

Bingöl İli Genç İlçesi Bal Örneklerinin Fenolik Ekstrelerinin Antikanser, Antioksidan ve Antibakteriyel Aktivitelerinin Belirlenmesi

¹Bülent KAYA*, ²Abdurrahman GÜL, ³Mehmet Ali KUTLU

¹Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 12000 Bingöl, Türkiye

²Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimler Bölümü 12000, Bingöl, Türkiye

³Bingöl Üniversitesi Teknik Bilimler M.Y.O. 12000 Bingöl, Türkiye

*Sorumlu yazar:b_kaya_tr@yahoo.com

Geliş Tarihi: 27.07.2015

Düzeltilme Geliş Tarihi: 27.10.2015

Kabul Tarihi: 28.10.2015

Özet

Balın içeriği ve kalitesi arıların habitatında bulunan bitki örtüsüne bu bitki örtüsünden aldıkları nektar tipine ve miktarına, bölgenin coğrafik konumuna, yükseltisine, ısı değişimlerine, arı kaynaklarının saflığı gibi birçok özelliğe bağlıdır. Toplam fenol içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemiyle Toplam fenolik bileşik 52.60554 ±0.0458mg (mg GAE/gr ekstre başına), toplam flavonoid miktarları alüminyum klorür metoduyla 60.8080 ±0.0555 mg (mg QE/gr ekstre başına), toplam fenolik asit içeriği (TPA) 73.10769 ±0.0309 mg (mg SA/gr ekstre başına), toplam β-karoten 3.64699±0.0636 mg (mg/gr ekstre başına) ve toplam likopen içeriği 5.87298±0.0354 mg (mg/gr ekstre başına) ve toplam antioksidan aktiviteleri ise fosfomolibden yöntemi ile tayin edilerek belirlenmiştir. Antioksidan etkisi 2,2-difenil-1-picrylhidrazil (DPPH) serbest radikali için IC50 değeri 174.37 ±1.414 mg (mg/gr ekstre başına) ile hidrojen peroksit giderme aktivitesi % 71.8405 bulunmuştur. Reaktif oksijen türü olan hidroksil (•OH) radikalinin temizleme etkisi ne bakıldığında 200 µg/ml konsantrasyonda % 28.245 bulunmuştur. Deneylerde standart olarak bütillenmişhidroksitoluen (BHT), bütillenmişhidroksianisol (BHA), α-tokoferol ve α-tokoferolun suda çözünen bir analogu olan troluks kullanılmıştır. HPLC analizde baldaki fenolik bileşikler; krisin, klorojenik asit, kafeik asit, sinapik asit, siringik asit, gallik asit ve ferrulik asit olarak tespit edilmiştir. Mikroorganizmalar gram (+), gram (-) bakteriler (*Bacillus subtilis* IM622, *Staphylococcus aureus* 6538P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* NRRLE 4413, *Klebsiella pneumoniae* EMCS, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 ile mayalar (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) oluşmaktadır. Araştırma sonucunda, bal ekstralarının gram negatif (-) ve gram pozitif (+) bakterilere karşı antibakteriyel aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimelerAntikanser, antimikrobiyal, antioksidan, bal, fenolik bileşikler

Determination of Anticancer, Antioxidant and Antibacterial Activities of Phenolic Extracts of Honey Samples From Genç Township ofBingöl Province

Abstract

The content and quality of honey change according to flora in which bees live and types and amounts of nectar which bees collect, region's geographical location, altitude, temperature change and the purity of the bee supply. Total phenol content by Folin-Ciocalteu method was determined as 52.60554 ± 0.0458 mg (mg GAE / g per extract), the total flavonoid by aluminum chloride method as 60.8080 ± 0.0555 mg (mg QA / g per extract), total phenolic acid content (TPA) 73.10769 ±0.0309 mg (mg SA / g per extract), the total β-carotene 3.64699 ± 0.0636 mg (mg / g per extract) and 0.0354 ± 5.87298 mg total lycopene content (mg / g extract alone) and total antioxidant activity were determined by the method of the phosphomolybdic. Antioxidant effects of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) The IC50 value for free radical was 174.37 ± 1.414 mg (mg / g per extract) with hydrogen peroxide removal activity was found 71.8405%. Reactive oxygen species having hydroxyl (• OH) radical scavenging effect of what is viewed when 200 mg / ml at a concentration of 28.245% was found. Butylatedhydroxytoluene (BHT), butylatedhydroxy anisole (BHA), α-tocopherol a trolox analogue soluble in water were used as assay standard. The phenolic compounds in honey determined by HPLC analysis were identified as; chrysin, chlorogenic acid, caffeic acid, sinapic acid, syringic acid, gallic acid, catechin and ferrulic acid. Microorganisms were composed of gram (+), gram (-) bacteria and yeast. Bacterial species were

(*Bacillus subtilis* IM622 *Staphylococcus aureus* 6538P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* NRRLE4413, *Klebsiellapneumoniae* EMCS, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*). As a result, honey extract was found to be having antibacterial activity against gram negative (-) and gram positive (+) bacteria.

Key words:Anticancer, antimicrobial, antioxidant, honey, phenolic compounds

Giriş

Bal, asırlar boyunca insanoğlu için önemli bir besin kaynağı olmuştur. Bal birçok bitkiden nektar toplayan farklı cins arıların oluşturduğu bir üründür. Bal arıları tarafından bitkilerin çiçeklerinden salgıladıkları nektarlardan veya bitkiler üzerinde yaşayan bazı canlıların salgılarını topladıktan sonra, vücutlarında kendine özgü maddeler ile karıştırılarak değişikliğe uğrattılıp, bal peteklerine depolanmaları ve bunun neticesinde olgunlaşmasını sağladıkları tatlı maddedir (Martin, 1979; Ötleş, 1995).

Balın içeriği ve kalitesi arıların çevresinde bulunan bitki örtüsüne bu bitki örtüsünden aldıkları nektar tipine ve miktarına, bölgenin coğrafik konumuna, yükseltisine, ısı değişimlerine, arı kaynaklarının saflığı gibi birçok özelliğe bağlıdır. Ancak yapılan araştırmalar göstermiştir ki insan sağlığı açısından fonksiyonel özelliklere sahip olan balın kaynağı büyük ölçüde çiçeğe bağlıdır (Efem,1988).

