

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

BAZI HAM VE TİCARİ BALLARDA AYIRT EDİCİ PARAMETRE OLARAK İNVERTAZ VE GLUKOZ-OKSİDAZ AKTİVİTESİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Comparison of the Activity of Invertase and Glucose-Oxidase of Raw and Commercial Honey as a Distinguishing Parameter

Hüseyin ŞAHİN^{1*}, Sevgi KOLAYLI², Mehmet BEYKAYA³

¹Giresun Üniversitesi, Espiye Meslek Yüksekokulu, 28600, Espiye, Giresun, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0002-6018-1494, E-posta: huseyin.sahin@giresun.edu.tr

²Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 61080, Trabzon, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0003-0437-6139, E-posta: skolayli61@yahoo.com

³Iğdır Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü, 76000, Iğdır, TÜRKİYE, ORCID NO: 0000-0003-2594-5011, E-posta: mb-kaya@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received: 09.12.2019

Kabul Tarihi / Accepted: 28.01.2020

DOI: 10.31467/uluaricilik.656842

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, herhangi bir işlem görmemiş ve doğrudan üreticiden alınan bazı ham bal numuneleri ile ticari etiketle satılan bazı balların invertaz ve glukoz-oksidad aktiviteyi açısından karşılaştırılması ve ham bal için ayırt edici bir analiz ve kalite parametresinin ortaya konulmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, 2 adet monofloral kestane balı ve 4 adet multifloral çiçek balının oluşturduğu ham bal grubu ile 6 adet çam balı ve 6 adet multifloral çiçek balının oluşturduğu ticari bal etiketli grubun spektrofotometrik olarak invertaz ve glukoz-oksidad aktiviteyi hesaplanarak karşılaştırıldı. Uygulanan deneysel yöntemlere göre ham bal numunelerinin invertaz (135,028-238,878 U/kg bal ve 18,416-32,579 IN) ve glukoz-oksidad aktiviteyi (Tespit Edilmedi-11.207 µg H₂O₂/g bal.h) ticari ballara göre daha yüksek bulundu. Her iki grubun sahip olduğu değerlerin istatistiksel analizi, $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde test edildi ve edinilen sonuçların ham ballar için ticari ballara göre ayırt edici bir kalite parametresi olduğu görüldü ($p < 0,05$). Böylece piyasadaki ham balların tanımlanmasında özellikle invertaz aktivitesi değerinin ön plana çıkarılmasının önemi vurgulandı.

Anahtar Kelimeler: Ham Bal, Ticari Bal, İvertaz, Glukoz-oksidad

ABSTRACT

The objective of this study was to compare raw honey in terms of the activity of invertase and glucose-oxidase, in order to present a distinctive analysis and quality parameters that could be used as an indicator of raw honey. Currently, this method is not being included in any commercial procedure, and it could be used on honey directly supplied from the beekeepers, or honey obtained from commercial sources. We tested the activity of invertase and glucose-oxidase on a raw honey group which consisted of 2 types of monofloral chestnut honey and 4 types of multifloral blossom honey. The commercial honey group consisted of 6 different types of pine honey and 6 different types of multifloral blossom honey. The results were analyzed spectrophotometrically. According to applied experimental methods, the invertase activity was 135.028 -238.878 U/kg honey and 18.416 - 32.579 IN. The glucose-oxidase activity was Not Detected - 11.207 H₂O₂/g honey.h Honey from raw sources were found to have significantly higher invertase and glucose-oxidase activity in comparison to commercial sourced honey. Statistical analysis of all values between the two groups was tested at the $\alpha = 0.05$ significance level. Thus, invertase and glucose-oxidase activity could be potentially used as a test to identify raw honey from commercially sourced honey.

Key Words: Raw Honey, Commercial Honey, Invertase, Glucose-oxidase

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

EXTENDED ABSTRACT

Goal: Enzymes play a significant role in making up the properties of honey. Invertase and glucose-oxidase are a few examples of the enzymes found in honey. Although the literature on the activity of these enzymes found in commercial honey is available, a comprehensive study on raw honey samples still does not exist. We propose that if we can determine what the level of invertase and glucose oxidase activity is in raw honey samples when compared with commercial honey then this could be a distinctive marker for where the honey is coming from and potentially its quality. Hence, the current study investigated the level of the invertase and glucose oxidase activity in raw and commercial honey. The goal was to find a marker that could be used to identify raw honey when it is compared to commercially sourced honey.

Material and Methods: In this study, 6 raw honey samples and 12 commercial honey samples were tested. Raw honey was supplied from local Turkish beekeepers during the 2018 harvest period. Their botanic classification was achieved by a beekeepers' declaration and a classification was performed and the honey was determined to be a monofloral chestnut variety along with multifloral blossom honey. For commercial honey there were 12 different kinds of 6 pine honey and 6 different types of multifloral blossom honey. These were purchased from the local market regardless of company brand names. The company's names remained anonymous. Invertase and glucose-oxidase activity of each honey type was measured spectrophotometrically. While the value of the invertase activity was given as the invertase enzyme unit per kg honey (U/kg honey) and invertase number (IN), the glucose-oxidase level was expressed as $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g honey.h}$

Results: Our results indicate that commercial honey has a low enzymatic activity because they are produced under some consistent conditions such as heating, storing, and pasteurization in comparison to raw honey. Moreover, not only does the raw honey have the highest invertase activity 135.028 - 238.878 U/kg honey and 18.416 - 32.579 IN, but it also has the highest glucose-oxidase activity Not Detected - 11.207 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g honey.h}$ as well.

Conclusion: According to our obtained data, it was revealed that the high invertase and glucose-oxidase activity could be used as a marker to determine if the honey is raw honey or if it is from a

commercial source. The statistical analysis between the two groups was confirmed at the $\alpha = 0.05$ level. The invertase of raw honey samples had approximately three times higher activity in comparison to the commercial sourced honey, so perhaps this could be used as an indicator of its freshness. Moreover, we believe that the storage conditions should not exceed approximately 45°C as it may affect the stability of the enzyme activity of raw honey.

