. *Gut Microbes*, 16(1).
- Li, X., Zhang, Y., & Wang, J. (2023). α -Glucosidase inhibitory peptides: Sources, preparations, and mechanisms of action. *Nutrients*, 15(19), 4267. <https://www.mdpi.com/2072-6643/15/19/4267>
- Lockridge, O. (2004). Butyrylcholinesterase: Mechanisms of catalysis and inhibition. *Chemico-Biological Interactions*, 157–158, 7–22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10999061>ducts, 88(2), 456–472
- Loizzo, M. R. ve diğerleri. (2008). Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by polyphenolic compounds. *Food Chemistry*, 112(2), 343-349.
- Lopez, S., Bermudez, B., Pacheco, Y. M., Villar, J., Abia, R. ve Muriana, F. J. G. (2002). Distinctive antiatherogenic effects of a phenol-rich virgin olive oil in patients with hypercholesterolemia. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(6), 472-480.

- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G. ve Garg, M. L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. ve Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.
- Maharramov, A., Kurbanova, M., Taslimi, P., Demir, Y., Safarova, A., Huseyinov, E., & Gulcin, İ. (2021). Synthesis, characterization, crystal structure and bioactivities of novel enamine and pyrrole derivatives endowed with acetylcholinesterase, alpha-glycosidase and human carbonic anhydrase inhibition effects.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. ve Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Masson, P., & Lockridge, O. (2010). Butyrylcholinesterase: Structure, function, and physiology. *Chemico-Biological Interactions*, 187(1-3), 16-22. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11848688>
- Massoulie, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E. ve Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31-91.
- McHardy, S. F., Wang, H. L., McCowen, S. V. ve Valdez, M. C. (2017). Recent developments in acetylcholinesterase inhibitors and reactivators: an update in the patent literature (2012-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 27(4), 455-476.
- Messina, M. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 439S-450S.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. ve Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84, 407-412.
- Miotto, D. (2010). *Elucidation of the components involved in the antioxidant activity of honey* [Yüksek Lisans Tezi]. Brock University.
- Mizrahi, A. ve Lensky, Y. (1997). *Arı ürünleri: Özellikleri, Uygulamaları ve Apiterapi*. Springer.
- Molan, P. C. (1992a). Balın antibakteriyel aktivitesi - 1. Antibakteriyel aktivitenin doğası. *Bee World*, 73, 5-28.
- Molan, P. C. (2001). The antibacterial activity of honey. *Bee World*, 82(1), 22-36.
- Molan, P. C. (2006). The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 5(1), 40-54.
- Mureşan, M. S. ve diğerleri. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory effects of phenolic compounds in cardiovascular diseases. *Molecules*, 24(2), 173-190.

- Mutinelli, F. (2011). Bal arıları ve ürünlerinde (kraliçe arılar ve sperma dahil) ticaret yoluyla patojenlerin yayılması: genel bakış ve son gelişmeler. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 30, 257-271.
- Nagai, T., Nagashima, T., Myoda, T. ve Inoue, R. (2004). Preparation and functional properties of extracts from bee bread. **Nahrung/Food*, 48*(3), 226-229.
- Nelson, D. L. ve Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4. baskı). W. H. Freeman.
- Nugent, K. (2019). Oxidative stress. *Southwest Respiratory and Critical Care Chronicles*, 7, 1-3.
- Oduwole, O., Meremikwu, M. M., Oyo-Ita, A., & Udoh, E. E. (2018). Honey for acute cough in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4), CD007094.
- Orhan, I. ve diğerleri. (2007). Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of some Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(2), 327-332.
- Öztürk, A. İ. ve Akçiçek, E. (2015). Polen ve polenin tıbbi özellikleri. F. Akçiçek, E. ve Yücel, B. (Ed.), *Arı Ürünleri ve Sağlık (Apiterapi)* içinde. Sidas Yayıncılık.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L. ve Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents -- solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071.
- Palma, J. M. ve Seiquer, I. (2020). To be or not to be... an antioxidant? That is the question. *Antioxidants*, 9(12), 1234.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1259510.
- Patocka, J. ve diğerleri. (2014). Honey and its medicinal properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(1), 57-61.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 4(2), 89.
- Plotka-Wasyłka, J., Rutkowska, M., Owczarek, K., Tobiszewski, M. ve Namieśnik, J. (2020). Extraction with environmentally friendly solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 123, 115777.
- Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O. ve Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12(3), 221-228.
- Pyrzyska, K. ve Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(7), 893-902.
- Ranneh, Y. ve diğerleri. (2018). Honey and its role in relieving multiple facets of atherosclerosis. *BioMed Research International*, 2018, 3176839.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation

- decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. ve Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Richardson, L. L., Adler, L. S., Leonard, A. S., Andicoechea, J., Regan, K. H., Anthony, W. E., Manson, J. S. ve Irwin, R. E. (2015). Çiçek nektarındaki ikincil metabolitler, bombus arılarında parazit enfeksiyonlarını azaltır. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 20142471.
- Ross, J. A. ve Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
- Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L., Caboni, M. F., Bogdanov, S. ve Almeida-Muradian, L. B. D. (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of Apiprodukt and Apimedical Science*, 1(1), 1-6.
- Samarghandian, S., Farkhondeh, T., & Samini, F. (2017). Honey and health: A review of recent clinical research. *Pharmacognosy research*, 9(2), 121.
- Sánchez-Rangel, J. M. ve Yahia, E. M. (2013). Phenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 138(1), 300-306.
- Sarıkaya, A. O. (2009). *Kestane Bal ve Propolisinin Fenolik Asit Kompozisyonu ve Antioksidan Özelliğinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Sarıöz, P. (2006). Deli bal. *Arı Biziz Bal Bizdedir: Düünden Bugüne Türkiye'de Arıcılık*. Balparmak Yayınları.
- Saxena, R., Kumar, A., & Singh, P. (2025). Functional diversity of butyrylcholinesterase and its role in detoxification. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 12, 1625318.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. ve Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schmid-Hempel, P. (1998). *Sosyal Böceklerde Parazitler*. Princeton University Press.
- Sforcin, J. M. ve Bankova, V. (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 253-260.
- Shahidi, F. ve Naczki, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC Press.
- Si, X., Chen, Q. Q., Bi, J. F., Wu, X. Y., Yi, J. Y., Zhou, L. Y. ve Li, Z. L. (2016). Comparison of different drying methods on the physical properties, bioactive compounds and antioxidant activity of raspberry powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(6), 2055-2062.
- Singh, S. ve Singh, R. P. (2008). In vitro methods of assay of antioxidants: An overview. *Food Reviews International*, 24(4), 392-415.
- Smith, E. L., Abbott, A. P. ve Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060-11082.

- Snow, M. J. ve Manley-Harris, M. (2004). On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand Manuka Honey. *Food Chemistry*, 84(1), 145-147.
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M. J. R. P., & Vilas-Boas, M. (2017). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 173–181.
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M. J. R. P., & Vilas-Boas, M. (2017). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 173–181.
- Soreq, H., & Seidman, S. (2001). Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(4), 294–302.
- Sorkun, K., Özkök, A. ve Süer, B. (2001). Arılar tarafından toplanan polenin işlenmesi ve kullanım alanları. *Teknik Arıcılık*, 74, 9-15.
- Storz, G. ve Imlay, J. A. (1999). Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 188-194.
- Subrahmanyam, M. (1991). Topical application of honey in treatment of burns. *British Journal of Surgery*, 78, 497-498.
- Takenaka, T. ve Echigo, T. (1980). Chemical composition of royal jelly. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Tamagawa University*, 20, 71-78.
- Tisserand, R. ve D. R. P. (2012). Water activity in food products: Understanding its role in microbial growth. *Bee Science*.
- Tiwari, P. ve Pandey, R. (2013). Phenolic compounds and their medicinal benefits. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4(3), 1203-1207.
- Tobin, A. J. (1970). Carbonic anhydrase from parsley leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 245, 2656-2666.
- Tutkun, E. (2011). *Arıcılık Tekniği* (2. Baskı). Önder Matbaacılık.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Tan, N., Ölçal, S., Johansson, C., Üçer, M. ve Tamer, Ş. (1995). Biological activities of a Turkish medicinal plant, *Prangos platychlaena*. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(3), 193-197.
- Van de Laar, F. A. (2008). Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*, 4(6), 1189-1195.
- Vasquez, A. ve Olofsson, T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, 48(3), 189-195.
- Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I. ve Kujumgiev, A. (2000). Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(9-10), 785-789.

- Verpoorte, J. A., Mehta, S. ve Edsall, J. T. (1967). Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. *Journal of Biological Chemistry*.
- Vinç, E. (1975). *Bal: Kapsamlı Bir Araştırma*. Heinemann.
- Wang, H., Sun, Q., & Li, P. (2024). Inhibition of α -glucosidase activity by potential peptides derived from natural sources. *Food Chemistry*, 410, 135448. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814624014419>
- White, J. W. (1979). Honey composition and properties. *Bee Science*.
- White, J.W. (1978). Honey. *Advances in Food Research*, 24, 287–374.
- Xie, Y., Zhang, L., Pan, C., Huang, X. ve Tang, X. (2017). Application of deep eutectic solvents in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 89, 25-35.
- Xu, P., Zheng, G. W., Zong, M. H., Li, N. ve Lou, W. Y. (2015). Recent advances in biotransformations with ionic liquids. *Biotechnology Advances*, 33(8), 1484-1492.
- Yapıcı, İ. ve İzol, E. (2023). Effects of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes on human memory. 6. *International Marmara Scientific Research and Innovation Congress*.
- Yu, Z., Xie, L., Lee, S. ve Zhang, R. (2006). A novel carbonic anhydrase from the mantle of the pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comparative Biochemistry and Physiology*.
- Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Hayyan, A. ve Jayakumar, N. S. (2017). New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 979, 1-23.
- Zhang, R., Yang, Y., & Zhao, L. (202pas5). Exploring α -glucosidase inhibitory peptides: Structure-activity relationships and potential applications. *Journal of Natural Pro* Gibbs, J. M., Frolund, B., & Silman, I. (2013). Butyrylcholinesterase and the cholinergic system. *Brain Research*, 1507, 1–13. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452213000092>
- Zhao, Z., Zhang, L. ve Sun, Z. (2015). The role of flavonoids in the prevention of cancer. *Molecules*, 20(6), 10291-10305

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Yaşar HASANOĞLU
Doğum Yeri ve Tarihi	
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	Atatürk üniversitesi Fen Fakültesi
Yüksek Lisans Öğrenimi	Atatürk üniversitesi Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi /Kimya Eğitimi Tezli Yüksek Lisans
Bildiği Yabancı Diller	İngilizce
İş Deneyimi	
Çalıştığı Kurumlar	Sosyal Hizmetler ve Çocuk Esirgeme Krumu Milli Eğitim Bakanlığı