Balın en önemli anti bakteriyel özelliği içerdiği hidrojen peroksit düzeyi ile ilgilidir. Bu düzey glukozoksidad ve katalaz düzeylerinin ölçülmesiyle belirlenir (Weston, 2000). Bal farklılıklarındaki antimikrobiyal aktivitenin farklılığı kısmen de olsa bu seviyelerin bir yansıması olabilir.

Balın antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesine peroksit olmayan faktörlerde katkıda bulunur. Bunlar lizozim, fenolik asit ve flavonoidlerdir. Bir bütün olarak ele alındığında bu faktörler bala yaraların pansumanında benzersiz bir özellik verir. Enfeksiyonun hızlı bir şekilde temizlenmesine, yaranın hızlı debridmanına (yara kenarında canlılığını kaybetmiş ölü dokunun alınması), yara izinin en aza indirilmesinde, angiogenesisin yanı sıra doku granülasyonu ve epitel büyümenin uyarılmasına yol açar. Bununla birlikte balın terapötik etkiside araştırmacılar tarafından dikkate alınmasına rağmen çalışmalar ham balın antimikrobiyal aktivitesi üzerine yoğunlaşmıştır (Taormina ve ark., 2001; Basualdo ve ark., 2007). Akabinde daha çok balın fenolik içeriği ve ham halinde antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ile ilgili olmuştur (Rauha ve ark., 2000; Frankel ve ark., 2000).

Yapılan diğer çalışmalarda bireysel fenolik bileşikler gram negatif ve gram pozitif bakterilerde geniş bir yelpazede büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir (Davidson ve ark., 2005; Bravo ve ark., 1998). Bu bileşiklerin antikanserojenik,

antienflamatuar, antiaterojenik, antitrombotik, immun sistem ve analjezik faaliyetleri gösterilmiştir. Bunlar arasında antioksidan fonksiyonları da rapor edilmiştir (Vinson ve ark.,1998).

Son yıllarda bitkilerin antioksidan etkileri gıda sanayi ve kişisel diyetlerde kullanımları ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bunun sebebi ise bitkilerin birer antioksidan olan karotenoid, flavonoid ve fenolik bileşik içeriği bakımından zengin olmaları ve herhangi bir yan etkiye sahip olmamalarıdır (Kulkarni ve ark., 2006). Sıklıkla kullanılan bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) gibi sentetik antioksidanlarının son yıllarda kanser başta olmak üzere dejeneratif hastalıkların oluşmasında etkin olduğu ile ilgili iddia ve çalışmaların olması üzerine araştırmalar tamamen bitkisel orijinli antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Gülçin ve ark., 2006). Bitkisel orijinli antioksidan maddelerin ve bileşiklerin günlük diyetle direk bitkisel beslenme ve bitkilerden kökenlenen bal gibi bileşiklerden sağlanması ile ilgili eğilim gün geçtikçe artmakta ve zamanla fonksiyonel gıda terimi önem kazanmaktadır.

Flavonoidler antioksidan özelliğe sahip olduklarından dolayı dejeneratif etkilerin oluşturduğu koroner kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın önlenmesinde etkin olduğu düşünülen doğal bileşik gurubudur. Bitkilerden elde edilen flavonoidler UV ışınlarını absorbe ettikleri ve antioksidan aktivite göstermelerinden dolayı kanser tedavisinde kemoprotektif etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Hertog ve ark., 1995). Ayrıca flavonoidlerin lösemi ve yumurtalık kanseri (Larocca ve ark., 1990;Hirano ve ark., 1994) gibi kanserli hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir.

Tüm ballar yapılarından dolayı (antioksidan ve antibakteriyel vb.) insan vücudu üzerinde pozitif etkiye sahiptirler. Bu çalışmada Bingöl ili Genç bölgesinden elde edilen balların genel fenolik bileşik içeriğinin belirlenmesi ve elde edilen bal ekstraktlarının antikanser, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin araştırılması ile biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ve balın fonksiyonel gıdalarda yapay antioksidan ve antimikrobiyal maddeler yerine kullanılabilir olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem**Materyal****Bal örneklerinin toplanması ve saklanması**

Örnekleme işlemi Bingöl ili Genç ilçesi merkez bölgesinden yapılmıştır. Örneklenen ballar steril cam kavanozlar içerisinde çalışma başlayıncaya kadar oda sıcaklığında direk güneş ışığı almayan karanlık ortamda depolanmışlardır.

Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan tüm kimyasallar ve reaktifler analitik yada HPLC sınıfı saflıkta tedarik edilmiştir. Araştırmada polimerik adsorban olarak Amberlite® XAD®-2 ticari markalı ürün kullanılmıştır. Balın içindeki fenolik bileşiklerde bulunan fenolik asit ve flavonoidlerin miktarının belirlenmesi ve saptanması için benzoik asit, kafeik asit, sinnamik asit, p-kumarik asit, gallik asit, sinapik asit, askorbik asit p-hidrosibenzoik asit, syringic asit, hidroklorik asit, sülfürik asit, galangin, kaempferol, quercetin, myrcetin, apigenin, luteolin, chrysin, hesperetin, naringenin, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH-) radikali, ferrozin, linoleik asit, α-tokoferol, trolox, polioksietilen sorbitan monolaurat (Tween-20), trikloroasetik asit (TCA),folin-ciocalteu reaktifi, sodyum karbonat, sodyum fosfat, aliminyum klorür, sodyum hidroksit, sodyum nitrit, sodyum molibdat, amonyum molibdat, metanol, etanol, butillendirilmişhidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), demir klorür, demir ferrosiyanat, hidrojen peroksit, aseton, hekzan ve fenontrolin Sigma-Aldrich®(Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre kültürleri deneyi için fetal bovin serum ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 besi yeri BiologicalIndustries (İsrail)'den temin edilmiştir.

Test mikroorganizmalarının seçimi

Kullanılan mikroorganizmalar Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'ndan temin edilmiştir (Çizelge 1).

