

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**BALDA SPESİFİKASYON VE KRİSTALİZASYONUN (ŞEKERLENME)
BALIN KİMYASAL VE BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNE ETKİSİ**

Proje No: FCD-2013-4089

Çok Disiplinli Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. Duran ÖZKÖK
ERÜ. Safiye Çıkrıkçoğlu Meslek Yüksekokulu

Prof. Dr. Sibel SİLİCİ
ERÜ. Seyrani Ziraat Fakültesi
Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü

Doç. Dr. Mustafa ÇAM
ERÜ. Mühendislik Fakültesi
Gıda Mühendisliği Bölümü

Temmuz, 2010

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	4
ABSTRACT	5
1. GİRİŞ.....	6
1.1. Bal ve balın kompozisyonu	7
1.2. Balın işlenmesi ve depolanması	13
1.3. Kristalizasyon	14
1.4. Balda kristalizasyonu etkileyen faktörler	19
1.5. Balda kristalizasyonu önleme metotları	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
2.1. Araştırmada kullanılan bal örnekleri	25
2.2. Melissopalinojik analizler	25
2.3. Bal örneklerinde şeker analizi	25
2.4. Balda toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	26
2.4. Bal örneklerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi.....	26
2.5. Bal örneklerinin fenolik madde kompozisyonlarının belirlenmesi	26
2.6. Bal örneklerinde antiradikal aktivitenin belirlenmesi (DPPH deneyi).....	27
2.7. Balda antimikrobiyel aktivite	27
2.8. İstatistiksel analiz	27
3. BULGULAR	28
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	38
5. KAYNAKLAR.....	44

ÖZET

Araştırmada kullanılan 8 (kekik, üçgül, narenciye, ayçiçeği, kestane, geven, pamuk ve çam balı) monofloral bal örneği, Türkiye'nin farklı bölgelerinde bu bal tipinin üretildiği yörelere gidilerek doğrudan arıcıdan temin edilmiştir. Bal örneklerinin melissopalinolojik analizleri yapılarak bal örnekleri tiplendirilmiştir. Polen analizleri fizikokimyasal testlerle (renk, nem, HMF, diastaz, prolin, asit, iletkenlik ve şeker) desteklenmiştir. Bal örneklerinin toplam fenolik madde miktarı Folin Ciocalteu metodu ile spektrofotometrik olarak, fenolik madde kompozisyonu HPLC ile, antiradikal aktivite DPPH metodu ile ve antioksidan aktivite fosfomolibden metodu ile belirlenmiştir. Projenin balların kristalize olma özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili kısmında, narenciye ve kestane balları farklı sıcaklık (+4 °C, +25 °C ve 65 °C) ve farklı saklama kapları (şeffaf cam ve şeffaf gıda plastiği) koşullarında tutularak kristalize olma durumları incelenmiş, biyolojik özellikleri analiz edilmiştir.

Bu araştırmada test edilen bal örneklerinde, en düşük nem içeriği geven ve çam ballarında tespit edilirken bunu sırasıyla; üçgül, kekik, pamuk, kestane, ayçiçeği ve narenciye balları takip etmiştir. Ayrıca kekik, üçgül, narenciye, ayçiçek, kestane, geven, pamuk ve çam ballarının F/G değeri sırasıyla; 1.15, 1.20, 1.19, 1.12, 1.23, 1.24, 1.17 ve 1.25 olarak belirlenmiştir. Kristalizasyonu en iyi tahmin eden G+F, F/G ve G/W parametreleri değerlendirildiğinde, üçgül, narenciye ve ayçiçek ballarının hızlı kristalizasyon özelliğine sahip olduğu söylenebilir.

Farklı sıcaklık koşulları (4, 25 ve 65 °C) değerlendirildiğinde ise oda sıcaklığında depolanan (25 °C) bal örneklerinin fenolik madde miktarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Antiradikal aktivite bakımından ise 4 °C ve 65 °C de depolanan örneklerin antiradikal aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Cam ambalajda depolanan bal örneklerinin hem toplam fenolik madde miktarı hem de antiradikal aktivitesi plastik ambalajda depolananlara göre rakamsal olarak yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, bal örneklerinin 18 ay boyunca depolanarak her üç ayda bir biyolojik analizleri yapılmıştır. Yapılan analizlerde toplam fenolik madde, antioksidan aktivite ve antiradikal aktivitenin zamanla düştüğü gözlenmiştir. Ancak bu düşüş, kristalizasyonun etkisinden çok uzun süre depolamanın bal üzerindeki olumsuz etkisine atfedilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bal, kristalizasyon, fenolik madde miktarı, antiradikal aktivite, antioksidan aktivite

ABSTRACT

Eight monofloral honey samples used in the study (thyme, clover, citrus, sunflower, chestnut, astragalus, cotton and pine honey) were obtained directly from beekeepers by going to the region where this type of honey produced in different regions of Turkey. Melissopalynological analyzes of honey samples were performed and honey samples were identified. Pollen analysis were supported by the physicochemical tests (color, moisture, HMF, diastase, proline, acid, electrical conductivity and sugar). The total phenolic of the honey samples were determined by spectrophotometric method with Folin Ciocalteu, phenolic composition by HPLC, antiradical activity by DPPH methods and antioxidant activity by the phosphomolybdc method. In the part of the project that related to the determination of the properties of honey crystallization, citrus and chestnut honey with different temperature (+4 °C, +25 °C and 65 °C) and different containers (colourless glass and transparent food plastic) were stored and analyzed biological properties.

The honey samples tested in this study, the lowest moisture content were detected in astragalus and pine honey and followed by; clover, thyme, cotton, chestnut, sunflower and citrus honey, respectively. In addition, F/G values of thyme, clover, citrus, sunflower, chestnut, astragalus, cotton and pine honey were determined; 1.15, 1.20, 1.19, 1.12, 1.23, 1.24, 1.17 and 1.25, respectively. Considering as the best prediction parameters of crystallization are G+F, F/G and G/W, clover, citrus and sunflower honey is said to have a rapid crystallization properties.

