



Ereğli (Konya, Türkiye) Bölgesinden Bal Arılarının Topladığı Polenin Etanol Ekstraktının Antioksidan ve *in Vitro* Bazı Enzim İnhibitör Aktiviteleri

Haluk ÖZPARLAK*, **Gökhan ZENGİN**, **Ramazan CEYLAN**
*Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KONYA
e-mail: hozparlak@selcuk.edu.tr

Öz: Arı poleni bal arıları tarafından granüller şeklinde paketlenen ve daha sonra insanlar tarafından kovanlardan hasat edilen en saf ve en zengin doğal besin takviyelerinden biridir. Bal arılarının topladığı polen, proteinler, aminoasitler, karbohidratlar, lipidler, vitaminler, mineral maddeler gibi besleyici temel unsurlardan oluşur. Polenin sağlık üzerindeki olumlu etkisi fenolik bileşiklere sahip olmasından dolayı antioksidan aktivitesine bağlanmaktadır. Son yıllarda arı poleniyle ilgili çok sayıda araştırma yayınlanmıştır. Arı poleni ve diğer arı ürünleri üzerinde birçok araştırma yapılmış olsa da, enzim inhibisyonu üzerine çok az çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, bu araştırmanın amacı Ereğli (Konya, Türkiye) bölgesinden bal arılarının topladığı karışık polenin etanol ekstraktının total fenolik ve flavonoid içeriklerini ve antioksidan aktivitesini, ayrıca bu ekstraktın kolinesteraz, amilaz ve glukozidaza karşı enzim inhibitör potansiyellerini ilk kez tespit etmektir. Bu çalışmada rutin çalışmalardan farklı olarak ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Ekstrakttaki total fenolik ve flavonoid içerikleri de Folin-Ciocalteu ve $AlCl_3$ yöntemleriyle tespit edildi. Antioksidan aktiviteleri serbest radikal süpürme (DPPH ve ABTS), indirgeme gücü (FRAP ve CUPRAC), fosfomolibdat ve metal şelatlama testleri gibi farklı yöntemlerle araştırıldı. *In vitro* enzim inhibitör potansiyelleri bir mikropate okuyucuyla ölçüldü. Aktiviteler standart eş değerler olarak değerlendirildi. Bu çalışmanın sonuçları göstermiştir ki, i. antioksidan aktivitesi açısından, Ereğli bölgesinden elde edilen arı poleni sağlığa yararlı formülasyonlarda ileride kullanmak için değerli fonksiyonel içeriğiyle doğal bir kaynak olarak düşünülebilir, ii. bu bölgenin poleni, Alzheimer ve Diabetes mellitus gibi önemli sağlık problemlerinin tedavisi için doğal bir enzim inhibitörü kaynağı olarak göz önüne alınabilir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, arı poleni, enzim inhibisyonu.

Antioxidant and *in Vitro* Some Enzyme Inhibitory Activities of Ethanol Extract of Honeybee-Collected Pollen From From Ereğli (Konya, Turkey) Region

Abstract: Pollen of bee is one of the purest and the richest natural food supplements packed by honeybees into granules and subsequently harvested from hives by humans. Honeybee-collected pollen is composed of nutritionally essential substances such as proteins, amino acids, carbohydrates, lipids, vitamins, mineral substances and trace elements. Its beneficial effect on health is thought to be due to the presence of phenolic compounds with its antioxidant activity. In recent years, many papers have been published on issues concerning bee pollen. Although many studies have been conducted on bee pollen and other bee products, there are few studies of enzyme inhibition. Therefore, the aim of this study was to determine the total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity of ethanol extract of honeybee-collected mixed pollen from Ereğli (Konya, Turkey) region, as well as the enzyme inhibitory potentials of this extract against cholinesterase, amylase and glucosidase for the first time. In the present study, ultrasonication assisted extraction method was used in contrast to routine methods. Total phenolic and flavonoid contents present in the extract were also determined by Folin-Ciocalteu and $AlCl_3$ assays. Antioxidant activities were investigated by using different assays, including free radical scavenging assays (DPPH and ABTS) reducing power (FRAP and CUPRAC), phosphomolybdenum and metal chelating assays. The *in vitro* enzyme inhibitory potentials were measured with a microplate reader. The activities were evaluated as standard equivalents. Results indicate that, i. in terms of antioxidant activity, pollen of bee obtained from Ereğli region could be considered as a natural source of valued functional ingredients for further use in healthful formulations, ii. this pollen could be taken into consideration as a source of natural enzyme inhibitors for the treatment of major health problems such as Alzheimer disease and Diabetes mellitus.