GİRİŞ

Bal, tarihten günümüze değin gerek besin ögesi olarak gerekse içerdiği biyokimyasal bileşenlerden ötürü terapötik etkili ürün olarak bilinmektedir. Terapötik etken balın antioksidan, antimikrobiyal, antitumörjenik gibi özelliklerinden ileri gelmektedir (Geană v.d. 2020). Ana bileşen olarak su ve çeşitli karbonhidrat (şeker) birimlerinden oluşan bal, proteinden müteşekkil enzimleri, aminoasitleri, vitaminleri, mineralleri, organik ve aromatik bileşenleri de içermektedir (da Silva v.d. 2016). Bala renk, aroma ve tat gibi kendine has özellik katan bu bileşimler, bal arısının türüne, nektarın toplandığı floraya, iklim, yükselti gibi coğrafik koşullara göre farklılık gösterir (Akyol v.d. 2015, da Silva v.d. 2016, Doğan v.d. 2014). Ayrıca ürünün içeriğindeki mevcut bileşenler, operasyonel işlemlerden, paketleme-muhafaza koşullarından ve depolama süresinden de etkilenir (Escuredo v.d. 2014, Şahinler v.d. 2009). Asidite artışı, fermantasyon, oksidasyon ve termal etkiyle sonuçlanan bu süreçlerde mevcut bileşenlerin ya aktivitesini yitirmelerini ya da başka bir forma dönüşmelerini gözlemlemek mümkündür (da Silva v.d. 2016, Moreira v.d. 2007).

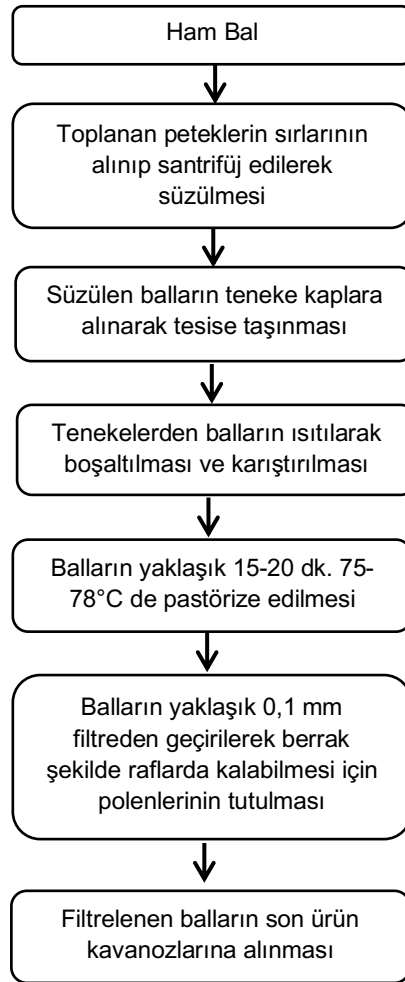
Balda miktar ve çeşitlilik açısından çok fazla gözlemlenmeyen bal enzimleri biyo-çeşitlilikte yer alan tüm enzimler gibi bazı spesifik görevler yürütmektedir. İntertaz, glukoz oksidaz, diastaz, katalaz ve asit fosfataz enzimleri balın majör enzimleri olarak bilinmekte bir kısmı doğrudan bitki kaynaklı bir kısmı da bal arılarınca bala ilave edilmektedir (Ömür, 2015; White, 1975).

Özellikle bu enzimlerden intertaz ve glukoz oksidaz bal arılarının hipofarengal salgı bezleri aracılığıyla salınan, balın olgunlaşması aşamasında aktivitesi en üst düzeyde olan enzimlerdir (Al-Sherif v.d. 2017, Li v.d. 2008). Balın tazelik ölçütü olarak karşımıza çıkan bu enzimlerden intertaz, sukrozu daha basit karbonhidrat birimlerine hidroliz ederken, glukoz oksidaz ise olgunlaşmamış balda bulunan glukozun, glukonik asit ve hidrojen perkoksida

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

oksidasyonundan sorumludur (Al-Sherif v.d. 2017, Sajid v.d. 2019, Şahinler v.d. 2009). Ayrıca glukoz oksidazın bir diğer önem arz eden özelliği ise enzimatik kataliz esnasında oluşturduğu ara ürünlerle balın antimikrobiyal etkinliğini artırması olgusudur (Li v.d. 2008, Mandal ve Mandal, 2011). Balın üreticiden tüketiciye aktarılması sürecinde birçok basit ve/veya ileri teknik barındıran yöntemlerin kullanıldığı işlem basamaklarına ihtiyaç duyulur (Şekil 1). Bu ihtiyaç, balın daha berrak bir görüntüye sahip olması, raf ömrünün uzatılması ve çabuk fermantasyona uğramaması gibi vb.

etkinliklerden ötürü elzem bir süreç olarak değerlendirilebilir. Ancak bahsi geçen tüm bu enzimatik etkinlikler, balın işlenmesi aşamasında (özellikle süzme ve ısıtma etkinliklerinde) ya tamamen ya da kısmen aktivitesini yitirmektedir. Balın işlenmesi aşamasında kullanılan bu sistematik basamaklarda ısıtma yerine ikame bir teknik olmamasına rağmen, filtrasyon basamağında enzimatik etkinliklerin deaktivasyona uğramasını engellemek adına araştırmacılar mikrofiltrasyon ya da ultrafiltrasyon tekniklerini tavsiye etmişlerdir (Subramanian v.d. 2007).



Şekil 1. Bal işlenmesinde kullanılan sistematik basamaklar

Figure 1. Systematic steps used in honey processing

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Ham bal, tüm bu işlem süreçlerinin öncesinde elde edilen birinci basamak ürünü olmakla birlikte sahip oldukları bazı biyoetkinlik özellikler (antibakteriyel, antioksidan ve antikanser) açısından da ticari ballarla nazaran üstünlük arz etmektedir (Aumeeruddy v.d. 2019; Blasa v.d. 2006). Biyokimyasal etkinlikleri araştırılan ve terminolojik açıdan bilimsel literatürde henüz tanınmış olan bu ürünün ticari ballardan ayırt edici fizikokimyasal parametreleri tam olarak belirtmemiş ve literatüre sunulmamıştır. Bu bilimsel boşluğun doldurulabilmesi adına ilgili çalışmada, bazı ham bal numuneleri ile bazı ticari bal etiketli numunelerin invertaz ve glukoz oksidaz aktivitelerinin karşılaştırılması ve edinilmesi olası farklı sonuçlarla ham balların ticari ballardan ayırt edici bir analiz parametresinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

GEREÇ-YÖNTEM

Kullanılan Kimyasallar

Çalışma kapsamında kullanılan tüm kimyasallar (*p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosidin (*p*NPG), tris-hidroksimetil aminometan, glukoz, *o*-dianisidin, yaban turbu peroksidazı, hidrojen peroksit) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) firmasının Türkiye satış temsilcilerinden temin edildi. Ayrıca bu kimyasallar analitik saflık düzeyinde olup ekstra saflaştırma işlemine gerek duyulmadan kullanıldı.