When the different temperature conditions (4, 25 and 65 °C) evaluated, honey samples stored at room temperature (25 °C) the amount of phenolic contents have been found to be higher. In terms of antiradical activity of the samples stored at 4 and 65 °C antiradical activity has been found to be higher. The honey samples were stored in glass packaging the amount of total phenolic and antiradical activity both numerically higher than those stored in the plastic packaging. Also, the honey samples stored for 18 months and the biological analysis made every three months. It was observed that the total phenolic, the antioxidant activity and the antiradical activity fallen in times. However, this decline has been attributed to the influence of the adverse effects on the storage of honey rather than the crystallization for a long time.

Key words: Honey, crystallization, phenolic content, antiradical activity, antioxidant activity

1. GİRİŞ

Bal, günümüzde sadece sofralarımızda yerini alan değerli bir besin maddesi değil aynı zamanda sağlık için tercih edilen tıbbi bir üründür. İnsanlar özellikle çocukların gelişimi, hastaların iyileşmesi ve genel anlamda sağlık koruyucu olarak bal tüketmektedir. Ne yazık ki ülkemizde, yapılan analizlerle uyuşmayan şekilde unifloral ballar etiketlenmekte ve tüketici yanıltılmaktadır. Balın kontrolü ve denetimi orijini meydana getiren parametrelerin belirlenmesini gerektirir. Nitekim sağlıklı kontrol ve denetim, belirlenecek olan parametrelere uygunlukla ölçülebilir ve ancak bu sayede denetimsiz ürünler piyasada yer alamaz, haksız rekabetin önüne geçilmiş olur.

Balda kristalizasyon (şekerlenme), sadece tüketici açısından değil, üretimin ilk aşamasında arıcının, satışa sunma aşamasında aracı firmanın da ekonomik bir sorunudur. Arıcı kristalize olmuş balını defalarca kaynatmakla biyolojik değerini bozarak, firma elinde kalan kristalize balı nasıl değerlendireceğini bilemeyerek, tüketici ise tüketip tüketmemekte kararsız kalarak çaresiz bir durum yaşamaktadırlar. Daha kötüsü kristalize olmuş her bal “sahte” olarak nitelendirilip bal piyasasına olumsuz etki yapmaktadır. Oysa kristalizasyon balda oluşan doğal bir süreçtir. Daha çok balın fruktoz/glikoz, glikoz/su ve glikoz+fruktoz oranlarına yani kısaca balın şeker ve su içeriğine bağlı olan fiziksel bir süreçtir. Bu anlamda proje ülkemizde üretilen unifloral balların kristalize olma özelliklerinin yanı sıra kristalizasyonun değişik aşamalarda balın faydalı biyolojik özellikleri üzerine etkilerini belirleyerek bal üretici ve tüketicilerine bilgi sağlamayı hedeflemiştir. Nitekim analizler neticesinde kristalizasyonun balın biyolojik değerini önemli oranda etkilemediği tespit edilmiştir. Uzun süre depolama sonucunda oluşan toplam fenolik madde, antioksidan ve antiradikal aktivitedeki düşüşler balın uzun süre depolanması neticesinde beklenen değişiklikler olarak yorumlanmıştır. Bununla birlikte balın uygun ambalajlarda (özellikle cam) ve ağzı kapalı bir şekilde muhafazası vurgulanmıştır. Proje kapsamında elde edilen fizikokimyasal ve biyolojik analizler sonucunda elde edilen veriler yöresel ve monofloral balların karakteristik özelliklerini yansıtmıştır.

Bu projede, farklı botanik orijine sahip balların fizikokimyasal yapısı aydınlatılmış, kristalizasyon ve beraberinde farklı sıcaklık ve ambalajlarda depolamanın olası etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin arıcı, bal paketleyici, tüketiciler ile bilim dünyası açısından faydalı olacağı düşünülmektedir. FCD-2013-4089 kodlu bu projenin gerçekleştirilmesi için finansal destek sağlayan ERÜ BAP’a teşekkür ederiz.

1.1. Bal ve balın kompozisyonu

Bal, bitki nektarlarının, bitkilerin canlı kısımları salgılarının veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin salgılarının bal arısı *Apis mellifera* tarafından toplandıktan sonra kendine özgü maddelerle birleştirerek değişikliğe uğrattığı, su içeriğini düşürdüğü ve petekte depolayarak olgunlaştırdığı doğal bir üründür. Melissopalnoloji (balda bulunan polen taneciklerin tanımlanması ve analizi) balın botanik orijini belirlemek için yapılan analizdir. Polenlerin dış yüzey (ekzin strüktürü) özellikleri ile kimyasal kompozisyonları tür düzeyinde değişiklik göstermektedir ve bu durum balın botanik orijinin belirlemede etkili olmaktadır. Balda polen frekansı % >45 olduğunda bal “unifloral” olarak nitelendirilir (Louveaux ve ark., 1978). Ancak bazı durumlarda diğerlerine göre nispeten büyük boyutlu polenler *Citrus* ve bazı Lamiaceae familyasına ait polenlerde olduğu gibi daha az oranda temsil edildiklerinde (under-represented-yetersiz temsil edilen) unifloral özellik gösterebilirler (% 15–20). Bununla birlikte *Eucalyptus*, *Castaneae* ve *Myosotis* gibi bitkilerin polenleri balda çok yüksek oranda temsil edilebilirler (% 70–80, over represented-fazla temsil edilen) (Anklam, 1998; Terrab ve ark., 2003). Coğrafik faktör, depolama ve işleme koşulları ile floral orijin balın kalitesinden sorumlu faktörlerdir. Balın floral orijini; renk, su aktivitesi, şeker içeriği gibi fizikokimyasal özellikler ile toplam fenolik madde ve fenolik madde kompozisyonu, aminoasit ve protein içeriği, uçucu madde kompozisyonu gibi biyokimyasal özellikleri ile antioksidan-antiradikal ve mikrobiyolojik aktivite gibi biyolojik özelliklerinden sorumludur. Bal orijinine göre çiçek ya da salgı balı olarak tiplendirilmektedir. Çiçek balı çiçeklerin nektarından elde edilirken, salgı balı ülkemizde *Pinus brutia* gibi ağaçlar üzerinde yaygın olarak yaşayan *Homophlebus helenicus* isimli koşnillerin hazım atıklarından elde edilmektedir. Botanik orijinine göre balın tadı ve rengi değişebilmektedir. Örneğin yüksek fruktoz içeriğine sahip olan bal (örneğin akasya balı) yüksek glukoz içeriğine sahip olana göre daha tatlıdır (Bogdanov ve ark., 2008).