Çizelge1. Kullanılan mikroorganizmalar ve Uluslararası Kodları

Mikroorganizma	Mikroorganizma Kodu
<i>B. subtilis</i>	IM622
<i>E. coli</i>	ATCC25922
<i>K. pneumoniae</i>	EMCS
<i>S. aureus</i>	6538P
<i>C. albicans</i>	
<i>P. aeruginosa</i>	DSM50071
<i>S. typhimurium</i>	NRRLE4413
<i>S. cerevisiae</i>	

Metod**Bal ekstraktlarının hazırlanması**

100 gr süzme bal 1 lt'lik beherler içerisinde 1×10^{-2} mol/dm³ konsantrasyona sahip HCl (500ml) ile karıştırılmıştır. Bal iyice çözüldükten sonra adi süzgeç kağıdı kullanılması vasıtasıyla süzülerek katı partiküllerinden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra süzüntü karışımına (pH 2 distile su (HCl ile pH'sı düşürülen 18.3 mΩ distile su ile bal) 100 gr Amberlite® XAD®-2 eklenmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık bir saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karışım cam kolona yüklenerek 1×10^{-2} mol/dm³ HCl (300 ml) ile ve takiben deiyonize su (300 ml) ile birlikte şeker ve diğer bal bileşenleri uzaklaştırılması için yıkanmıştır. Kolonda adsorbe edilmiş olan fenolik bileşenler 1000 ml metanol (pH:7) ile yıkanarak alınıp, 40°C'de rotary evaporatörde azaltılmış basınç altında metanolün uçurulması sağlanarak fenolik ekstre elde edilmiştir (Estevinho ve ark., 2008).

Fenolik bileşiklerden çıkarılan kalıntılar bir miktar su ve dietil eter ile üç kez çözülmüştür. Kombine ekstreler buharlaşmaya maruz kaldıktan sonra ağırlıkları ölçülmüş, kalıntı parçası ve antioksidan test için metanol ile antikanser ve antimikrobiyal aktivite deneyleri için DMSO ile yeniden çözülmüştür. Bir miktar su içinde çözülmüş kalıntıdan fenolik bileşiklerin çıkarılması için 30 ml dimetil eter ile üç kez muamele edilmiştir (Estevinho ve ark., 2008).

Ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi**1. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi**

Ekstreler içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine (Gamez-Meza ve ark., 1999) göre yapılmıştır. 150 µl örnek, 150 µl Folin Ciocalteu reaktifi (%50'lik, h/h, suda) ve 3 ml sodyum karbonat çözeltisi (%2'lik, a/h, suda) deney tüpüne karıştırılarak 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltilerin absorpsanları UV Spektrofotometresi'nde 760 nm'de okunarak toplam fenol miktarları; gallik asitle çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

2. Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

Bal ekstresinden 150 µl alınarak 600 µl distile suyun içerisine aktarılarak bu karışımın üzerine 90 µl %15'lik NaNO₂ solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. 6 dakika sonra %10'luk AlCl₃.H₂O solüsyonu bu çözeltiliye eklenerek karıştırılmıştır. Bunu takip eden yedinci dakikada, 1 M NaOH'dan 600 µl eklenmiş, üzerine 1500 µl distile su eklenerek tüm karışım çok iyi ve nazikçe karıştırılmıştır. Ortaya çıkan pembe renk 510 ile 415 nm'de okunmuştur. Quercetin eşleneği olarak toplam flavonoid içeriği balın kilogramında

miligram cinsinden hesaplanmıştır (Barros ve ark., 2007).

3. Toplam fenolik asit içeriği (TPA) belirlenmesi

Bal ekstresinden (1.0 ml) 0.5 M hidroklorik asit (2.0 ml) ve 10 g sodyum nitrit, 10 g sodyum molibdatın 100 ml suda çözülmesiyle hazırlanan çözücü (2.0 ml) eklenmiştir. Bunu takiben % 8.5 (w/w) sodyum hidroksitten (2.0 ml) eklenmiş, daha sonra son hacim 10 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Absorbans 505 nm’de okunmuş olup, kör olarak her bir ekstre için 10 ml su kullanılmıştır. Sinapik asit kalibrasyon eğrisinden sinapik asit eş değeri (mg/g) olarak toplam fenolik asit içeriği hesaplanmıştır (European Pharmacopoeia, 2004).

4. Toplam β -karoten ve likopen içeriğinin belirlenmesi

Karotenoidlerin içeriği Barros ve ark. (2007) metodu kullanılarak yapılmıştır. Karoten ve likopen’in belirlenmesi için bal fenolik ekstresinden 100 mg alınarak 10 ml aseton-hekzan (4:6) karışımı içerisine konularak 1 dakika süresince iyi bir şekilde karıştırılarak Whatman No. 4 filtre kağıdıyla süzülmüş, süzütünün absorbans değerleri 453, 505 ve 663 nm, dalga boylarında ölçümleri yapılmıştır. β -karoten ve likopen içerikleri standart grafiklerle değerlendirilerek kilogram baldaki karotenoid miktarı miligram cinsinden hesaplanmıştır.

5. DPPH radikalinin etkisinin giderilmesi

Bal fenolik ekstresinin (0.3 ml) içerisine litrede 6×10^{-5} mol olacak şekilde hazırlanan DPPH radikalini içeren 2.7 ml metanolik karışım karıştırılmıştır. Bu karışım güçlü bir şekilde çalkalanarak 60 dakika karanlık bölgede bekletilmiştir. DPPH radikalinin azalması 517 nm’de absorpsiyonun ölçülmesi ile aktivite belirlenmiştir (Pokorny ve ark., 2001; Hatano ve ark., 1988).

6. İndirgeyici güç özelliğinin ölçülmesi

Değişik konsantrasyonlar’da bal ekstrelerinden 2.5 ml alınarak, 2.5 ml (pH 6.6) litresinde 200 mmol bulunacak şekilde hazırlanan sodyum fosfat tamponu ile %1’lik 2.5 ml potasyum ferrik siyanit ile karıştırılarak ve 50°C’de 20 dakika inkübe edildikten sonra üzerine hazırlanan %10’luk tri kloroasetik asitten 2.5 ml katılmış ve bu karışım 1000 rpm’de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında üst faz alınarak yaklaşık 5 ml’ine 5 ml deiyonize su ve 1 ml % 0.1’lik demir klorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) konularak spektrofotometrik olarak 700 nm’de okuması gerçekleştirilmiştir (Oyaizu, 1986).