Keywords: Antioxidant, bee pollen, enzyme inhibition.

1. Giriş

Arı poleni bal arıları tarafından granüller şeklinde paketlenen ve daha sonra insanlar tarafından kovanlardan hasat edilen en saf ve en zengin doğal besin takviyelerinden biridir. Polen yapısında % 13-55 karbohidrat, % 10-40 protein, % 20-30 su, % 1-13 lipit ve % 20 civarında diğer maddeleri bulundurur ki bir canlının büyüüp gelişebilmesi için günlük alınması gereken aminoasitleri vitaminleri ve mineral maddeleri yeterli miktarlarda ve dengeli olarak içermektedir. Bununla birlikte polenin kaynağına göre bu oranların farklılık gösterdiği de bilinmektedir (Sammataro ve Avitabile, 2004). Arı poleni yüksek besleyici ve enerji verici özelliklerinin yanı sıra sahip olduğu antioksidan, antiaging, antikanserojen, antienflamatuar, damar tıkanıklığı önleyici, kalp damar sistemini koruyucu, kan kolesterol seviyesini düşürücü, bağışıklığı uyarıcı, antiosteoporoz ve antianemik özellikleri sebebiyle insanlar tarafından sıklıkla tüketilen ticari açıdan önemli bir kovan kaynaklı gıda takviyesidir (Anonim, 2017).

Polenin antioksidan aktivitesi içeriğinde yer alan polifenoller, tiyoller ve flavonoidlerle ilişkilidir. Fenolik bileşikler antiradikal özellik gösterirler yani radikal süpürücü etkiye sebep olurlar. İçinde bulunan polifenoller sayesinde polen, kanser, antienflamatuar, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik

rahatsızlıkların önlenmesi için doğal bir besin olarak kullanılmaktadır. Yine polen içinde bulunan quersetin, rutin ve chrysin flavonoidleri hücrede apoptozu arttırarak kanser oluşumunu engellemeye yardımcı olmaktadır (Campos ve ark., 2008 ve 2010, Mărghitaş ve ark., 2009).

Son yıllarda polenlerin biyolojik aktivitesi özellikle de antioksidan potansiyelleri üzerine çok sayıda araştırma bulunmasına rağmen (Nagai ve ark., 2002; Almaraz-Abarca ve ark., 2004; Carpes ve ark., 2007; Leja ve ark., 2007; Le Blanca ve ark., 2009; Mărghitaş ve ark., 2009; Rzepecka-Stojko ve ark., 2012; Fatrcova-Sramkova ve ark., 2013), enzim inhibisyon aktiviteleri üzerine sınırlı sayıda çalışma (Yildiz ve ark., 2014; Araújo ve ark., 2017) mevcuttur. Bu sebeple bu çalışmada Ereğli (Konya, Türkiye) bölgesinden bal arılarının topladığı karışık polenin etanol ekstraktının total fenolik ve flavonoid içeriklerinin ve antioksidan aktivitesinin, ayrıca bu ekstraktın amilaz, glukozidaz ve kolinesteraza [Asetilkolinesteraz (AChE) ve Bütirilkolinesteraz (BChE)] karşı enzim inhibitör potansiyellerinin ilk kez tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Polen Materyali Ve Etanol Ekstraktının Hazırlanması

Farklı bitkilerden bal arılarının topladığı karışık polen örneği (Şekil 1)

Ereğli (Konya, Türkiye) ilçesindeki arıcılardan temin edildi ve laboratuarda 40-45°C'de kurutularak değirmende toz haline getirildi. Bu çalışmada rutin yöntemlerin aksine ultrasonik ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Etanol ekstraktın hazırlanması için 20 mL etanol içerisindeki kurutulmuş 10 g polen örneği 60 dk süreyle 30°C'lik bir sonikatör banyoda (WiseClean, WUC-D06H) bekletildi. Daha sonra 40°C'de rotary evaporatörde etanol uzaklaştırıldı ve elde edilen ekstrakt analize kadar +4°C'de saklandı.