Balın katı maddesinin % 82-85'i karbonhidratlardan oluşmaktadır. Balda bulunan temel şekerler glukoz ve fruktozdur (Crane,1976). Balda fruktoz ve glukozla ilaveten en az 12 disakkarit bulunmaktadır. Bunlar; sakaroz, maltoz, izomaltoz, nigeroz, turanoz, maltuloz, lökroz, kojibioz, neotrehalaz, gentibioz, laminariboz ve izomaltulozdur (D'Arcy ve ark., 1999). Balda iz miktarda tetra ve pentasakkaritler de izole edilmiştir. Salgı balları çiçek balları ile kıyaslandığında melezitoz ve rafinoz gibi trisakkaritler daha yüksek miktardadır (Bogdanov, 2004).

Balın azot içeriği oldukça düşük olup ortalama % 0.4 tür. Balda bulunan toplam

azotun % 40-65'i doğal proteindir. Azotun geri kalanı sadece iz miktarda bulunan serbest aminoasitlerden türevlenmektedir. Bu serbest amino asitlerden yoğun olarak bulunanlar; prolin, glutamik asit, alanin, fenilalanin, tirozin, lösin ve izolösindir (D'Arcy ve ark., 1999). Balda bulunan nişasta ya da glikojeni daha küçük birimlere parçalayan ve balın kalitesinin ölçümünde kullanılan diastaz (α - ve β - amilaz), sakarozu glukoz ve fruktoza parçalayan invertaz (sukraz, sakkaraz, glukosidaz) ile glukozdan glukonik asit ve hidrojenperoksit üreten glukoz oksidaz enzimleri balın temel enzimleridir. Diastaz enzimi bala ısıl işlem uygulanmasının belirlenmesinde kullanılan bir belirleyicidir. Glukozun glukonolaktona çevrilmesinden sorumlu olan glukoz oksidaz balda bulunan dominant asit olan glukonik asitin oluşumundan sorumludur. Bal arısı tükürüğü, önemli oranda amilaz ve glukoz oksidaz içermektedir (D'Arcy ve ark., 1999).

Balda bulunan asitler, kuru maddenin % 0.5'inden sorumludur ve balın tat karakteristiğine katkıda bulunur. Balda bulunan organik asitlerin, glukonik, formik, asetik, butirik, laktik, okzalik, sitrik, suksinik, tartarik, maleik, malik, piroglutamik, pirüvik, alfa-ketoglutamik, glikolik, alfa ya da beta gliserofosfat ve glukoz 6 fosfat olduğu rapor edilmiştir (Crane, 1976). Balın asitliği mikroorganizmalara karşı stabiliteyi sağlamaktadır. Glukonik asit balda diğer asitlere göre en fazla oranda bulunan asittir ve glukoz üzerine etki eden bir enzim aktivitesiyle üretilmektedir. Glukonik asit dışında balda bulunan diğer asitlerin kaynağı bilinmemekle birlikte nektardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Arcot ve Brand-Miller, 2005).

Bal düşük miktarda vitamin ve mineral içerir. Balda potasyum, sodyum, kalsiyum, magnezyum, demir, bakır, klor, fosfor ve sülfür gibi mineraller tespit edilmiştir. Türkiye'ye özgü Beslenme Rehberi'nde enerji ve besin öğelerini karşılayacak günlük besinlerin yaklaşık miktarları bal için; 1-9 yaş arası 10 g/gün, 10-18 yaş 30 g/gün ve 19-65 yaş arası 20 g/gün olarak bildirilmiştir (Anonim, 2004). Bu rehberde yetişkin insan vücudunun yaklaşık % 6'sının minerallerden oluştuğu bildirilmektedir. Farklı monofloral ballar farklı miktarda mineral içermektedir. Balın içerdiği iz elementlerden besleyicilik açısından özellikle çocukların beslenmesinde (1-15 yaş) krom, manganez ve selenyum önem taşımaktadır. Nitekim 1-9 yaş grubu çocukların 1.2-1.5 mg manganez, 11-15 mcg krom ve 20-30 mcg selenyuma ihtiyaç duyduğu bildirilmektedir (Anonim, 2004). Bal minerallerin dışında 0.3-2.5 mg/kg kolin ve 0.06-5 mg/kg asetilkolin içerir (Heitkamp, 1984). Kolin, kardiyovasküler ve beyin fonksiyonları ile hücrel membran kompozisyonu ve tamiri için gerekliyken asetilkolin nörotransmitter olarak iş görmektedir (Bogdanov, 2004).

Balın nem içeriği % 12-27 arasında değişebilir, ancak genel olarak % 18-20 arasındadır. Balın yüksek ozmotik basınç ve düşük nem içeriğine sahip olması bakteri gelişimini önlemektedir. Balın su aktivitesi 0.5-0.6 arasında olup pek çok bakteri ve küfün yaşayamayacağı seviyededir (Arcot ve Brand-Miller, 2005).

Balın besleyici değeri yanında 100 g bal 1320 kilo joule (kJ) enerji sağlarken 100 g çay şekeri 1600 kJ enerji sağlamaktadır. Çay şekerinin 100 gramında 100 g karbonhidrat bulunurken balda 82.1 g civarındadır (English ve Lewis, 1991).