Çalışmada Kullanılan Bal Örnekleri ve Ekstraksiyon İşlemleri

Çalışma kapsamında kullanılan bal örnekleri öncelikle ham bal ve ticari işlem görmüş bal sınıflandırmasıyla iki gruba ayrıldı. Bu kapsamda değerlendirilen birinci grup, 2 adet monofloral kestane, 4 adet multifloral çiçek balı ile toplam 6 adet herhangi bir işlem görmemiş ham bal numunelerinden oluşurken; ikinci grup ise 6 adet çam balı ve 6 adet multifloral çiçek balı ile toplamda 12 adet ticari bal numunelerinden oluşturuldu. Çalışma kapsamında kullanılan hiçbir bal örneğine mikroskobik polen analizi uygulanmadı. Dolayısıyla grup içerisinde bulunan bal numunelerinin kendi içerisindeki bal tür sınıflandırılması, ham bal numuneleri için doğrudan üreticilerin beyanıyla; ticari ballar için ise etiket bilgilerinin vermiş olduğu tanımlamayla gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen analizlerde, numunelerin ekstraktları her ne kadar sulu olarak hazırlansa da analiz metoduna göre bazı farklılıkları da içerdiği bilinmektedir. Bu farklılıklardan ötürü her bir analiz için numuneler metodolojiye göre

hazırlandı. İvertaz aktivitesi analizi için 10 g numune yaklaşık 40 mL saf su ile oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla 12 saat boyunca ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sonunda numune öncelikle adi süzgeç kâğıdı ardından da mavi bant süzgeç kâğıdı kullanılarak olası katı partiküllerden arındırıldı. Filtrasyon işlemi sonunda son hacim 50 mL'ye saf suyla tamamlanarak nihai konsantrasyonun 0,2 g/mL olması sağlandı. Glukoz-oksidad analizinin içerdiği yegâne farklılık ekstraksiyon işleminin saf su ile değil pH 6,1 olan 100 mM sodyum fosfat tampon çözeltisiyle gerçekleştirilmiş olmasıdır. Bu farklılığın ötesinde geriye kalan tüm işlem süreci invertaz aktivitesiyle aynı olup numunenin son konsantrasyonu 0,2 g/mL ilgili tampon çözeltiyle ayarlandı.

İvertaz Aktivitesi Tayini

Gerek ham bal numunelerinde gerekse ticari etiketli satılan bal numunelerinde invertaz aktivitesi Bogdanov (2009)'un çalışmasıyla tanımlanan *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosidin (*p*NPG) substrat olarak kullanıldığı yöntem öncülüğünde gerçekleştirildi. İlgili metotta esas alınan reaksiyon, *p*NPG'nin invertaz ile glukoz ve *p*-nitrofenole ayrışması akabinde bu reaksiyonun pH 9,5'te durdurulurken oluşan nitrofenolün nitrofenolat anyonuna dönüşmesi ve nihayetinde spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda analizin 5 dakika öncesinde 40°C'deki su banyosunda bekletilmiş ve 0,1 M pH 6 fosfat tamponunda hazırlanmış 0,02 M *p*NPG substrat çözeltisinin 2,5 mL'si ile 0,2 g/mL olarak ekstrakte edilmiş bal örneğinin 0,25 mL'si karıştırılmıştır. İlgili hacimlerin ilavesinden sonra tüp içeriğinin inkübasyonu yine 40°C'deki su banyosunda 20 dk. olarak belirlendi. Mevcut inkübasyonun akabinde enzimatik süreç reaksiyon 0,25 mL durdurma çözeltisi (3 M, pH 9,5 tris-hidroksimetil aminometan) ilave edilip vorteks karıştırıcıda tüp içeriği karıştırılarak durduruldu. Spektrofotometrik ölçümün esas alındığı bu tayınde her bir numune için hazırlanan kör çözelti yine aynı reaktantlar kullanılarak hazırlanmış olup sadece tüp içeriğine tatbik sırası farklılaştırıldı. Dolayısıyla analizden 5 dakika önce 40°C'de inkübe edilmiş substrat çözeltisinin 2,5 mL'sine 0,25 mL reaksiyon durdurma çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı akabinde 0,25 mL ilgili bal çözeltisi ilave edilerek tüp içeriğindeki hacim değerleri tamamlandı. Tüm bu hazırlanan tüp içerikleri 400 nm'ye ayarlı spektrofotometre yardımıyla (Shanghai Mapada Instruments Co., China) ölçüldü. Edinilen sonuçlar

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

iki farklı sonuç birimi ile hesaplanarak verildi. İlk Unite/kg (1 kg bal tarafından dakikada parçalanmış *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosidin μ mol miktarı) (Formül 1), ikincisi ise Duisberg ve Hadorn (1966) tarafından tanımlanan, Hadorn ünitesi olarak da bilinen ve ΔA_{400} değerinin 21,64 Hadorn sabiti ile çarpılması sonucu ortaya çıkan İvertaz Numarası (IN) (Formül 2) şeklinde ifade edildi.

$$1U/kg = \frac{1 \mu\text{mol } p - NPG}{\text{Dakika} \times \text{kg Bal}}$$

Formül 1: Kg bal başına düşen invertaz ünite değerinin hesaplanması

Formula 1: Calculation of invertase unit value per kg of honey

$$IN = 21.64 \times \Delta A_{400}$$

Formül 2: İvertaz numarası (IN) değerinin hesaplanması

Formula 2: Calculation of the invertase number (IN) value

Glukoz-Oksidaz Aktivitesinin Tayini

Çalışılan tüm bal numunelerindeki glukoz oksidaz aktivitesi yaban turpundan izole edilmiş peroksidaz enzimi ve bir diğer reaktan olan *o*-dianisidin substratı öncülüğünde belirlendi (Flanjak v.d. 2016). Esasında yöntem, bal içeriğinde mevcut bulunan glukoz-oksidadın D-glukoza D-glukonolaktone oksidasyonun oluşumunu ve ardından da glukonik asit ile hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşümünün katalizini ihtiva eder. H_2O_2 , ko-substrat olarak bilinen *o*-dianisidin ile suya indirgenirken oluşan renkli ürünün ortaya çıkardığı maksimum absorbans bir spektrofotometre yardımıyla ölçülür.