Şekil 1. Ereğli (Konya) bölgesindeki farklı bitkilerden bal arıları tarafından toplanan karışık polen örneği

2.2. Toplam Fenolik Madde Tayini

Polen ekstraktından (2 mg/mL) 250 µL bir deney tüpüne alındı ve ardından 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (1:9 oranında seyreltilerek) eklendi. Daha sonra 750 µL %1'lik Na₂CO₃ çözeltisinden ilave edildi. Bu karışım karanlıkta ve oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra 765 nm'de absorbansı ölçüldü (Shimadzu UV-1800).

Tüm işlemler standart olarak kullanılan gallik asit için de gerçekleştirildi. Polen örneğinin fenolik madde içeriği g ekstraktta gallik asit eş değeri (mgGAE/g) olarak sunuldu (Özparlak ve ark., 2016a).

2.3. Toplam Flavonoid Madde Tayini

Polen ekstraktından (1 mg/mL) 1 mL deney tüpüne konuldu ve ardından 1 mL metanolik AlCl₃ çözeltisi eklendi. 10 dakika bekledikten sonra 415 nm'de karışımın köre karşı absorbansı belirlendi. Tüm işlemler standart flavonoid olan rutin için de yapılarak rutine ait kalibrasyon eğrisi çizildi. Polen örneğinin toplam flavonoid madde içeriği g ekstraktta rutin eş değeri (mgRE/g) olarak sunuldu (Özparlak ve ark., 2016a).

2.4. ABTS Radikal Giderme (Süpürme) Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu metotta ABTS.+ radikal katyonu, 7.4 mM ABTS solüsyonu ile 2.45 mM potasyum persülfatın reaksiyona girmesiyle direk olarak üretildi. Bu karışım 12-16 saat karanlıkta bekletilerek aktif radikal oluşması sağlandı. Analizden önce ABTS solüsyonununun 734 nm'de absorbansı 0.700±0.02 olacak şekilde metanolle seyreltildi. Polen ekstraktından 1 mL alınarak 2 mL ABTS solüsyonuyla karıştırıldı. Kapalı tüp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve ardından absorbans 734 nm'de okundu. Aynı işlemler troluks içinde gerçekleştirildi ve ekstraktın ABTS katyon radikalini süpürme aktivitesi troluks eş

değer (mgTE/g) olarak sunuldu (Özparlak ve ark., 2016a).

2.5. DPPH Radikal Giderme (Süpürme) Aktivitesinin Belirlenmesi

Metanolik DPPH çözeltisi %0.004'lük olacak şekilde hazırlandı, ardından polen ekstraktının 1 mL'si hazırlanan DPPH çözeltisinin 4 mL'siyle karıştırıldı. Tüpün ağzı kapatılıp iyice karıştırıldıktan sonra karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Ardından absorbans 517 nm'de okundu. Aynı işlemler troloks içinde gerçekleştirildi ve polen örneğinin DPPH radikalini giderme (süpürme) aktiviteleri g ekstraktta troloks eş değer (mgTE/g) olarak sunuldu (Özparlak ve ark., 2016a).

2.6. FRAP Testi

Bu test için öncelikle 0.3 M pH'sı 3.6 olan asetat tamponu, 10 mM TPTZ ve 20 mM FeCl₃'ün 10:1:1 oranında karıştırılmasıyla FRAP reaktifi hazırlandı. Polen ekstraktının 0.1 mL'si hazırlanan FRAP reaktifinin 2 mL'siyle karıştırılarak, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu karışımın absorbansı 593 nm'de okundu ve sonuçlar g ekstraktta troloks eşdeğer (mgTE/g) olarak sunuldu (Özparlak ve ark., 2016a).

2.7. CUPRAC Testi

Polen ekstraktından 0.5 mL alınarak üzerine 1 mL CuCl₂.2H₂O (10 mM), 1 mL amonyum asetat (1 M; pH:7) ve 1 mL neokuproin (7.5 mM) çözeltileri konuldu. Ağzı kapalı bir biçimde karanlıkta ve oda

sıcaklığında 30 dakika bekletilerek ardından absorbansları 450 nm'de okundu. Sonuçlar g ekstraktta troloks eşdeğer (mgTE/g) olarak sunuldu (Özparlak ve ark., 2016a).