7. Hidrojen peroksit giderme aktivitesinin belirlenmesi

Bal örneklerinin metanol ile hazırlanan ekstrelerinin hidrojen peroksit giderme aktivitesi Ruch ve ark. (1989) belirledikleri metoda göre yapılmıştır. Bu yöntem, antioksidanların H_2O_2 ’e elektron vererek, onu suya indirgemelerine dayanmaktadır. Bunun için pH’sı 7.4 olan fosfat tamponunda 43 mM’lik hidrojen peroksit çözeltisi hazırlanmıştır. H_2O_2 konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, H_2O_2 ’in 230 nm’de absorbans göstermesiyle belirlenmiştir. 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonunda alınan bal ekstrelerinin hacmi 4 ml’ye kadar tampon çözelti ile tamamlanmıştır. Daha sonra 0.6 ml hidrojen peroksit (43 mM) çözeltisi ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hidrojen peroksitin azalan miktarı 230 nm’de azalan absorbans olarak kaydedilmiştir. Kontrol hidrojen peroksit içeren tampon çözelti kullanılmıştır.

$$A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}$$

$$\% \text{inhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

$$A_{\text{kontrol}}$$

8. Hidroksil radikalini giderme özelliğinin belirlenmesi

Yu ve ark., (2004) metodu ile analiz edilmiştir. Metoda göre reaksiyon karışımı 1 mM FeCl_2 ’den 60 μl , 1 mM 1,10-phenanthroline’den 90 μl , 0.2 M fosfat tamponundan (pH 7.8) 2.4 ml, 0.17 M H_2O_2 ’den 150 μl ve 1.5 ml değişik konsantrasyonlarda ekstre eklenecek şekilde hazırlanmış olup bu karışıma H_2O_2 ’nin eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Oda sıcaklığında yapılan 5 dakikalık inkübasyon sonrasında spektrofotometre kullanılarak 560 nm’de yapılan ölçüm sonrasında hidroksil radikalini uzaklaştırma aktivitesi aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Uzaklaştırma oranı} = \frac{1 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times \%100,$$

Burada A_0 , kontrolün (ekstre olmaksızın) absorbansı, A_1 , ekstre varlığında alınan absorbans değeri, A_2 ise 1,10-phenanthroline olmaksızın alınan absorbans değeridir.

9. Toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Prieto ve ark., (1999) çalışmalarına göre değerlendirilmiş ve α -tokoferol eşdeğeri olarak ifade edilmiş, kısaca, 0.4 ml metanolde çözülürmüş ekstre ile 4 ml reaktif çözeltisi (0.6 M sülfirik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) karıştırılmıştır. Kör olarak bal ekstresi yerine metanol kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı vorteks ile karıştırıldı ve su banyosunda 90 dakika süreyle 95°C’de bekletilmiştir. Absorbans 695 nm dalga boyunda ölçülerek, antioksidan aktivitesi α -tokoferol eşdeğeri (α -TE mg/g ekstre) olarak hesaplanmıştır.

HPLC analiz

Flavonoid bileşiklerin ve fenolik asitlerin tanımlanmasında HPLC' de ters faz C 18 kolonuna, gradient elüsyonla ve 35.2°C'de akış hızı 0.5 ml/dak olacak şekilde çalışılmıştır (Yao ve ark., 2003). Mobil faz pH 2.5 olan fosforik asit (%5) içeren 18.3 mΩ dH₂O (çözücü A) ve metanol (çözücü B). Tüm bal ekstre örneklerinin yükleme hacimleri 10 µl'dir. olarak bir gradient programı ile aşağıdaki gibi uygulanmıştır: 95–83% A (10 dakika), 83–74% A (10 dakika), 74–42% A (20 dakika), 42–5% A (10 dakika) ve 5–95% A (10 dakika). Fenolik asit ve flavonoidlerin analizleri 290 nm yapılarak ve tanımlama piklerin alıkonma zamanlarının ve spektrumlarının ticari standartlar ile karşılaştırılması ile belirlenmiştir.

Ekstrelerin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi**Agar disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal etkinin belirlenmesi**

Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivite testleri Berghe ve ark. (1991) tarafından kullanılan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Çözücüleri uçurulmuş kuru bal ekstraları, 25 mg/ml olacak şekilde dimetilsulfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüş, HPLC saflıkta filtrasyon yapan 0.22 µm'lik naylon membran filtreler kullanılarak süzülen ekstralar kullanılmıştır. Daha sonra 17 g Mueller Hinton Agar 500 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanan besiyeri petri kaplarına aktarılmış, katılaştıran besiyerlerini içeren petri kapları, kullanılabildiği kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır. Testte kullanılan mikroorganizmaların kültür süspansiyonundan 200'er µl (yaklaşık olarak Mc Farland 0.5 eşitliğine göre 10⁶ koloni içerir), Mueller Hinton Agar içeren petri kaplarına aktararak eküvyon çubuğu ile yüzeye yayılmış, daha sonra 6 mm çapa sahip 40'ar µl (20 µl +20 µl) ekstre emdirilen diskler, steril bir pens yardımıyla üzerine bakteri ekilen petri kapları içerisindeki besiyerine yerleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak 40 µl DMSO emdirilen diskler kullanılmıştır. Streptomisin, referans antimikrobiyal olarak kullanılarak, petri kapları 1 saat 4°C'de daha sonra 24 saat 37°C'de inkübe edilmiş, antimikrobiyal aktivite, ekstre emdirilen disklerin etrafındaki zonların çapının ölçülmesi ile belirlenmiştir (Berghe ve ark., 1991; Eloff, 1998).

Antikanser Özelliğinin Belirlenmesi**1. Hücre kültürü**

İnsan prostat kanser hücreleri (PC-3) (ATCC), %10 oranında fetal bovin serum (Biological Industries) ve % 1 oranında penisilin-streptomisin (Biological Industries) içeren RPMI 1640 (Biological Industries) hücre büyüme besiyerinde 37°C'de %5

CO₂'li inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücreler her gün kontrol edilerek iki ya da üç günde bir pasajlanmıştır. Pasaj aralığı 5-10 arası tutulmuştur.