Metot için gerekli olan reaktif içeriği ilavesi izah edildiği şekilde yapıldı. Bunun için; pH 6,1 100 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde çözünmüş 2,14 mM 0,7 mL glukoz çözeltisi, 1 mg/mL olarak etanolik olarak hazırlanan 0,1 mL *o*-dianisidin, pH 6,1 100 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde 60 U olarak hazırlanan 0,1 mL yaban turpu peroksidazı ve 0,2 g/mL olan 0,1 mL bal ekstraktı karıştırıldı. Bal ekstraktı ilavesi ardından reaksiyon karışımı 30 dk. 37°C'deki su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Bekletilme süresi akabinde 1 M hidroklorik asit

çözeltisinden 0,1 mL ilave edilerek reaksiyon süreci sonlandırıldı. Tüm bal örnekleri için hazırlanan kör çözeltisi içeriği ise reaktanların ilavesi sırasının son kademesinde farklılaştırıldı. Bunun için 0,1 mL ilave edilen bal ekstraktı, sonlandırma çözeltisinin ardından ilave edildi. Gerek kör çözeltilerin gerekse ana reaktif karışımını içeren numune içeriklerinin maksimum absorbansı 400 nm'de ölçüldü (Shanghai Mapada Instruments Co., China).

Bu ölçümler neticesinde elde edilen absorbans değerleri, 10-100 μ mol/L olarak hazırlanan standart H_2O_2 ile peroksidaz ve *o*-dianisidin verdiği sonuçların ortaya çıkardığı kalibrasyon eğrisi yardımıyla μ g H_2O_2 /g bal.h'a dönüştürüldü.

İstatistiksel Analiz

Uygulanan analiz metodundaki sonuçlara dair elde edilen tüm veriler, üç tekrarlı olarak verildi. İstatistiksel analizler, SPSS Statistic 11.5 (IBM SPSS Statistics, Armonk, New York, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz edilen verilerin nicel analizlerini desteklemek adına ortalama \pm standart sapma ve minimum-maksimum verileri de sunuldu. Belirlenen gruplar arasındaki istatistiki ilişki, Anova Post Hoc Tukey ile $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi temel alınarak hesaplandı.

BULGULAR

İvertaz Aktivitesi

Çalışılan tüm bal numunelerinin invertaz değerleri Tablo 1'de detaylı olarak verildi. Elde edilen değer aralıkları invertaz ünitesi açısından 8,965-238,878 U/kg bal, invertaz numarası açısından 1,223-32,579 IN olarak bulundu. Mevcut sonuçların ortaya koyduğu bilimsel doğrulama ham balların ticari ballara nazaran en yüksek enzimatik değere sahip olması olarak görüldü. Bu yüksek değer istatistiki olarak da test edildi. Ham balların invertaz ünitesi ve invertaz numarası açısından ticari ballarla olan kıyasındaki istatistiki fark, anlamlı düzeyde bulundu ($p < 0,05$). Böylelikle invertaz aktivitesinin ham bal için ayırt edici bir parametre olduğu test edilerek vurgulandı.

Farklı yörelere ait iki adet monofloral kestane ve dört adet multifloral çiçek balının oluşturduğu ham bal grubunun en düşük değeri (135,028 U/kg; 18,416 IN) **RH4** örneklem kodu ile tanımlanan çiçek balında gözlemlendi. İlgili grubu oluşturan bal türlerinin ortaya çıkardığı ortalama sonuçların ise sırasıyla kestane balı için 157,004 U/kg-21,413 IN, çiçek balı

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

için 178,187 U/kg-24,302 IN olduğu görüldü. Ancak grup içerisinde analiz edilen monofloral kestane ve multifloral çiçek balının invertaz aktivitesi açısından istatistiki değerlendirilmesinde anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,610$).

Çalışma kapsamında ikinci grup olarak adlandırılan ve ticari bal etiketiyle satılan bal örneklerinin oluşturduğu grubun invertaz değerlikleri gerek grup içerisindeki farklı bal türüne göre gerekse grubun tümünü içine alan toplam sayısal verilere göre değerlendirildi. Bu açıdan irdelendiğinde tüm grubun sahip olduğu invertaz değer aralığı; 8,965-71,243 U/kg-1,223-9,716 IN olarak verildi. İlgili örnekler içerisinde en yüksek enzimatik değere sahip olan numune **CH9** koduyla tanımlanan çam balı numunesinin olduğu görüldü. Mevcut grup için bahsedilen ikinci değerlendirme ise grup içindeki bal türlerinin sahip olduğu değerliklerini kıyaslama olarak ortaya konuldu. Bu değerlendirmeye göre farklı ticari markanın ürünü olan altı adet çam balı ve altı adet multifloral çiçek balı konu edinildi. Çam ballarının sahip olduğu ortalama invertaz aktivitesi değeri 47,680 U/kg-6,413 IN iken çiçek ballarının değerleri 21,658 U/kg-2,954 IN olarak hesaplandı. Ticari balların içerisindeki mevcut grupların oluşturduğu ve çam ballarının daha yüksek verilere sahip olduğu bu değerlendirme istatistiki olarak da anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Glukoz-Oksidaz Aktivitesi

Invertaz aktivitesindeki veri düzenlemesi glukoz-oksidad aktivitesinde de geçerli olup Tablo 1'de çalışılan tüm bal türlerinin sonuçları detaylı olarak verildi. Elde edilen sonuçların ifadesinin genel enzim sonuçları için kullanılan ünite ifadesinden farklı olduğu bilinmekte olup konsantrasyon aralığı belli standart kimyasalın (H_2O_2) referansında çizilen kalibrasyon eğrisinden faydalanıldığı için $\mu g H_2O_2/g$ bal.h olarak ifade edildi.