2.8. Fosfomolibdat Testi

2 mg/mL konsantrasyonunda polen ekstraktından 0.3 mL bir tüpe alındı ve bunun üzerine reaktif çözeltisinden (0.6 M H₂SO₄, 28 mM Na₂HPO₄.12H₂O ve 4 mM amonyum molibdat) 3 mL eklendi. İyice karıştırılan tüp 95°C'de 90 dakika inkübe edildi ve ardından çözeltilerin absorbansı 695 nm'de okundu. Tüm işlemler standart antioksidan olarak kullanılan troloks için de uygulandı. Antioksidan aktivite g ekstraktta troloks eşdeğeri (mmolTE/g) olarak sunuldu (Özparlak ve ark., 2016a).

2.9. Metal Şelatlama Aktivitesi

Polen ekstraktının Fe⁺² iyonlarını şelatlama kapasitelerini belirlemek için önce içerisinde 2 mL polen ekstraktı (1 mg/mL) bulunan deney tüpüne 2 mM 0.05 mL FeCl₂ çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon 0.2 mL 5 mM ferrozin ilavesiyle başlatıldı, tüpler karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı ve ardından 562 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirildi. Tüm işlemler şelatlayıcı ajan olan EDTA içinde uygulandı. Sonuçlar g ekstraktta EDTA eş değer (mgEDTA/g) olarak sunuldu (Özparlak ve ark., 2016a).

2.10. Antiglukozidaz Aktivitesi

α -glukozidaz inhibitör aktivitenin belirlenmesi için mikrolate kuyucuklarına 2

mg/mL konsantrasyondaki 50 µL polen ekstraktı, 50 µL glutasyon, fosfat tamponunda znmş 50 µL α-glukozidaz zltisi ile 50 µL PNPG (4-p-nitrofenil-α-D-glukopiranozid) ilave edilerek 10 dakika süreyle 37°C’de inkübe edildi. Aynı Şekilde, α-glukozidaz enzim zltisi konmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek zltisi eklenerek kr hazırlandı. Reaksiyon 0.2 M 50 µL sodyum karbonat ilavesiyle tamamlandı. Örneklerin ve körlerin absorbsanları mikroplate okuyucuda 400 nm’de kaydedildi ve körlerin absorbsanları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbsanlara ulaşıldı. α-glukozidaz inhibitör aktiviteleri g ekstrakta akarboza eşdeğer (mmolAKAE/g) olarak sunuldu (zparlak ve ark., 2016b).

2.11. Antiamilaz Aktivitesi

Bu çalışmada α-amilaz inhibitör aktivite Caraway-Somogyi iyot/potasyum iyodür (IKI) yöntemiyle belirlendi. Mikroplate kuyucuklarına 2 mg/mL konsantrasyondaki 25 µL polen ekstraktı ve fosfat tamponunda (pH=6.9 ve 6 mM sodyum klorür) hazırlanmış 50 µL α-amilaz zltisi eklenerek, 10 dakika süreyle 37°C’de inkübe edildi. Ardından bu rnelere %0.05’lik 50 µL nişasta zltisi eklendi. Aynı Şekilde, α-amilaz enzim zltisi olmadan hazırlanmış reaksiyon reaktiflerine örnek zltisi ilave edilerek kr hazırlandı ve karışım 10 dakika süreyle 37°C’de inkübe edildi. 1 M 25 µL HCl

eklenerek reaksiyon durduruldu ve ardından 100 µL iyot-potasyum iyodür zltisi ilave edildi. Örneklerin ve körlerin absorbsanları mikroplate okuyucuda 630 nm’de kaydedildi ve körlerin absorbsanları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbsanlara ulaşıldı. α-amilaz inhibitör aktiviteleri g ekstrakta akarboza eşdeğer (mmolAKAE/g) olarak sunuldu (zparlak ve ark., 2016b).