2. Hücre canlılık analizi

Hücre canlılık analizi WST-1 hücre çoğalması kiti (ClontechLaboratories) kullanılarak yapılmıştır. PC-3 hücreleri çoğaltıldıktan sonra her bir kuyucukta 5x10³ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. 24 saat sonra genç balın ektresi 1000, 500, 250, 125, 60, 30, 15 ve 7 µg/ml dozlarında kuyucuklardaki hücrelere eklenerek 24 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Kontrol kuyucuklarına sadece büyüme besi yeri eklenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 5 µl WST-1 eklenmiştir ve 4 saat boyunca hücreler inkübe edilmiştir. Her kuyucuğun 450 nm'de absorbansı mikro plaka okuyucu (Molecular Devices) ile ölçülmüştür (Referans dalga boyu 630 nm alınmıştır).

İstatistiksel analizler

Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanmış veyapılan analizler student's t-test programı kullanılarak p<0,05 güven aralığında hesaplanmıştır.

Bulgular ve Tartışma**Ekstraksiyon Verimi ile İlgili Bulgular**

Ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen ekstre miktarları Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Bal örneklerinden elde edilen ekstre miktarları

Örnek	Bal (g)	Ekstre miktarı (mg)
Genç balı	100	58

Antioksidan Araştırma Bulguları**Toplam fenolik madde miktarı ile ilgili bulgular**

Standart grafikten elde edilen formülden de bal ekstralarında bulunan toplam fenolik bileşik miktarları galik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplanmıştır ($r^2: 0.999$).

Bal örneklerinden elde edilen metanol ekstralarının 1 g'da bulunan toplam fenolik bileşik miktarı Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. Metanolekstrelerinin 1 g'ında bulunan toplam fenolik bileşiklerin Gallik Asit eşdeğeri olarak

Ekstre	Toplam fenolik bileşik (mg GAE/g)
Genç	52.60554 ± 0.17012

Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi ile ilgili bulgular

Bal ekstralarında toplam flavonoid miktarı standart grafikten elde edilen formül yardımıyla

quercetin ekivalent (QE) olarak hesaplanmıştır ($r^2: 0.9705$). Toplam flavonoid madde miktarı mg olarak Çizelge 4’de verilmiştir.

Çizelge 4. Metanolekstrelerinin 1 g’ında bulunan toplam flavonoid miktarı

Ekstre	Toplam flavonoid miktarı(mg)
Genç	60.8080±0.0009

Toplam fenolik asit içeriği (TPA) belirlenmesi ile ilgili bulgular

Standart grafikten elde edilen formül yardımıyla ekstrelerde bulunan fenolik asit miktarı sinapik asit ekivalent olarak hesaplanmıştır ($r^2: 0.9621$).

Toplam fenolik asit miktarı sinapik asit eşleniği olarak Çizelge 5’de verilmiştir.

Çizelge 5. Metanolekstrelerinin 1 g’ında bulunan fenolik asit miktarı

Ekstre	Toplam flavonoid miktarı (mg sinapik asit/g ekstre)
Genç Balı	73.10769 ±0.0309

Toplam β -karoten ve likopen içeriğinin belirlenmesi ile ilgili bulgular

Ekstrelerin absorbans değerleri 453, 505 ve 663 nm, dalga boylarında ölçümler yapılarak β -karoten ve likopen içerikleri aşağıdaki hesaplama formülleri kullanılarak belirlenmiştir. Karoten miktarı Çizelge 6’da, likopen miktarında Çizelge 7’de gösterilmiştir.

$$\beta\text{-karoten (mg/100 ml)} = 0.216A_{663} - 0.304A_{505} + 0.452A_{453}$$

$$\text{Likopen (mg/100 ml)} = -0.0458A_{663} + 0.372A_{505} - 0.0806A_{453}$$

Çizelge 6. Bal ekstrelerinde bulunan β -karoten miktarı (mg/g ekstre)

Ekstre	mg/g ekstre
Genç Balı	3.64699±0.0636

Çizelge 7. Bal ekstrelerinde bulunan likopen miktarı (mg/g ekstre)

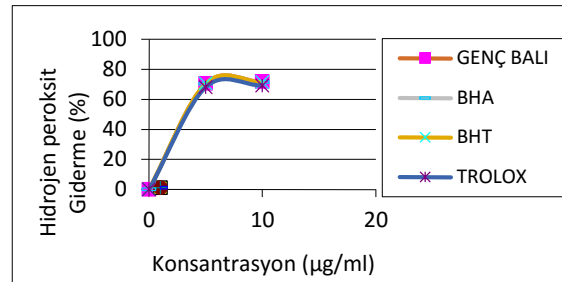
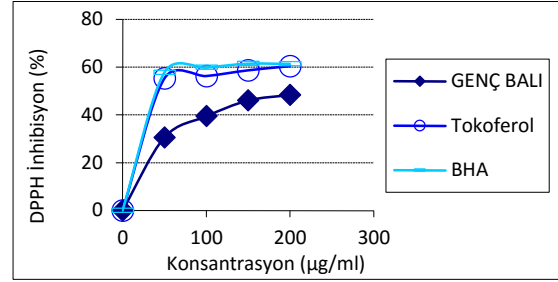
Ekstre	mg/g ekstre
Genç Balı	5.87298±0.0354

DPPH radikalinin etkisinin giderilmesi ile ilgili bulgular

Bal örneklerinin antioksidan aktivitesine bağlı gerçek absorbans değerleri aşağıdaki eşitlikten % DPPH inhibisyonu hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Inhibisyon} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{numune}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Bal ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi Şekil 1’de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmıştır.



Şekil 1. Bal ekstrelerinin DPPH radikali giderme aktivitesi (% inhibisyon)

DPPH’ konsantrasyonunun yarıya indiği durumdaki antioksidan konsantrasyonu EC_{50} olarak verilir. Başlangıç DPPH konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gereken örnek konsantrasyonu (EC_{50}), antioksidan aktiviteyi hesaplamakta sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Düşük EC_{50} değeri yüksek antioksidan kapasiteyi gösterir. Ekstrelerin, BHA ve α -tokoferol’ün EC_{50} değerleri Çizelge 8’de verilmiştir.