Çalışılan tüm bal örneklerinin bazılarında bu aktivite tespit edilemezken tespit edilen değerler açısından en yüksek değer 11,207 \pm 0,354 H_2O_2/g bal.h ham bal örneklem grubuna dahil olan çiçek balında gözlemlendi. Bu grup içerisinde invertaz aktivite değeri en düşük olan **RH4** kodlu bal numunesinin glukoz-oksidad aktivitesi adına tayin edilemediği görüldü. İlgili grupta çalışılan diğer 5 bal numunesindeki mevcut enzimatik değer aralığı 0,159-11,207 H_2O_2/g bal.h olarak hesaplandı. Ticari bal örneklem grubunda ise tespit edilemeyen aktiveye sahip numune sayısının oldukça fazla olduğu görüldü. Hatta çiçek balı etiketiyle çalışmaya dahil edilen altı adet bal örneğinden sadece birinde (**CH17**: 0,197 \pm 0,021 H_2O_2/g bal.h) aktivite gözlemlendi. Yine çalışılan altı adet çam balı içerisinde dört adet numunenin glukoz-oksidad aktivitesine cevap verdiği, bu değerliğin de 2,894 \pm 0,064 H_2O_2/g bal. h ile **CH12** kodlu bala ait olduğu gözlemlendi.

Tüm bu verilerin ortaya koyduğu sonuçlar, istatistiksel olarak da test edildi. Bu değerlendirmelerde üç temel grup analizi istatistiki veri setini oluşturdu. Birinci analiz, genel analiz olup glukoz-oksidad açısından ham balların ticari ballara göre istatistiki kıyasını vermektedir. Birinci analizde edinilen sonuç, anlamlılık düzeyinde bulundu ($p<0,05$) ve böylece ham balların ticari ballarla olan tasnif ayrımında glukoz-oksidad aktivitesinin de bir belirteç olabileceği test edildi. İkinci ve üçüncü analiz ise grup içi analiz olup ham balların içerisindeki monofloral kestane ballarıyla multifloral çiçek ballarının kıyasını ($p=0,854$) ve ticari balların içerisinde bulunan multifloral çiçek ballarının çam ballarıyla kıyasını ($p=0,067$) konu edindi. Grup içerisindeki her iki istatistiki değerlendirmede fark anlamlılık düzeyinde görülmedi ($p>0,05$).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Tablo 1. Analiz edilen ham ve ticari balların invertaz ve glukoz oksidaz sonuçları
Table 1. Results of invertase and glucose oxidase of the analyzed raw and commercial honeys

Numune Kodu Sample Code	Numune Türü Type of Samples	Bal Türü Type of Honey	Invertaz Ünitesi	Invertaz Numarası	Glukoz-oksidadaz	
			Invertase Unit	Invertase Number	Glucose-oxidase	
			U/kg*	IN*	$\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}^*$ $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g honey.h}^*$	
RH 1		Monofloral Kestane Balı/ Monofloral Chestnut Honey	159,622±0,673	21,770±0,092	5,046±0,064	
RH 2		Monofloral Kestane Balı/ Monofloral Chestnut Honey	154,386±1,571	21,056±0,214	3,978±0,096	
RH 3	Ham Bal Raw Honey	Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	201,987±2,020	27,548±0,275	11,207±0,354	
RH 4		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	135,028±2,693	18,416±0,367	T.E./N.D.	
RH 5		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	238,878±1,010	32,579±0,138	10,320±0,064	
RH 6		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	136,853±2,356	18,665±0,321	0,159±0,032	
Min.-Mak. Min.-Max.				135,028-238,878	18,416-32,579	T.E./N.D.-11,207
Ortalama/Mean				171,113	23,339	5,118**
CH 7		Çam Balı/Pine Honey	56,645±0,898	7,725±0,122	0,616±0,040	
CH 8		Çam Balı/Pine Honey	34,590±1,346	4,178±0,184	T.E./N.D.	
CH 9		Çam Balı/Pine Honey	71,243±0,898	9,716±0,122	1,948±0,075	
CH 10		Çam Balı/Pine Honey	35,066±1,122	4,782±0,153	0,621±0,064	
CH 11		Çam Balı/Pine Honey	29,830±0,898	4,068±0,122	T.E./N.D.	
CH 12		Çam Balı/Pine Honey	58,708±0,673	8,007±0,092	2,894±0,064	
CH 13	Ticari Bal Commercial Honey	Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	19,516±0,673	2,662±0,092	T.E./N.D.	
CH 14		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	33,638±1,795	4,588±0,245	T.E./N.D.	
CH 15		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	15,946±0,337	2,175±0,046	T.E./N.D.	
CH 16		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	8,965±0,112	1,223±0,015	T.E./N.D.	
CH 17		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	17,612±1,571	2,402±0,214	0,197±0,021	
CH 18		Multifloral Çiçek Balı/ Multifloral Blossom Honey	34,273±0,449	4,674±0,061	T.E./N.D.	
Min.-Mak. Min.-Max.				8,965-71,243	1,223-9,716	T.E./N.D.-2,894
Ortalama/Mean			34,669	4,683	0,523**	

*Tüm analizler üç tekrarlı yapıldı, All results were performed in triplicate; **T.E./N.D.** Tespit edilemedi, Not Detected

**Glukoz-oksidadaz için ortalama değeri hesaplanırken tespit edilemeyen tüm değerler sıfır (0) kabul edilmiştir. All not detected values were accepted as zero (0) for the mean calculation of glucose-oxidase.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