2.12. Antikolinesteraz Aktivitesi

Kolinesteraz inhibitör aktivite 96 kuyucuklu mikroplate kullanılarak lld. Mikroplate kuyucuklarına 2 mg/mL konsantrasyondaki 50 µL polen ekstraktı, 125 µL DTNB [5,5-Dithio-bis(2-nitrobenzoik) asit], 25 µL Tris-HCl tamponunda (pH=8.0) hazırlanan AChE veya BChE enzim zltisi ilave edildi. Ardından karışım oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek 25 µL asetiltiyokolin iyodür (ATCI) veya butiriltiyokolin iyodür (BTCl) eklendi. Aynı Şekilde, AChE veya BChE enzim zltisi olmadan hazırlanan reaksiyon reaktiflerine örnek zltisi ilave edilerek kr hazırlandı. Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildikten sonra örneklerin ve körlerin absorbsanları mikroplate okuyucuda 405 nm’de kaydedildi. Körlerin absorbsanları örneklerden çıkarılarak gerçek absorbsanlara ulaşıldı. Kolinesteraz inhibitör aktiviteleri g ekstrakta galantamine eşdeğer (mgGALAE/g) olarak sunuldu (zparlak ve ark., 2016b).

3. Sonuçlar ve Tartışma

Antioksidan kapasiteyi tamamıyla ortaya çıkaran tek bir metot henüz geliştirilememiştir. Bu sebeple araştırmalarda birden fazla metot kullanılarak antioksidan potansiyelin tümüyle ele alınması daha doğru sonuçlara ulaşmayı sağlayacaktır. Bu bağlamda bu çalışmada da polen örneğinden elde edilen etanol ekstraktının antioksidan özellikleri birden fazla sayıda değişik antioksidan test sistemleri kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, bu ekstraktın toplam fenolik ve flavonoid içerikleri de tespit edilmiştir. Fenolikler olarak adlandırılan bileşikler, antioksidan, antikanser ve antimikrobiyal aktivite gibi oldukça geniş bir alanda biyolojik potansiyele sahip olmaları sebebiyle oldukça ilgi çeken bir bileşik grubudur. Polen örneğine ait ekstraktın toplam fenolik içeriği spektrofotometrik Folin metoduyla tespit edilmiştir (Çizelge 1). Fenolik bileşiklerin en önemli gruplarından biri olan flavonoidlerin total içeriği ise bu çalışmada $AlCl_3$ metoduyla araştırılmıştır (Çizelge 1). Çalışılan polen örneği ekstraktının toplam fenolik içeriği gallik aside eşdeğer hesaplanmıştır ve toplam fenolik içerik 15.90 mgGAE/g olarak belirlenmiştir. Flavonoid içerik ise rutine eşdeğer verilmiştir ve toplam flavonoid içerik 4.89 mgRE/g olarak tespit edilmiştir. Kalaycıoğlu ve ark. (2017) çeşitli arı polenleri üzerine

yaptıkları çalışmada toplam fenolik içeriklerini 7.88 mgGAE/g ile 17.46 mgGAE/g arasında tespit etmişlerdir. Çalışılan polen ekstraktının bu sonuçlarla karşılaştırılması sonucu orta düzeyde bir fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Araújo ve ark. (2017) yapmış olduğu bir çalışmada ise farklı polenlerin flavonoid içeriklerini 1.42 mgQE/g ile 9.05 mgQE/g arasında tespit etmiştir.

Antioksidan kapasite çalışmalarında genellikle en az bir radikal kullanılarak incelenen ekstraktın bu radikali hangi seviyede giderdiği tespit edilmek istenir. ABTS ve DPPH radikalleri en çok kullanılan radikallerdir. ABTS radikali potasyum persülfatla reaksiyona girerek 12-16 saat sonra aktif hale gelmekte ve radikalın koyu mavi rengi antioksidan maddelerin etkisiyle açılmaktadır. DPPH stabil bir radikaldir ve metanolik çözeltisi mor renklidir. Antioksidan maddelerin bu radikale elektron veya hidrojen aktarmalarıyla mor renk sarı renge dönüşmektedir ki bu renk değişimi 517 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Polen ekstraktının bu iki metoda göre radikal giderme etkinliği Çizelge 1'de verilmiştir. ABTS ve DPPH radikalleri süpürme aktiviteleri troloksa eşdeğer hesaplanmıştır. ABTS radikal süpürme aktivitesi 34.77 mgTE/g ve DPPH radikal süpürme aktivitesi 19.64 mgTE/g olarak bulunmuştur. Čeksterytė ve ark.

(2016) arı poleni üzerine yapmış oldukları çalışmada ABTS radikali süpürme aktivitesini 6.47 mgTE/g ve DPPH radikali süpürme aktivitesini 1.44 mgTE/g olarak bulmuşlardır. Çalışmış olduğumuz Konya-Ereğli bölgesinden toplanmış olan arı poleni bu sonuçlarla kıyaslandığında oldukça yüksek radikal süpürme aktivitesine sahiptir.