Balın su içeriği iklimsel koşullar, sezon ve olgunluk derecesi ile ilgili bir parametredir. Balın pH'sı ekstraksiyonu ve depolanmasında büyük önem taşır ve balın tekstürü, stabilitesi ve yarılanma ömrünü önemli oranda etkiler. Şeker içeriği balın olgunlaşmasıyla birlikte botanik orijinine göre değişen bir parametredir. Balın mineral madde içeriği ise balın botanik orijini belirlenmede kullanılan bir değişkendir, özellikle balın floral ya da bal çiği olması ayırımında. Nitekim balçiği ballarının mineral içeriği yüksektir ve çiçek ballarına göre daha az monosakkarit ve daha çok di, tri ve yüksek oligosakkaritler içermektedir. Balın asiditesi özellikle glukonik asit ile fosfor ve klorid gibi inorganik iyonların bulunuşu ile ilgilidir.

Fenoller, oksijenli aromatik bileşikler olup, bir yada daha fazla hidroksil (-OH) grubu taşıyan en az bir aromatik halkaya sahip organik ve kristal yapıdaki maddelerdir. Flavonoidler ve polifenoller gibi çok sayıda polimerin çıkış maddesidir. Flavonoidler, üç karbonlu zincir ile bağlı iki benzen halkasını içeren C6-C3-C6 iskeletinde bileşiklerdir. Flavonoidler bitkileri UV ışınlarına ve mikroorganizmalara karşı korurlar. Güneş ışınlarının etkisiyle bitki yaprak ve dokularında fenolik maddelerin sentezlenmesini sağlayan fotomorfogenez reaksiyonları başlar. İnsanlarda flavonoidler bağışıklık sistemini güçlendirir ve kalp krizi riskini azaltır. Fenolik maddeler bitki türlerini tanımlama ve sınıflandırma amacıyla kemotaksonomik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bitkinin ve ondan türevleşen ürünlerin kompozisyonu ve fenolik madde içeriği hasat sonrası işleme şartları kadar genetik ve çevresel faktörlere de bağlıdır. Fenolik maddelerin antioksidan aktiviteleri serbest radikal koruyucu, hidrojen verici, süperoksit ile hidroksil gibi radikaller için bir substrat olarak iş görmek gibi çok sayıda farklı mekanizmalarla ilişkilidir Bitkilerin fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivitesi arasında direkt ilişki bulunmuştur. Bal çok sayıda fenolik madde içermektedir ve iyi bir antioksidan kaynağıdır ve bu nedenle bitkisel tedavide kullanılabilme potansiyeli kazanmıştır. Balda pinobanksin, pinosembrin, kuersetin, krisin, galangin, luteolin ve kampferol gibi flavonoidler bulunmaktadır. Bunlardan pinosembrin, pinobanksin ve krisinin propolisten kaynaklandığı bildirilmiştir. Bazı araştırmalar balın floral orijini ve flavonoid profili arasında pozitif

korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (Anklam, 1998; Yao ve ark., 2004). Balda bazı bireysel bileşiklerin ya da bileşik grubunun dominant olması balın botanik orijinin belirlenmesinde belirleyicidir. Örneğin flavonon olan hesperitin portakal balı için bir belirteç (markör) olarak kullanılabilir. Aynı şekilde 8-metoksi-kamferol rosemary balında, luteolin lavanta balında ve kuersetin de ayçiçeği balında belirleyici fenolik bileşikler olarak kullanılabilmektedir (Anklam, 1998).

Aroma gıdalarda önemli bir kalite faktörüdür. Balın aroması, nektar kompozisyonu ve floral orijine göre değişen uçucu madde kompozisyonuna bağlıdır. Unifloral orijinli bir bal daha yüksek ticari değere sahiptir bu nedenle unifloral balın tespiti ve sertifikasyonu kalite kontrolünde önemli rol oynamaktadır.

Balın kimyasal kompozisyonu büyük oranda nektarın elde edildiği floral orijine bağlıdır. Hem kalite hem de otentisite açısından bir gıda ürününün pek çok tipik özelliğinden biri aroma profilidir. Çok sayıda uçucu bileşen, orijini belirlemek için kullanılabilen ürünün “parmak izi” tabiriyle aroma profilini çıkarmaktadır. Baldaki uçucu maddelerin analizi botanik orijinin karakterizasyonu için bir araç olarak kullanılabilir. Spesifik bir bal kaynağının temel uçucu bileşikleri, norisoprenoidler, terpenler ve benzen türevleri gibi 3 ana kategoriden oluşmaktadır. Bununla birlikte alifatik bileşikler, hidrokarbonlar ve enzimatik olmayan kahverengileşme reaksiyonundan gelen ürünler de belirlenmiştir. Japonya’da Haze balının (*Rhus succedanea*) aroma bileşiklerini tespit etmek için GC-MS ile kolon ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. Araştırmacılar alkoller, aldehytler, ketonlar, esterler, asitler, hidrokarbonlar, furanoidler ve miselli bileşiklerden oluşan 130 uçucu bileşik tanımlamışlardır (Shimoda ve ark., 1996). Moreira ve ark. (2002) Shimoda ve ark tarafından geliştirilen kolon ekstraksiyon metodunu biraz değiştirerek Brezilya ballarını test ettiler; Cashew (*Anarcadium occidentale*) ve Marmeleiro (Croton species) balları. Bu araştırmacılar Cashew balında hidrokarbonların, Marmeleiro ballarında linalool’lü bileşiklerin dominant olduğunu tespit ettiler.