TARTIŞMA

Doğal ürünler, içerdikleri biyo-yararlı bileşenler sayesinde geçmişten günümüze daima tercih sebebi olmuştur. Ancak doğal ürün diye etiketlenen ve tüketicilerle buluşturulan bu ürünlerin ne denli bu tanımlamayı hak ettikleri de özellikle son yıllarda tartışma konusu olarak görülmektedir. Bilim dünyasında doğal ürünlerin tanımını, tercih edilme nedenini, daha az işlenmiş ürünlerin neden önemli olduğunu vb. izah eden araştırma çalışmalarına rastlamak mümkündür. Örneğin Román v.d. (2017)'in derleme çalışmasında bilimsel veri tabanlarında taranan doğal gıda ürünü, tüketiciler, tüketici algısı, tüketici kaygısı, tüketici tercihleri, asgari düzeyde işlenmiş gıdalar, organik gıdalar gibi terimleri içeren bilimsel çalışmaları belirli dışlama ölçütleri nispetinde araştırmış, binin üzerinde güncel çalışmanın varlığını ispatlamıştır. 1950'li yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde uzun raf ömürlü ürünlerin piyasaya sürülmesinin ardından bir diğer tartışma konusu da bilimsel literatürlerde yerini almıştır. Bu tartışma, aşırı düzeyde işlenmiş gıdalar ve sentetik ürünlerle karıştırılan gıdaların getirdiği problemler olarak görülmektedir. Roininen v.d. (1999)'nın yürüttüğü doğal ürün algısında işlenmemiş veya katkı maddesi içermeyen gıdaların tüketilmesinin önemini dikkate alan bir tutum ölçeği çalışmasında, bu ürünlerle genel sağlık algısı arasında güçlü bir istatistikî ilişki bulunmuştur.

Mevcut çalışmamızda, tüm numuneler adına her birinin doğal ürün olduğuna inanılan ancak bazılarının daha az işlenmiş ürün olması hasebiyle insanlar tarafından tercih edilme nedeni olabilecek olan Türk balları kullanılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen invertaz değerlerinin Uluslararası Bal Komisyonunun (IHC) balın ısıtma işlem görmemesinin kanıtı ve tazeliği açısından tavsiye ettiği $IN \geq 10$ ve $IU \geq 73,45$ (Bogdanov, 2009) oranlar nispetinde kıyaslandığında; ticari ballar dışında ham bal etiketli numunelerin bu ölçüm skalasına son derece uyumlu bir korelasyon gösterdiği görülmüştür (Tablo 1).

Mevcut çalışma ile son derece uyumlu olan bir başka çalışmada aynı amaç dâhilinde problem tanımı yapılmıştır (Vorlov ve Piidal, 2002). Otuz yedi adet doğrudan arıcıdan ve 17 adet ise marketten temin edilen numunelerde invertaz, HMF ve diastaz aktivitesi araştırılmış, bulunan invertaz değerlerinin diastaz ve HMF değerlerine göre balın tazeliği ortaya koyması açısından daha duyarlı bir ölçüt olduğunu vurgulamıştır. İlgili çalışmada doğrudan arıcılardan alınan ballar ham bal olarak nitelenirse de, taze

ballar olarak nitelendirilmiş ve market ballarından ayırt edilmiştir. Otuz yedi taze balın; 13 tanesi çiçek, 15 tanesi monofloral ve 9 tanesi de salı balı numunesidir. Edinilen invertaz değerlerinin ortalamaları sırasıyla çiçek balında; 12,12 IN, monofloral balda; 17,46 IN ve salı balında; 18,22 IN olarak bulunmuş olup bizim çalışmamızla elde ettiğimiz değerlerin bu değerle uyum içerisinde olduğu görülmüştür (Vorlov ve Piidal, 2002). İlgili çalışmanın göstermiş olduğu ikinci uyum ise market ballarının sonuçlarıdır. On yedi adet market balın invertaz değer aralığını 0,6-7,4 IN ve ortalama değerliğini 3,1 IN olarak ifade edilmiştir (Vorlov ve Piidal, 2002). Söz konusu tazelik ölçütünün bir belirteci olması hasebiyle atıf yapılan bu çalışma her ne kadar sonuçlarımızla uyum gösterse de gerek ham bal numunelerimiz ve gerekse market balları numunelerimiz bu çalışmanın ortalama sonuçlarına göre üstünlük göstermiştir (Tablo 1: RH 1-6 23,339 IN; CH 7-18 4,683 IN).

Elli adet taze ve 15 adet markalı balın invertaz aktivitesinin araştırıldığı başka bir bilimsel çalışmada; taze ballar için invertaz değerleri 58,55-81,9 IN iken markalı balların değer aralığının 3,10-9,66 IN olarak bulunmuştur (Sajid v.d. 2019). Araştırmacılar, markalı ballara göre araştırdıkları taze balların bu değer üstünlüğünü balların tazelik ölçütü olarak vurgulamış, ısıtma ve depolama etkinliğine de vurgu yapılmıştır.

İlgili enzimle termal etkinliğin ilişkili olduğunu ispat eden bir diğer çalışma da İtalyan ballarının konu edildiği çalışmadır (Spano v.d. 2008). Çalışma kapsamında kullanılan materyaller bal, polen ve bal peteğinin karışımından elde edilen ve 100°C'lik işlem sürecine tabi tutulan yöresel ürünlerden oluşmaktadır. Dokuz tanesi marketten temin edilen 13 adet ballı numune örneğinde invertaz aktivitesi ölçülmüş ve değer aralıkları 0-1,2 U/kg olarak bulunmuştur. Araştırmacılar bu düşük sonucun 100°C'lik ısıtmadan kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir (Spano v.d. 2008).

Literatür açısından özellikle ham balların konu edildiği ve glukoz oksidaz aktivitesinin araştırıldığı çalışmalar son derece kısıtlıdır. Mevcut çalışmamızdaki glukoz oksidaz aktivitesi için kullanılan birimle aynı olan 45 balın araştırıldığı çalışmada enzim aktivitesi 40,3-347,6 $\mu\text{g H}_2\text{O}_2/\text{g bal.h}$ olarak bulunmuştur (Flanjak v.d. 2016). Flanjak v.d. (2016)'nın sonuçlarına uyum gösteren bir başka çalışma da Strelec v.d. (2018) tarafından gerçekleştirilmiş olup 20 balın glukoz oksidaz

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

sonuçlarını 25,6-402,5 µg H₂O₂/g bal.h olarak bulmuştur. Refere edilen her iki çalışmadaki yüksek değerler, ilgili çalışmamız sonucu ile uyum göstermemiş olmasının nedeni, bir başka bilimsel çalışma ile açıklanmaya çalışmıştır. Bu çalışmadaki ifade; balda bulunan enzimlerin aktivitesi bal arısı ırklarına, yaşlarına, koloninin durumuna, nektar akışına ve çevresel koşullara göre farklılık göstereceği şeklindedir (Anklam 1998, Belay v.d. 2017).