İndirgeme gücü antioksidan kapasitenin ölçülmesinde önemli bir parametredir ve antioksidan bileşiklerin elektron verme yeteneğini gösterir. Bu çalışmada FRAP ve CUPRAC testleri uygulanmıştır. FRAP testinde Fe^{+3} -TPTZ kompleksinin Fe^{+2} 'ye indirgenmesi ve bunun 595 nm'de spektrofotometrik ölçümü söz konusudur. CUPRAC testi ise antioksidan bileşiklerin Cu^{+2} -neokuproin kompleksini Cu^{+} 'e indirgemesine ve 450 nm'de bu değişimin ölçülmesi prensibine dayanır. Polen ekstraktının bu iki metoda göre indirgeme gücü Çizelge 1'de sunulmuştur. FRAP ve CUPRAC indirgeme gücü aktiviteleri troloksa eşdeğer olarak verilmiştir. FRAP için 18.02 mgTE/g ve CUPRAC için 77.12 mgTE/g indirgeme gücü sonuçları tespit edilmiştir. Ulusoy ve Kolaylı (2014) Anzer arı polenleri üzerine yapmış oldukları çalışmada FRAP indirgeme gücü değerlerini 11.77 μ molTE/g ile 105.66 μ molTE/g arasında, CUPRAC indirgeme gücü değerlerini ise 33.1 μ molTE/g ile 91.8 μ molTE/g arasında rapor etmişlerdir.

Fosfomolibdat testi asidik ortamda antioksidan bileşiklerin Mo(VI)'yı Mo(V)'e indirgemesine ve oluşan yeşil renkli Mo(V)-fosfat kompleksinin 595 nm'de ölçülmesi esasına dayanır. Bu metot kolay ve ekonomik olması sebebiyle son yıllarda antioksidan kapasite çalışmalarında çok tercih edilmektedir. Polen ekstraktının bu testteki aktivitesi troloksa eşdeğer verilmiştir ve 260.54 mmolTE/g ekstrakt olarak bulunmuştur (Çizelge 1).

Geçiş metalleri Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarıyla hidroksil radikalının üretiminde bir katalizör gibi rol oynar. Hidroksil radikali lipid peroksidasyonunun bir başlatıcısıdır ve bu radikalın etkisiz hale getirilmesi önemlidir. Bu sebeple geçiş metallerinin şelatlama yeteneği antioksidan özelliklerin başında gelmektedir. Bu çalışmada ekstraktın şelatlama yeteneği ferrozin testi kullanılarak incelenmiştir ve testin sonucu EDTA eşdeğeri olarak verilmiştir. Bu testin sonucuna göre de polen örneğimizin metal şelatlama aktivitesi 9.47 mgEDTAE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1).

Değişik polen örneklerinin antioksidan özellikleri üzerine çeşitli çalışmalar olmasına rağmen bu çalışmalarda farklı sonuçlara ulaşılmıştır (Nagai ve ark., 2002; Almaraz-Abarca ve ark., 2004; Carpes ve ark., 2007; Leja ve ark., 2007; Le Blanca ve ark., 2009; Mārghitaş ve ark., 2009; Fatrcova-Sramkova ve ark., 2013). Genel

olarak bakıldığında arı polenlerinin orta düzeyde antioksidan aktivite sergilediği gözlenmiştir. Bu durum çalışmamızda da ortaya konulmuştur. Bununla birlikte sentetik antioksidanların yan etkileri düşünüldüğünde polenler doğal antioksidan kaynağı olarak düşünülebilecek niteliktedir.