Cuevas-Glory ve ark. (2007)’nin yaptığı detaylı derlemede kestane balı için; 3-aminoasetofenon, 2-metildihidrofuranon, metilbenzil alkol, asetofenon, 1-feniletanol, 2-aminoasetofenon, ökaliptus balı için; asetoin, aldimetildisülfid, dimetiltrisülfid, portakal balı için, 1-p-menten-9-al, lilak aldehyt, limonen diol, hotrienol, metil antranilat, akasya balı için; aseton, furfural, benzaldehyt gibi bileşiklerin spesifik olduğu ve aromadan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde Bouseta ve Collin (1995) fenoller ve benzen türevlerinin kestane ve ıhlamur balları için karakteristik olduğunu bildirmişlerdir. Aroma profiline dayanan

botanik orijin tespiti bal gibi aromaca zengin bir ürün için gereklidir ve uçucu fraksiyonların ölçümü için teknik geliştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Balda aroma bileşikleri nispeten düşük moleküler ağırlıklı ve farklı fonksiyonlara sahip uçucu bileşiklerin kompleks bir karışımı olarak çok düşük konsantrasyonlarda mevcuttur. Gaz kromatografi-kitle spektrometrisi yüksek separasyon (ayırma) etkinliği ve hassaslığı ile bu bileşikler için kalitatif ve kantitatif veri sağlamaktadır. SPME/GC-MS metodu kullanılarak farklı tiplerde balların bileşenleri olarak önemli sayıda uçucu bileşik tanımlanmıştır. Bu metotla portakal balı için metil antranilat (Soria ve ark., 2003) lilak aldehit (Alissandrakis ve ark., 2003) ve limonen diol (Piasenzotto ve ark., 2003) ve 1-p-menten-al (Alissandrakis ve ark., 2003) karakteristik bileşikler olarak rapor edilmiştir. Ökalyptus balı, nonanol, nonanal ve nonanoik asit (Piasenzotto ve ark., 2003) ve asetoin (Perez ve ark., 2002) ile karakterize edilirken kestanebalı 1-feniletanol ve 2-asetofenon bileşikleri (Guyot ve ark., 1998) ile sınıflandırılmıştır. Sonuç olarak, çok sayıda araştırma ile belirlenmiştir ki, balda bulunan uçucu bileşikler balın botanik orijini ile ilişkilidir ve bunlardan bazıları balın karakteristik belirteçleridir. Bazı spesifik aroma bileşikleri unifloral balların karakterizasyonu için belirteçtirler. Baldaki aroma bileşikleri ekstrak edilmekte ve SPME-MS ile tanımlanmaktadır. Diskriminant analizi ile sınıflandırılan örnekler için referans örnekler seçilmektedir ve her bir bal için belirlenen bileşikler hesaplamak için de multiple regresyon analizi kullanılmaktadır. SPME-GC/MS metodu kullanılarak balı ökalyptus yada portakala balı olarak sınıflamak mümkün olmaktadır. Nitekim bu metot geleneksel metotların karmaşıklığı olmaksızın hassas ve yüksek verimi (recovery) olan bir metottur. GC-MS kullanılarak unifloral balların karakteristik aroma profillerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar henüz yenidir (Bouseta ve ark., 1992) ve son yıllarda yoğunluk kazanmıştır. Tananaki ve ark. (2007) Yunan ve Türk çam ballarının karakteristik uçucu bileşiklerini tespit etmişler ve 3-karen bileşiğinin Türk çam balları için belirleyici olduğunu bildirmişlerdir. Odeh ve ark., (2007) Palestinian kekik balları için 1,3 difenil-2 propanon, benzen, 3,4,5 trimetoksi benzaldehit, 3,4 dimetoksi benzaldehit, vanilin ve timol bileşiklerinin karakteristik uçucu bileşikler olduğunu tespit etmişlerdir. Bianchi ve ark. (2005) Sardinian çilek ballarının botanic orijinini belirleyen karakteristik uçucu bileşiklerinin alfa-izoforon, beta-izoforon ve 4- oksoizoforon olduğunu tespit etmişlerdir. De la Fuente ve ark. (2005) İspanya'ya ait 22 ökalyptus balı ile yaptıkları analizlerde 2-hidroksi-5-metil-3-hekzanon ve 3 hidroksi-5-metil-2- hekzanon bileşiklerinin belirteç olduğunu ispatlamışlardır.

Organizmalar, serbest radikallerin yol açtığı oksidatif hasara karşı kendilerini

koruyabilmek için bir çok savunma mekanizmasına sahiptirler (Ko ve ark., 2005; Bagchi ve ark., 2000; Spagna ve ark., 2003). Antioksidan savunma sistemleri, enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki gruptur. (Gebetta ve ark., 2000; Bagchi ve ark. 2000). Bu enzimatik ve nonenzimatik savunma sistemleri arasında güçlü ilişkiler mevcuttur (Kammerer ve ark. 2005). Antioksidan savunma sistemleri, pek çok farklı mekanizma ile serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirmektedir (Ergün ve ark. 2004; Long, 1984). Oksijen konsantrasyonunun lokal olarak azaltılması, serbest radikallerin tutulması, süperoksit radikalının daha toksik radikallere dönüşümünün önlenmesi, metal iyonlarının bağlanması, peroksitlerin zararsız ürünlere çevrilmesi, lipid peroksidasyonunu oluşturan zincirin kırılması, bu mekanizmalara örnektirler.

Balda 200 den fazla faydalı biyolojik maddenin tespiti geleneksel tıpta önemle göz önünde tutulmuştur. Bu nedenle insanlık tarihi başlangıcından günümüze kadar yanıklarda, gastrointestinal sistem hastalıklarda, astım, enfekte olmuş yara ve ülserlerde başarıyla kullanılagelmiştir.

Oksidatif stres çeşitli hastalıklara sebep olmakta ve pek çok araştırmacı araştırmalarında, oksidatif stresin hücre üzerindeki zararlarını önleyici ya da azaltıcı etki gösteren aktif bileşikler içeren doğal kaynaklar üzerine odaklanılmışlardır. Antioksidanlar bir zincir reaksiyonundaki okside olabilen bir substratın oksidasyonunu inhibe edebilir ya da geciktirebilirler ve bu nedenle pek çok hastalığın önlenmesinde çok önemli olabilmektedirler. Bitkiler tarafından sekonder ürünler olarak sentezlenen çok sayıda antioksidan bileşik yaşamak için reaktif oksijen türleri (ROS) ile ilişkiye girerek bitki savunma mekanizmasında iş görmektedirler (Stephern, 1992).