Ancak çalışmamızda görülen glukoz oksidaz aktivitesindeki mevcut durum, ham balların göstermiş olduğu göreceli üstünlüktür (Tablo 1: **RH 1-6** T.E.-11,207 µg H₂O₂/ g bal.h; **CH 7-18** T.E.-2,894 µg H₂O₂/ g bal.h). Glukoz oksidaz aktivitesinde ham balların ticari ballara göre gözlemlenen en yüksek değerlerinin kıyası açısından (**RH3/CH12**; 11,207 µg H₂O₂/ g bal.h /2,894 µg H₂O₂/ g bal.h =2,87) yaklaşık 3 katlık üstünlük, balların tazeliğiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak yine de aynı grup içerisinde tespit edilemeyen (**RH4**) ve düşük (**RH6**) değerlerin de olması raf ömürleri içerisindeki olası sıcaklık değişimlerinin bu aktivitenin kaybına neden olmuş olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Bu yorum, depolama süresindeki sıcaklık değişimlerinin glukoz oksidaz aktivitesini tedrici olarak düşürdüğünü vurgulayan Dimiņš v.d. (2006)'nin değerleriyle desteklenmektedir. Göreceli bu olumsuz duruma rağmen tüm bu veriler ışığında bazı ham balların göstermiş olduğu yüksek glikoz oksidaz aktivitesinin daha önce yapılan bilimsel çalışmaların da belirttiği üzere antimikrobiyal aktiviteyi de artırması beklenmektedir (Li v.d. 2008, Mandal ve Mandal 2011). Bu itibarla refere edilen bu kanıt, ham balların ticari ballara göre terapötik etkenlere daha duyarlılığı olduğunu ortaya koymaktadır.

ÖNERİLER VE SONUÇ

Çalışma kapsamında edinilen sonuçlara göre son zamanlarda piyasada yerini almaya başlamış, terminolojik olarak da ham bal olarak tanımlanan, ısıl işleme ve ileri seri üretim süreçlerine maruz kalmayan balların invertaz ve glukoz-oksidad değerleri muadilleri olan ticari ballara göre yüksektir. Her iki enzimatik değerlendirmede elde edilen bu yüksek sonuçlar, istatistiki olarak da test edilmiş gerek invertaz gerekse glukoz-oksidad aktivitesi ham ballar için ticari ballara göre ayırt edici bir parametre olarak görülmüştür ($p<0,05$). Özellikle ısıl işleme ve uzun süreli saklama koşullarına karşı son derece duyarlı olan bu enzimler, hızlı bir şekilde inaktif forma geçer ve aktivitesini tedrici olarak

kaybederler. Invertazın oda sıcaklığından 50°C'ye kadar yavaş; 50°C'nin üzerinde hızlı aktivite kaybı göstermesi bu söylemin bir dayanağıdır (Dimiņš v.d. 2014; Vorlov ve Piidal 2002). Hatta Bogdanov (2008)'göre 30°C'nin üzerindeki sıcaklık değerlerinde invertaz aktivitesinin yarılanma ömürleri hızlı bir düşüş sergilemektedir. İlgili kaynak invertazın yarılanma ömrünü; 30°C'de 83 gün, 40°C'de 9,6 gün, 50°C'de 1,3 gün, 60°C'de 4,7 saat ve 70°C'de ise 47 dakika olarak belirtmiştir (Bogdanov 2008). Dolayısıyla ballar ısıl işleme maruz kalması bu enzimlerin yıkımı için gerekçeli bir nedendir. Özellikle Almanya, Belçika ve İspanya'nın aralarında bulunduğu bazı Avrupa ülkelerini özellikle invertaz değerlerini ısıl işleme ve uzun süreli saklama etkinliğine karşın balın tazeliğinin ölçütü olarak kullanmakta iken (Bogdanov v.d. 2004) diğer ülkelerin de bu ölçütü tartışması olasıdır. Çalışmamızın istatistiki değerlendirmeli mevcut sonuçlarına göre ortaya konulabilecek öneri, gerek invertaz ve gerekse glukoz oksidaz değerlerinin ham bal numunelerinde göstermiş olduğu dereceli üstünlük ham ballar adına diğer ballardan ayırt edilebilecek bir analiz ve dolaylı olarak bir kalite parametresi olarak görülebileceğidir. Ayrıca yararlanılan kaynaklar göz önünde bulundurulduğunda ilgili enzim aktivitesinin raf ömrü boyunca göreceli olarak sabit kalması adına ısıtmaya dair kullanılan işlem tekniklerine dikkat edilmelidir. Hatta ham bal özellikli ballarda ~12 saatten fazla süreyle ~45°C'nin üzerindeki sıcaklıklara çıkılmaması gerekmektedir. Aksi halde enzimatik aktivitenin kaybı ile sonuçlanacak olan bu durumda, ham bal tanımı pastörize bal ile yer değiştirmelidir. Tüm bu bilgiler ışığında, kalite parametresi olarak gördüğümüz bu değerler nispetinde tüketicinin hangi ürünü aldığını bilmesi adına, piyasa sunulan balların tanımlarının tam olarak yapılması ve bala dair tebliğlerde ham bal ve pastörize bal tanımlarının açıkça belirtilmesi gerekmektedir. Ayrıca mevcut çalışmamız, ilgili enzimlerin kalite parametresinin sayısal değerlerini tam olarak belirlenmesi adına ham balların konu edineceği daha geniş örneklem grubuyla yapılacak olan çalışmalara ışık tutması açısından önemlidir.