Karbonhidrat sindiriminde görev alan α -amilaz ve α -glukozidaz anahtar enzimlerdir. Nişasta, α -dekstrin ve maltoz α -amilaz tarafından hidrolize edilirken, α -glukozidaz ince barsakta disakkaritleri ve oligosakkaritleri glukoz monomerlerine hidroliz etmektedir. Bu sebeple α -amilaz ve α -glukozidaz enzimlerinin inhibisyonu artan kan glukoz seviyesinin azaltılmasında önemli bir noktadır. Akarboz ve miglitol gibi glukoz seviyesini düşüren inhibitör ilaçların yerine doğal inhibitörlerin önemi dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından yapılan öneriden sonra daha da fazla dikkat çekmektedir (Laube, 2002; Singh ve ark., 2010). Bu çalışmada elde edilen polen ekstraktına ait α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon değerleri akarboz eşdeğeri olarak verilmiştir. α -amilaz inhibisyonu için 0.34 mmolAKAE/g ve α -glukozidaz inhibisyonu için 2.57 mmolAKAE/g değerleri tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Nöron ve akson kaybıyla asetilkolin seviyesindeki azalma Alzheimer hastalığında görülen bir durumdur. Bu sebeple asetilkolin seviyesini artırmak Alzheimer tedavisinde önemlidir.

Asetilkolin düzeyi asetilkolini yıkan kolinesteraz enzimlerinin baskılanmasıyla arttırılabilir. AChE ve BChE farklı genlerle kodlanan ancak özellikle substrat seçicilikleri ve bazı katalitik mekanizmalarındaki farklılıkları sebebiyle birbirinden ayrılan enzimlerdir (Howes ve ark., 2003). Çalışmalarda, kolinesteraz inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyindeki artışların, Alzheimer hastalığının erken dönemlerindeki bilinç kayıplarını iyileştirebileceği vurgulanmaktadır ve bu sebeple Alzheimer tedavisinde fizostigmin ve galantamin gibi sentetik kolinesteraz inhibitörleri geliştirilmiştir. Bununla birlikte bu gibi sentetik inhibitörlerin çeşitli toksik etkileri olması ve kısa ömürlü olmaları klinik açıdan kullanımlarının sınırlandırılmalarına sebep olmuştur (Melzer, 1998). AChE inhibisyonu ve BChE inhibisyonu değerleri galantamin eşdeğeri olarak verilmiştir. Çizelge 2’de görülebileceği gibi polen ekstraktının AChE inhibisyon değeri 2.51 mgGALAE/g ve BChE inhibisyon değeri 1.70 mgGALAE/g olarak bulunmuştur.

Bu çalışmayla Ereğli bölgesi polen örneğinin yukarıda bahsedilen enzim inhibitör aktiviteleri ilk kez tespit edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada polen ekstraktından elde edilen inhibisyon verilerinin çalışılan enzimlerle ilgili yeni inhibitörler geliştirilmesine ışık tutması umut edilmektedir.

Çizelge 1. Ereğli (Konya) bölgesindeki farklı bitkilerden bal arıları tarafından toplanan karışık polen örneğinin etanol ekstraktının antioksidan aktivitesi

Parametreler	Sonuçlar
Toplam fenolik içerik (mgGAE/g ekstrakt)	15.90±0.27*
Toplam flavonoid içerik (mgRE/g ekstrakt)	4.89±0.06
ABTS radikal giderme aktivitesi (mgTE/g ekstrakt)	34.77±0.19
DPPH radikal giderme aktivitesi (mgTE/g ekstrakt)	19.64±0.34
FRAP aktivitesi (mgTE/g ekstrakt)	18.02±0.14
CUPRAC aktivitesi (mgTE/g ekstrakt)	77.12±1.17
Fosfomolibdat aktivitesi (mmolTE/g ekstrakt)	260.54±18.46
Metal şelatlama aktivitesi (mgEDTAE/g ekstrakt)	9.47±0.12

*Üç paralel ölçümün ortalaması±standart sapma.

GAE: gallik asit eşdeğeri; RE: rutin eşdeğeri; TE: trolox eşdeğeri; EDTAE: EDTA eşdeğeri.

Çizelge 2. Ereğli (Konya) bölgesindeki farklı bitkilerden bal arıları tarafından toplanan karışık polen örneğinin etanol ekstraktının enzim inhibitör özellikleri

Parametreler	Sonuçlar
α -glukozidaz inhibisyonu (mmolAKAE/g ekstrakt)	2.57±0.40*
α -amilaz inhibisyonu (mmolAKAE/g ekstrakt)	0.34±0.03
Asetilkolinesteraz inhibisyonu (mgGALAE/g ekstrakt)	2.51±0.05
Butirilkolinesteraz inhibisyonu (mgGALAE/g ekstrakt)	1.70±0.04

*Üç paralel ölçümün ortalaması ±standart sapma.