Balda bulunan biyoaktif bileşenler nektarla birlikte bala geçmiştir. Balın glikoz oksidaz, katalaz, askorbik asit, flavonoidler, fenolik asitler, karetenoid türevleri ve proteinler gibi hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar içerdiği bilinmektedir. Balda antioksidan özellikle flavonoidlerle birlikte askorbik asit, katalaz ve selenyumda antioksidan özellik göstermektedir. Koyu renkli balların daha yüksek antioksidan özellik gösterdiği belirlenmiştir (Stephern, 1992).

Balın kompozisyonu ve antioksidan kapasitesi nektarın toplandığı floral kaynağa, sezona ve çevresel faktörlere bağlı olduğu gibi işleme koşulları da balın kompozisyonu ve antioksidan özelliğini etkilemektedir.

Genel olarak, daha yüksek su içeriğine sahip bal örneklerinde olduğu gibi koyu renkli bal örneklerinde daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir (Gheldof ve

Eingeseth, 2002). Balın rengi potansiyel alkalinitesi ve mineral içeriğine bağlı olduğu kadar karetenoid ve flavonoidler gibi antioksidan olarak aktif bileşiklere de bağlıdır (Frankel ve ark., 1998).

1.2. Balın işlenmesi ve depolanması

Balın işlenmesinde ilk aşama balın sırlı kısmının alınmasıdır. Bu işlem balın üzerindeki ince mum tabakasının sır bıçakları ya da sır alma makineleri (büyük işletmelerde) ile sıyırılması aşamasıdır. Bu işleme başlamadan önce sırlı alınacak balların seçimi önemlidir, özellikle petek gözlerde fazla miktarda polen ya da kuluçka (yumurta, larva ve pupa) bulunan petekler elimine edilmeli ya da bu kısımlar petekten ayrılmalıdır. Bu işlemden sonra santrifüj ile ekstraksiyon işlemi başlar. Ekstraktörler işletmenin kapasitesine bağlı olarak 2 ya da daha fazla çerçeve kapasiteli olabilir. Bal nispeten yüksek sıcaklıklarda daha hızlı ve tamamen süzlebilmektedir ancak uygulanan ısı 30 °C' yi geçmemelidir (Bogdanov, 2008).

Bala uygulanan işlemlerin üçüncü aşaması, balın petek kırıntıları diğer kalıntılar ve hava kabarcıkları gibi kirliliklerden arındırılmasıdır. Bu konuda iki pratik teknik uygulanmaktadır; süzme ve dinlendirme. Dinlendirme aşamasında bal uygun geniş bir kap içerisine konur petek kırıntıları, böcek parçacıkları ve hava kabarcıkları ile diğer organik kirleticiler balın üzerinde yüzerken, ağır maddeler ve metalik partiküller dibe çökmektedir. Dinlendirme periyodu kirletici partiküllerinin büyüklüğüne, kap büyüklüğüne ve balın viskozitesine, nem ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. 25–30 °C' de dinlendirme birkaç gün içerisinde tamamlanır. Dinlendirme kaplarında mümkün olduğunca havayla temastan kaçınılmalıdır (Bogdanov, 2008)

Sonraki aşamada bal süzülür ve filtre edilir. En ince filtre 0.1–0.2 mm genişliğinde delik çapına sahiptir ve bu filtrelerden süzme yapılabilmesi için sıcaklık 30 °C civarında olmalıdır. Daha ince filtrasyon balın 77–78 °C 'ye kadar ısıtılarak pastörize edildiği işlemdir. Bu yöntem kristalizasyonu mümkün olduğunca geciktirmek için polen gibi küçük materyallerin temizlenmesini amaçlar. Ancak bu tür filtreler için yüksek basınç gerektirir. Bal depolanırken en önemli kıstaslardan biri kabın tamamen temiz olması ve hiçbir koku içermemesidir. Nemi uzak tutmak için kapak hava geçirmez olmalı, bal sıcaktan ve ışıktan korunmalıdır. Depolama ortamı 20 °C civarında sıcaklığa ve % 65'den az nispi neme sahip olmalıdır. Depolama sıcaklığı 25 °C 'den fazla olursa zamanla balın kalitesi düşmekte ve enzimatik değişiklikler meydana gelmektedir (Bogdanov, 2008).

1.3. Kristalizasyon

Balın kristalizasyonu pazar değeri açısından büyük önem taşımaktadır. Nitekim karasal iklimlerde çoğu bal normal depolama sıcaklıklarında bile kristalize olabilmektedir. Balların büyük çoğunluğu glikoz ile süperdoymuş (supersature) solusyonlardır ve bu şeker oda sıcaklığında (20 °C) kendiliğinden glikoz-monohidrat formuna kristalize olabilmektedir.

Süperdoymunluk termodinamik olarak dengeli bir durum değildir, doymunluğun üzerinde katı madde artışı kristalize olma eğilimi oluşturmakta ve solusyonun su aktivitesi düşmektedir. Genel olarak çoğu bal tipinde fruktoz baskındır, ancak ayçiçeği, yonca, pamuk, kolza, karahindiba gibi bazı ballarda glikoz oranı fruktozdan yüksektir. Balın kristalizasyonu genellikle granulasyon (şekerlenme) olarak adlandırılmaktadır. Soğuk mevsimin yaklaşmasıyla birlikte balların büyük çoğunluğu kristallenme eğilimi göstermeye başlamaktadır. Granulasyona uğramış ballar ham şeker veya ince sofr tuzu görünümündedirler. Petekli ballar süzme ballara nazaran daha az ve daha geç granüle olmaktadır. Bazı ballar petekten ayrıldıktan bir ay kadar sonra kristalize olduğu halde, diğer bazı ballar iki yıl kadar hiç kristalize olmadan saklanabilmektedir (Hindistan'da Tupelo bitkisinden üretilen bir bal çeşidi). Nitekim balların tümü aynı anda kristalize olmamaktadır. Farklı botanik orijine sahip olan balların granüle olma eğilimi bazı parametrelerle ilişkili olup bu parametrelerden bazıları; glikoz, glikoz/su, glikoz-su/fruktoz, fruktoz/glikoz ile melezitöz içeriğidir. Spesifik olarak bal, glikoz > % 28–30, glikoz/su \geq 2.1, fruktoz/glikoz < 1.14 ve melezitöz oranı % 10'dan büyük olduğunda bal hızla kristalize olmaktadır. Buna ilaveten balda toz, polen, petek ya da propolis parçacıkları bulunması da balın kristalize olmasını etkileyen faktörlerdir. Ayrıca balın botanik orijini, işleme koşulları, depolama şartları, sıcaklık, ortam nispi nemi ve balın muhafaza edildiği saklama kabının da balın granülasyonunda etkili olduğu bildirilmiştir.