Beyanname

Çalışma kapsamında satın alımlarında herhangi bir kısıtlama olmayan market balları ticari etiketli numuneler olarak kullanılmış ve ilgili firma bilgileri saklı tutulmuştur. Elde edilen sonuçlarda tanımlayıcı ve reklama giren herhangi bir ifade kullanılmamıştır. Bu bağlamda, çalışmada ismi olan yazarlar, konuya

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ve çalışmanın tümüne dair herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

- Akyol, E., Doğan, H., Selamoğlu Talas, Z., Akgül, H., Unalan, A. 2015. Determining the total antioxidant status and oxidative stress indexes of honey samples obtained from different phytogeographical regions in Turkey. *Fresenius Environ. Bull.* 24(4):1204-1208.
- Al-Sherif, AA., Mazeed, AM., Ewis, MA., Nafea, EA., Hagag, ESE., Kamel, AA. 2017. Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*Apis mellifera* L). *Physiol Entomol.* 42(4): 397–403. <https://doi.org/10.1111/phen.12213>
- Anklam, E. 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00057-0)
- Aumeeruddy, MZ., Aumeeruddy-Elalfi, Z., Neetoo, H., Zengin, G., Blom van Staden, A., Fibrich, B., Lambrechts, S., Rademan, S., Szuman, KM., Lall, N., Mahomoodally, F. 2019. Pharmacological activities, chemical profile, and physicochemical properties of raw and commercial honey. *ISBAB.* 18:101005. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.01.043>
- Belay, A., Haki, GD., Birringer, M., Borck, H., Lee, YC., Kim, KT., Baye, K., Melaku, S. 2017. Enzyme activity, amino acid profiles and hydroxymethylfurfural content in Ethiopian monofloral honey. *Int. J. Food Sci. Tech.* 54(9): 2769–2778. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2713-6>
- Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, MP., Albertini, MC., Piatti, E. 2006. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.* 97(2): 217–222. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.03.039>
- Bogdanov, S. 2008. Storage, Crystallisation and Liquefaction of Honey. *Bee Products Science.* 1-5.
- Bogdanov, S. 2009. *Harmonised methods of the international honey commission.* Retrieved from <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>
- Bogdanov, S., Ruoff, K., Persano Oddo, L. 2004. Nectars and the salivary fluids, and pharyngeal gland secretions of honeybees can be cited as the source of these enzymes, but the degree of enzyme activities can show noticeable differences in honey types. *Apidologie.* 35: S4–S17. <https://doi.org/10.1051/apido:2004047>
- da Silva, PM., Gauche, C., Gonzaga, LV., Costa, ACO., Fett, R. 2016. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem.* 196: 309–323. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.051>
- Dimiņš, F., Kūka, P., Kūka, M., Čakste, I. 2006. The Criteria of Honey Quality and Its Changes during Storage and Thermal Treatment. *LLU Raksti.* 16(311): 73-78.
- Dimiņš, F., Mikelsone, V., Kūka, P., Jefremovs, AN. 2014. Effects of different types of heat treatment on invertase activity in honey. In Evita Straumite (Ed.), *Foodbalt 2014* (pp. 284–288). Jelgava, Latvia: LLU, Faculty of Food Technology.
- Doğan, H., Akyol, E., Akgül, H., Selamoğlu Talas, Z. 2014. Biologic activity of honeybee products obtained from different phytogeographical regions of Turkey. *TURJAF.* 2(6): 273-276. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v2i6.273-276.151>
- Duisberg, H., Hadorn, H. 1966. Welche anforderungen sind an handelshonige zu stellen? *Mitt Geb Lebensmittelunters Hyg.* 57: 386–407.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Seijo, M C. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chem.* 149: 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.097>
- Flanjak, I., Strelec, I., Kenjeric, D., Primorac, L. 2016. Croatian produced unifloral honey characterized according to the protein and proline content and enzyme activities. *J. Apic. Res.* 60(1): 39–48. <https://doi.org/10.1515/jas-2016-0005>
- Geană, E. I., Ciucure, C. T., Costinel, D., Ionete, RE. 2020. Evaluation of honey in terms of quality and authenticity based on the general physicochemical pattern, major sugar composition and $\delta^{13}C$ signature. *Food*

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Control.* 109 (106919): 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106919>
- Li, J., Feng, M., Zhang, Z., Pan, Y. 2008. Identification of the proteome complement of hypopharyngeal glands from two strains of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 39(2): 199–214.
<https://doi.org/10.1051/apido:2007059>
- Mandal, MD., Mandal, S. 2011. Honey: Its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 1(2): 154–160.
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Moreira, RFA., De Maria, CAB., Pietroluongo, M., Trugo, LC. 2007. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chem.* 104(3): 1236–1241.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.055>
- Ömür, B. 2015. *Investigation of the biochemical properties of the chestnut (Castanea sativa Mill.) honeys produced in the Black Sea region.* Ordu University, Institute for Graduate Studies in Natural and Technology.
- Roininen, K., Lähteenmäki, L., Tuorila, H. 1999. Quantification of consumer attitudes to health and hedonic characteristics of foods. *Appetite*. 33(1): 71–88.
<https://doi.org/10.1006/appe.1999.0232>
- Román, S., Sánchez-Siles, LM., Siegrist, M. 2017. The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends Food Sci Tech.* 67: 44–57.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.010>
- Sajid, M., Yamin, M., Asad, F., Yaqub, S., Ahmad, S., Mubarik, MAMS., Ahmad, B., Ahmad W., Qamer, S. (2019). Comparative study of physio-chemical analysis of fresh and branded honeys from Pakistan. *Saudi J. Biol. Sci.*
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.014>.
Article in Press
- Spano, N., Ciulu, M., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, MI., Piu, PC., Scanu, R., Sanna, G. 2008. Chemical characterization of a traditional honey-based Sardinian product: Abbamele. *Food Chem.* 108(1): 81–85.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.046>
- Strelec, I., Crevar, B., Kovac, T., Rajs, B. B., Primorac, L., Flanjak, I. 2018. Glucose oxidase activity and hydrogen peroxide accumulation in Croatian honeys. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 10(1): 33–41.
<https://doi.org/10.17508/CJFST.2018.10.1.06>
- Subramanian, R., Umesh Hebbar, H., Rastogi, N. K. 2007. Processing of honey: A review. *Int. J. Food Prop.* 10(1): 127–143.
<https://doi.org/10.1080/10942910600981708>
- Şahinler, N., Gül, A., Akyol, E., Öksüz, A. 2009. Heavy metals, trace elements and biochemical composition of different honey produced in Turkey. *Asian J. Chem.* 21(3): 1887-1896.
- Vorlov, L., Piidal, A. 2002. Invertase and Diaastase Activity in Honeys of Czech Provenience. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 5: 57–66.
- White, JWJ. 1975. Composition of Honey. In C. Eva (Ed.), *Honey – A Comprehensive Survey* (pp. 157–206). London: Heinemann.