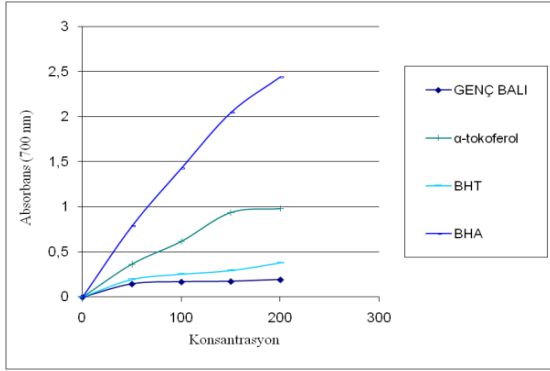
Çizelge 8. Bal örneklerinin ve pozitif kontrollerin, DPPH radikalinin % 50 inhibisyonunu sağlayan derişimleri

Ekstre	EC_{50} (mg/ml)
Genç Balı	174.37 ±1.414
α -Tokoferol	93.50±1.131
BHA	92.40±0.919

İndirgeyici güç özelliğinin ölçülmesi ile ilgili bulgular

Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu metotta örnekteki redüktaınların (antioksidanların) varlığında Fe^{+3} ferrik siyanit kompleksi, Fe^{+2} formuna indirgenir.

Bal örneklerinin indirgeyici güç özellikleri ile ilgili absorbans-konsantrasyon grafiği Şekil 2.’de gösterilmiştir.

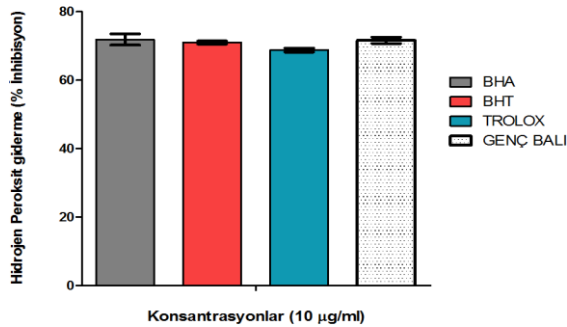


Şekil 2. Bal örneklerinden elde edilen metanol ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarda (50-200 µg/ml) indirgeme kuvvetlerinin standart antioksidan olan α-tokoferol, BHA ve BHT ile karşılaştırılması

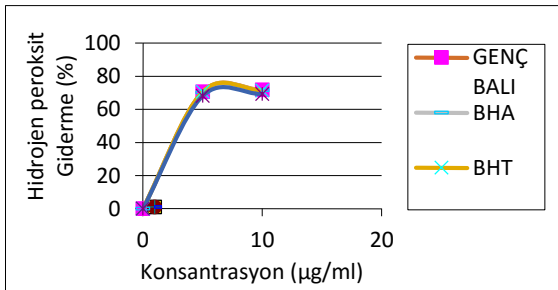
Hidrojen peroksit giderme aktivitesinin belirlenmesi ile ilgili bulgular

Bal ekstraktları 10 µg/ml konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesi birer standart antioksidan olan BHA, BHT ve Troloks ile karşılaştırması Şekil 3’de verilmiştir.

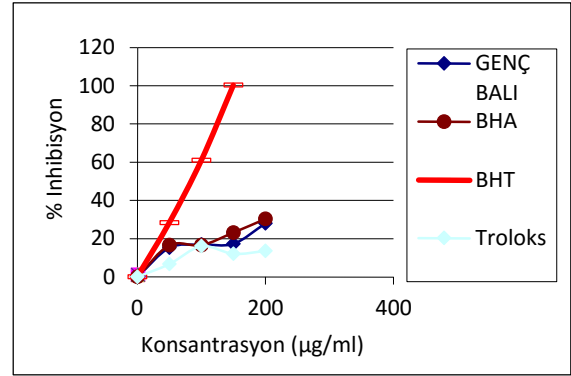
Bal ekstraktlarının H₂O₂ radikali giderme aktivitesi Şekil 4’de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır.



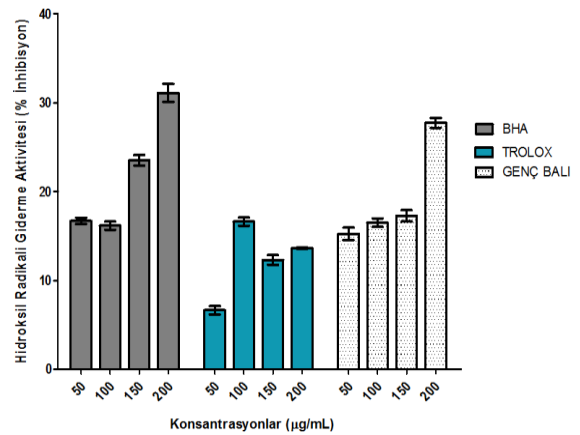
Şekil 3. Bal örneklerinin ve standart antioksidanların 10 µg/ml konsantrasyonunda H₂O₂ giderme aktivitesi



Şekil 4. Bal ekstraktlarından elde edilen ekstraktlarının 5-10 µg/ml konsantrasyonlarında H₂O₂ radikali giderme aktivitesi standart antioksidan olan α-tokoferol, BHA ve troloks ile karşılaştırılması



Şekil 5. Bal ekstraktlarının OH radikalini giderme aktivitesi (% inhibisyon)



Şekil 6. Bal ekstraktlarının BHA ve troloks’ün farklı konsantrasyonlarının % hidroksil radikali giderme aktiviteleri

Hidroksil radikali giderme özelliğinin belirlenmesi ile ilgili Bulgular

Bal ekstraktlarının OH* radikali giderme aktivitesi Şekil 5’de görüldüğü gibi konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Şekil 6’da konsantrasyona bağlı yüzde inhibisyon sütun grafik haline taşınmıştır.

Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi ile ilgili bulgular

Yapılan ölçümler p<0,05 güven aralığında test edilmiştir. Sonuçlar mg α-TE/g ekstre şeklinde α-TE ile hazırlanan standart kalibrasyon grafiğine (r²: 0.999) göre eşlenerek Şekil 7’de verilmiştir.

HPLC Analizi ile İlgili Bulgular

HPLC analizi yapılan balların kromatogramları Şekil 8.’de, bulunan fenolik bileşiklere ait pikler ve isimleri birlikte verilmiştir. Fenolik bileşikler açısından kromatogramda yoğun olarak fenolik asitler bulunmaktadır.

Kromatogramda flavonoid olarak chrysin görülmüştür.