Petekten yeni ekstrak edilmiş ve işlem görmemiş ham bal polen, petek parçacıkları, değişik oranda şeker toleranslı mayalar ve potansiyel olarak dekstroz-hidrat kristalleri gibi ekstra maddeler içermektedir. Bu ballar pazara hazır hale getirilmek ve temizlenmeleri için ekstrak edilmektedirler. Ticari ballar dekstroz kristallerinin çözünmesi ve mayaları uzaklaştırmak için kontrollü bir şekilde ısıtılmakta, basınçla filtre edilmektedir. Kristalizasyonu geciktirmek ve mayaları öldürebilmek için bal istenilen sıcaklığa getirildikten sonra hızla soğutulmaktadır. Bu işlemlerde muhtemel basınç sıcaklık kombinasyonları; 68.6 °C'de 30 sn, 82.8 °C'de 10-12 sn ve 85 °C'de 4-5 sn dir. Ancak işlem görmüş özellikle kristalizasyonu önlemek için sıcaklık muamelesi yapılmış balların biyolojik özelliklerinde

değişmeler olduğu da bilinen bir gerçektir (Bogdanov, 2008).

Nitekim Wong ve ark. (2004) işlem görmüş balların antioksidan aktivitesinde düşme gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Balın yüksek su içeriği fermentasyon ve mayalanmaya sebep olmaktadır. Granüle olan bal daha kolay fermente olmakta ve geri dönüşümsüz bir şekilde bozulmaktadır.

Yeni kristalize olmuş ya da kristalize olmaya başlamış balları sıvı hale getirmek için tüm kristaller çözünene kadar 40–50 °C’de ısıtılmaktadır. Bal eridikten sonra hızla şişelenmelidir çünkü sıvı kalma süresi değişik etkenlere (kompozisyonu, depolama sıcaklığı vb.) bağlıdır. Eritilen bal yeniden kristallenirse tekrar ısıtılmamalıdır, çünkü daha büyük olan kristalleri eritmek için daha yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durumda balın biyolojik yapısı tam anlamıyla bozulmaktadır. Bununla birlikte Gonnet (1984) tarafından bildirildiğine göre glikoz içeriği % 35’den az ve glikoz/su oranı 2 den az olan ballar ya da bal karışımları sıcak bir odada kısmen eritilmekte, ısıtılmış bir tekneye aktarılmakta ve burada tüm kristaller eriyene kadar karıştırılmaktadır. Daha sonra yabancı madde kalıntılarını uzaklaştırmak için süzülmemekte ve pastörize edilmektedir.

Yüksek sıcaklıkta pastörizasyon mayaları öldürmenin yanı sıra kristalizasyonu yeniden başlatan mikrokristalleri de bozan bir yöntemdir. Diğer bir yöntem ise basınç altında ultra filtrasyondur ki böylece polen, bakteri gibi çok küçük partiküller de elimine edilebilmektedir. Bunu takiben sıcaklık değiştirici sistemiyle şişeleme sıcaklığına getirilir (bu sıcaklık Amerika’da 57 °C ve Avrupa’da 35 °C’dir). Tercihen balların 0 °C’de 5 hafta süreyle pazarlama öncesi depolanması tavsiye edilmektedir. Ultrafiltrasyon yöntemi Amerika ve Kanada gibi ülkelerde balın raf ömrünü uzatmak, temiz ve şeffaf ürün elde amacıyla uygulanmaktadır. Ancak Avrupa Birliği üyesi ülkelerde polen taneciklerini de elimine ettiği için bu uygulama yasaktır. Çünkü bu durumda polen analizi ile yapılan balın coğrafik ve botanik orijini belirlemek imkânsızlaşmaktadır.

Son yıllarda sıvı bala alternatif olarak doğal balın kristalizasyonundan faydalanılarak krem bal üretimi yapılmaktadır. Bu üretimde önceden kristalize olmuş baldan alınan starter (başlatıcı kristaller) normal sıvı ballara ilave edilmek suretiyle kristalizasyon eğilimi artırılarak ısıtılmakta ve karıştırılmaktadır. Şişelenmeden önce hava kabarcıklarını elimine etmek için birkaç saat dinlendirilmektedir. Tek problem glikoz kristallerinin kurumması ve suyun yüzeyden buharlaşması nedeniyle hava kabarcıklarının yüzeyde buğumsu bir tabaka oluşmasıdır. Kristalizasyon ve fermentasyon balın kalitesini etkileyen en önemli iki faktördür. Bazı araştırmacılar balın kalitesini ve tazeliğini çeşitli fiziko-kimyasal parametrelerle

belirlemeye çalışmışlardır. Ancak son yıllarda balın kalitesi ile ilgili çalışmalarda balın toplam fenolik madde içeriği, aminoasit ve uçucu madde içeriği, antioksidan antiradikal ve antimikrobiyel aktivitesi gibi biyolojik özellikleri üzerine odaklanılmıştır (Cavia ve ark., 2002).

Dünyanın değişik bölgelerinden farklı botanik ve coğrafik orijine sahip bal örneklerinin fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Balda kristalizasyon ile ilgili çalışmalarda ise daha çok kristalizasyonun sebepleri araştırılmıştır.