AKAE: Akarboz eş değeri, GALAE: Galantamin eş değeri.

Kaynaklar

- Almaraz-Abarca N, Campos MD, Avila-Reyes JA, Naranjo-Jimenez N, Herrera-Corral J, Gonzalez-Valdez LS (2004). Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia* 29(10): 574–6578.
- Anonim (2017). Kovandan gelen gıda takviyeleri. (Erişim tarihi: 01.08.2017) <http://www.gidamuhendisligikongresi.org/images/onuc/df36c111fad0bf8.pdf>
- Araújo SJ, Chambó DE, Costa AM, Cavalcante da Silva MS, Lopes de Carvalho AC, Estevinho ML (2017). Chemical composition and biological activities of mono- and heterofloral bee pollen of different geographical origins. *International Journal of Molecular Science* 18:921.
- Campos MGR, Bogdanov S, Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, Ferreira F (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World* 47(2): 156–6163.
- Campos MGR, Frigerio C, Lopes J, Bogdanov S (2010). What is the future of Bee Pollen? *Journal of Api Product and Api Medical Science* 2(4): 131–6144.
- Carpes ST, Begnini R, De Alencar SM, Masson ML (2007). Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciencia e Agrotecnologia* 31(6): 1818–61825.
- Čeksterytė V, Kurtinaitienė B, Venskutonis PR, Pukalskas A, Kazernavičiūtė R, Balžekas J (2016). Evaluation of antioxidant activity and flavonoid composition in differently preserved bee products. *Czech Journal of Food Science* 34(2): 133–6142.
- Fatrcova-Sramkova K, Nozkova J, Kacaniova M, Mariassyova M, Rovna K, Stricik M (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes* 48(2): 133–6138.
- Howes MJR, Houghton PJ, Perry NSL (2003). Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytotherapy Research* 17: 1–618.
- Kalaycıoğlu Z, Kaygusuz H, Döker S, Kolaylı S, Erim FB (2017). Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT-Food Science and Technology* 84: 402–6408.
- Laube H (2002). Acarbose: An update of its therapeutic use in diabetes treatment. *Clinical Drug Investigation* 22: 141–6156.

- Le Blanca B, Davis, O, Boue S, De Lucca A, Deebya T (2009). Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chemistry* 115(4): 1299–61305.
- Leja M, Mareczek A, Wyzgolik, G, Klepacz-Baniak J, Czekonska K (2007). Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry* 100(1): 237–6240.
- Mărghitaş LA, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobiş O, Popescu O, Bogdanov S, Campos MG (2009). In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry* 115(3): 878–6883.
- Melzer D (1998). New drug treatment for alzheimer’s diseases: lessons for healthcare policy. *British Medical Journal* 316: 762–6764.
- Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N (2002) Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals. *Nutrition-Research New York* 22(4): 519–6526.
- Özparlak H, Zengin G, Kaşık G (2016a). Türkiye’den yabani ve kültüre alınmış *Ganoderma lucidum*’un sulu ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin karşılaştırılması. *Mantar Dergisi* 7(2): 102–6109.
- Özparlak H, Alkan S, Zengin G, Aktümsek A (2016b). Türkiye’deki yabani ve kültüre alınmış *Ganoderma lucidum*’un sulu ekstraktlarının in vitro bazı enzim inhibitör özelliklerinin karşılaştırılması. *Mantar Dergisi* 7(2): 110–6117.
- Rzepecka-Stojko A, Pilawa B, Ramos P, Stojko J (2012). Antioxidative properties of bee pollen extracts examined by Epr spectroscopy. *Journal of Apicultural Science* 56(1): 23–631.
- Sammataro D, Avitabile A (2004). Arı Yetiştiriciliği ve Hastalıkları. Çeviren: Dr. Veteriner hekim: Harun Vatansever, Ankara, 575 s.
- Singh J, Dartois A, Kaur L (2010). Starch digestibility in food matrix: A review. *Trends in Food Science & Technology* 21: 168–6180.
- Ulusoy E, Kolayli S (2014). Phenolic composition and antioxidant properties of Anzer bee pollen. *Journal of Food Biochemistry* 38(1): 73–62.
- Yildiz O, Karahalil F, Can Z, Sahin H, Kolayli S (2014) Total monoamine oxidase (MAO) inhibition by chestnut honey, pollen and propolis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 29(5): 690–694.