Çizelge 9. Bingöl yöresinden toplanan bal örneklerinin antimikrobiyal etkisi

Mikroorganizma	Genç	Str.	DMSO
<i>S. aureus</i> *	7.0±0.1	25±0.20	R
<i>P. aeruginosa</i> *	7.0±0.11	26±0.20	R
<i>K. pneumoniae</i> *	R	24±0.10	R
<i>S.typhimurium</i> *	R	25±0.15	R
<i>E. coli</i> *	R	26±0.22	R
<i>B. subtilis</i> *	R	25±0.12	R
<i>C.albicans</i> *	R	25±0.11	R
<i>S.cerevisiae</i> *	R	23±0.20	R

Pozitif kontrol olarak Streptomisin (Str) diskleri kullanılmıştır (Bioanalyse). Negatif kontrol olarak DMSO (Merck) kullanılmıştır.

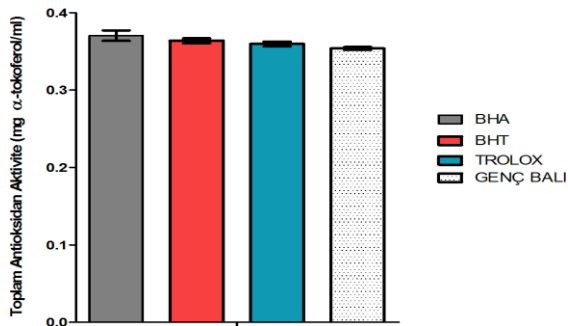
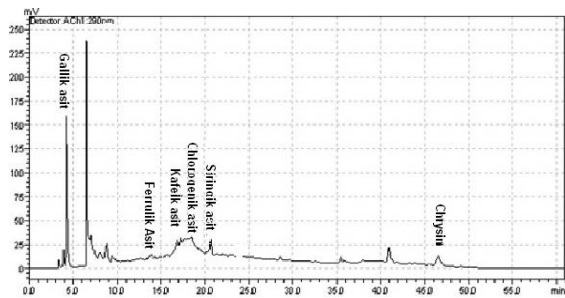
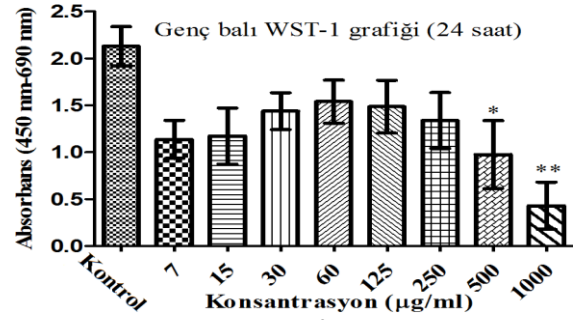
(*): Rakamlar inhibisyonzonlarının çaplarını göstermektedir. Her disk 6 mm çapında olup disklere 40'ar µlekstre emdirilmiştir.

Antimikrobiyal Aktivite Tayini ile İlgili Bulgular

Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan çalışmaların bulguları Çizelge 9'da verilmiştir.

PC-3 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Etkileri

Bal ekstresinin PC-3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi in vitro ortamda WST-1 yöntem ile belirlenmiştir. Bal ekstresinin hücre canlılığını nasıl etkilediği Şekil 9'da gösterilmiştir. Buna göre değişik konsantrasyonlarda 24 saat boyunca PC-3 kanser hücrelerine uygulanan bal ekstresi 500 (p <0.05) ve 1000 (p <0.01) µg/ml konsantrasyonlarda hücre canlılığını kontrol hücrelerine göre önemli ölçüde düşürmüştür. Şekil 9'da ki sütun grafiğinde gösterilmiştir.

**Şekil 7.** Bal ekstresindeki toplam antioksidan aktivitesi**Şekil 8.** Genç balı ekstresindeki fenolik maddeleri gösterir HPLC kromatogramı**Şekil 9.** Genç balının fenolikekstrisinin PC-3 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi

Sonuç ve Öneriler

Bal ekstresi grafikte belirtilen dozlarda 24 saat boyunca PC-3 hücrelerine uygulanmıştır. Kontrol hücrelerine herhangi bir ajan uygulanmamış olup sadece büyüme besiyeri eklenmiştir (veriler ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir. *p<0.05 vs. kontrol, **p<0.01 vs. kontrol, n=3). Bal ekstralarının kanser hücreleri üzerine sitotoksik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Fenolik maddelerin molekül yapısı, oksidasyonun olduğu ortamdaki çözünürlükleri ve sinerjetik-antagonistik etkileri gibi faktörlerin antioksidan özelliğini etkileyebilmektedir (Heim ve ark., 2002).

Toplam antioksidan aktiviteye baktığımızda genç balı ekstralarında fenolik madde miktarı ile toplam antioksidan aktivite arasında pozitif bir korelasyon vardır.

Bal ekstralarının likopen içeriğine bakıldığında genç balı (5.049392 mg/g ekstre) ile yüksek bir değer olarak bulunmuştur (Cadenas, 1989).

Estevinho ve ark., (2008) balların fenolik ekstralarından elde ettikleri ekstraların DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi ile ilgili olarak konsantrasyonun artmasıyla birlikte (12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml) DPPH serbest radikalini temizleme aktivitesinde (% 36.3,% 49.4,% 69.2) artış olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada bal örneklerinden elde edilen fenolik ekstralarının, DPPH, OH-ve H₂O₂ radikallerinin giderilmesinin konsantrasyona bağlı olarak artışı gözlemlenmiştir.

Bal ekstralarının H₂O₂ radikalini giderme etkisi Trolox, BHA ve BHT'den daha yüksek olduğu görülmüştür.

Bununla birlikte bu çalışmada bal örneklerinden elde edilen fenolikekstraların ferik iyonlarını (Fe⁺³) ferröz iyonlarına (Fe⁺²) indirgeme kuvveti konsantrasyona bağlı olarak artmış olup Estevinho ve ark. (2008) yaptığı çalışmalara benzer özellikler göstermiştir.

Mundo ve ark. (2004), bal üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda balın hastalık ve enfeksiyonlara neden olan birçok mikroorganizmanın gelişimini inhibe ettiklerini tespit etmişlerdir. Yapılan laboratuvar araştırmaları balın *E. coli*, *S. aureus* ve *S. enterica* Ser. *Typhimurium* gibi yaralarda bulunan bakterilere karşı etkili olduğunu göstermiştir.

Aksoy ve ark. (2006), Bingöl yöresinde toplanan bal örneklerinin antimikrobiyal etkisi ile ilgili yapmış oldukları çalışmada bal örneklerinin test mikroorganizmalarının gelişmelerini farklı oranlarda engellediğini Karlıova, Genç, Solhan, Kığı ve Bingöl Merkezden alınan bal örneklerinin oldukça güçlü antimikrobiyal etkilerinin olduğunu özellikle Karlıova'dan alınan örneklerin test mikroorganizmalarının genel olarak etkili bir şekilde gelişmelerini engellediklerini tespit etmişlerdir.

Bal ekstralarının çalışmada kullandığımız test mikroorganizmalarının gelişmelerini farklı oranlarda engellediği görülmüştür.

Genel olarak baldaki fenolik bileşiklere en duyarlı mikroorganizmaların *S. aureus* ve *P. Aeruginosa* olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, Estevinho ve ark. (2008), Mundo ve ark. (2004), Cooper ve ark. (1999), Agbaje ve ark. (2006) bal ile ilgili yaptıkları çalışmalara benzer özellikler göstermektedir. Yapılan bu çalışmada aynı sonuca ulaşılmıştır.

Sonuç olarak, çalışmadaki bal fenolik ekstralarının antikanser, antioksidan ve kısmen antibakteriyel özelliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Son yıllarda modern ve hızlı yaşam ile artan nüfus insanların beslenme şeklindeki değişiklikleri ortaya çıkartmıştır. Bu değişimler sonucunda yapay besinler, fabrikasyon ve paketlenmiş ticari ürünlerin tüketim payları daha da çok artmıştır. Bu besinlerin ticari olması ve dolayısıyla ürünlerin raf ömürlerinin uzatılması için antimikrobiyal ve antioksidan etkiye sahip sentetik antioksidan ve antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu eklentilerin varlığı rahatsızlıklara yol açmaktadır. Aynı zamanda raf ömrünü uzatmak için kullanılan ticari kimyevi antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde de artış olmuştur. Bu nedenden dolayı ülkemizde ve tüm dünyada doğal ve gerçek ekolojik ürünlere ve bu ürünlerden elde edilecek olan antioksidan ve antimikrobiyal ürünlere talep artmıştır. Bu çalışma içerisinde bahsedilen iki özelliği dolayısıyla bal ve baldan elde edilen türevlerine karşı ilgi ise gün geçtikçe artmaktadır.

Teşekkür

Bu çalışma Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BÜBAP) tarafından

desteklenmiştir. BÜBAP 2010-16 nolu projenin bir kısmını içermektedir.

Kaynaklar

- Agbaje, E.O., Ogunsanya, T., Aiwerioba, O.I.R. 2006. Conventional use of honey as antibacterial agent. *Annals of African Medicine*, 5(2): 79–81.
- Aksoy, Z., Dığrak, M. 2006. Bingöl Yöresinde Toplanan Bal ve Propolisin Antimikrobiyal Etkisi Üzerinde in vitro Araştırmalar. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, 18(4): 471–478.
- Barros, L., Calhelha, R. C., Vaz, J. A., Ferreira, I. C. F. R., Baptista, P., Estevinho, L. M., 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms. *European Food Research and Technology*, 225, 151–156.
- Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, M.S., Marioli, J.M. 2007. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, 124(3–4): 375–381.
- Berghe, V.A., Vlietinck, A.J. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Method in Plant Biochemistry*, 6: 47–68.
- Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56(11): 317–333.
- Cadenas, E. 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58: 79–110.
- Cooper, R.A., Molan, P.C., Harding, K.G. 1999. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92(6): 283–285.
- Davidson, P.M., Sofos, J.N., Brenem, A.L. 2005. *Antimicrobials in Foods*, third ed. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 291–306.
- Efem, S.E.E. 1988. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British Journal of Surgery* 75, 679–681.
- Eloff JN. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica.*, 64(8): 711–713.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L.D., Pereira, E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*. 46(12): 3774–3779.

- European Pharmacopoeia, 2004. Fifth ed. Council of Europe, Strasbourg. pp. 2377–2378.
- Frankel, S., Robinson, G.E., Berenbaum, M.R. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of fourteen unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research*, 37: 27–31.
- Gamez-Meza, N., Noriega-Oriega-Rodriguez, J.A., Medina-Juarez, LA., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., Angulo-Guerrero, O. 1999. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76: 1445.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Boyer, L. 2006. Antioxidant activity of lignans from fringe tree (*Chionanthus virginicus* L.). *European Food Research and Technology*, 223: 759–767.
- Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T. 1988. 2 new flavonoids and other constituents in licorice root - their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmacological Bulletin*, 36(6): 2090–2097.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10): 572-584.
- Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Archives of Internal Medicine*, 155(4): 381-386.
- Hirano, T., Gotoh, M., Oka, K. 1994. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Science*, 55(13): 1061-1069.
- Larocca, L.M., Piantelli, M., Leone, G., Sica, S., Teofili, L., Benedetti-Panici, P. 1990. Type II oestrogen binding sites in acute lymphoid and myeloid leukemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids. *British Journal of Hematology*, 75(4): 489–495.
- Martin, P.G. 1979. *Manuals of Food Quality Control: 3- Commodities*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Mundo, M. M., Padilla-Zakour, O. I., Worobo R. W. 2004. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97(1):1–8.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 103: 413-419.
- Ötleş, S. 1995. *Bal ve Bal Teknolojisi (Kimyası ve Analizleri)*. Alaşehir Meslek Yüksekokulu Yayınları, yayın No: 2.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. 2001. *Antioxidants in food*, CRC Press, USA.
- Prieto, P.M., Pineda, M. Aguilar., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269(2): 337-341.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3–12.
- Ruch R.J., Cheng S.J., Klaunig J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogenesis*, 10(6):1003-1008.
- Taormina, P.J., Niemira, B.A., Beuchat, L.R. 2001. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69(3): 217–225.
- Vinson JA, Hao Y, Su X, Zubik L. 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(9): 3630-4.
- Weston, R.J. 2000. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*, 71: 235–239.
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F.A., Ferreres, F., Martos, I. Singanusong, R., 2003. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand Leptospermum honeys. *Food Chemistry*, 81(2):159–168.
- Yu, W., Zhao, Y., Shu, B. 2004. The radical scavenging activities of radix puerariae isoflavonoids: A chemiluminescence study. *Food Chemistry*, 86: 525–529.