Cavia ve ark. (2004) tarafından farklı iklime sahip iki bölgeden iki farklı hasat mevsiminde elde edilen balların su aktivitesi ve nem içeriği, ürünün elde edildiği yıl, depolamasüresi ve kristalizasyon arasındaki ilişkileri incelenmiştir. Çalışılan birbirinden bağımsız faktörler arasında istatistiksel olarak linear korelasyon gözlendiğini ve bal örneklerinin su içeriklerinin zamana bağlı olarak değişim gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Assil ve ark. (1991), Kanada'dan toplanan işlem görmüş sıvı bal örneklerinde glikoz kristalizasyonu için kontrol edilebilir faktörleri tanımlamak amacıyla HPLC işlemi kullanarak balları glikoz ve fruktoz bakımından analiz etmişlerdir. Çalışılan balların tamamının glikoz bakımından doymuş (> % 30 glikoz) ve fruktoz/glikoz oranı 1.12 olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmada, 45 °C ve üzerinde kristalizasyonun geciktiği, plastik kaplarda muhafaza edilen balların ise daha çabuk kristalize olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka araştırmada, Manikis ve Thrasivoulou (2001), bal örneklerinin fiziko-kimyasal karakteristikleri arasındaki ilişkileri ve kristalizasyon için duyarlılık parametrelerini incelemişlerdir. Araştırmada 1–12 ay arasında depolanan değişik botanik orijine sahip (*Anchusa officinalis*, *Echium vulgare*, *Eucalyptus camaldulensis* vb.) 50 bal örneğinden % 34 den fazla glikoz içeren 16 bal örneğinin daha yavaş kristallendiğini gözlemişlerdir. Salgı balı ve ayçiçeği ballarının, balların kristalizasyon eğilimlerinin belirlenmesinde iyi birer indikatör oldukları belirtilmiştir. Salgı balının maksimum glikoz içeriği % 29.3 ayçiçeğinin ise minimum % 35.2 olduğu tespit edilmiştir. Kekik balının ise orta düzeyde kristalizasyon eğilimi gösterdiğini belirlemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar glikozun balın granülasyonu için iyi bir indikatör olduğunu, orta düzeyde glikoz değerine sahip örneklerde kristalizasyonu tahmin etmenin zor olduğunu, glikoz/su oranının da kristalizasyonun tahmininde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Kristalizasyon üzerine yapılan diğer bir araştırmada, Conforti ve ark. (2006), Arjantin'in farklı bölgelerinden elde edilen 49 bal örneğini -20 °C'de depolamış ve kristalizasyonu etkileyen faktörleri incelemişlerdir. Örneklerin kristallenmeleri mikroskop ile takip edilmiş, akışkanlık ve

viskoziteleri ölçülmüş, su aktivitesi, turbidite, nem, fruktoz ve glikoz içerikleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda elde edilen bulgulara göre, örneklerin viskozite karakteristiklerinin, kristallerin sayısı, büyüklüğü ve pozisyonu ile ilişkili olduğu, kristalizasyonun yüksek nemde oluşması, oda sıcaklığında kristalizasyon oluşumunu etkileyen faktörlerin donma sıcaklıklarında ki kristal oluşumunu etkileyen faktörlerden farklı olduklarını belirlemişlerdir. Ayrıca %17'den düşük nem içeriği ile yüksek akışkanlık gösteren ballar arasında linear ters ilişki bulunduğunu saptamışlardır.

Cavia ve ark. (2002), İspanya'da üretilen 30 bal örneğinde bir yıl boyunca glikoz ve fruktoz oranını incelemişler ve kristalizasyon üzerine etkilerini tespit etmeye çalışmışlardır. Her bir bal örneğinin bir kısmı doğrudan depolanırken bir kısmını da %10 kristalize bal ekleyerek kristallenmeye bırakmışlardır. Bal örneklerinde 1 yıl boyunca her 4 ayda bir nem içeriği, pH, glikoz ve fruktoz değerleri tespit edilmiş, örneklerin çoğunda 1 yıl boyunca hem glikoz hem de fruktoz miktarın zamanla arttığını belirlemişlerdir. Başlangıçta kristalize olması sağlanan örnekler doğrudan depolanan örneklerle kıyaslandığında glikoz ve fruktoz miktarı bakımından istatistiksel farklılık göstermemişlerdir. Doğrudan depolanan bal örneklerinde glikoz ve fruktoz miktarları arasında doğrusal bir ilişki (linear korelasyon) gözlenmiştir. Örneklerin pH değerleri bakımından araştırma boyunca istatistiksel olarak önemli bir farklılık göstermediklerini bildirmişlerdir. Bu konuda yapılan araştırmaların birinde, Cavia ve ark. (2007), İspanya'da karasal iklim gösteren bölgelerden elde edilen bal örneklerinde asitlik ve bunun kristalizasyon üzerine etkilerini inceledikleri araştırmada 35 adet bal örneğinde (işlem görmemiş) pH, serbest asitlik, laktonlar ve total asitlik parametrelerini incelemişlerdir. Örnekler 5 ay boyunca oda sıcaklığında depolanmış, depolamanın pH ve serbest asitlik değerleri üzerine etkili olduğunu belirlemişlerdir. pH değeri depolama boyunca % 5 oranında düşmüş, hasat edildikten 20 ay sonra bal örneklerinin büyük çoğunluğunun serbest asitlik değeri düşüş göstermiştir. Hiçbir örneğin serbest asitlik değeri 50 meq/kg'ı geçmemiştir. Araştırma boyunca serbest asitlik ve pH değerleri arasında doğrusal bir ilişki gözlenmiştir. Ne depolama ne de teşvik edilen granülasyon total asitlik üzerine etkili olmamıştır. Çalışmada serbest asitlik ve lakton değerleri bakımından her ölçüm döneminde istatistikî farklılıklar belirlenmiştir. Bundan dolayı balda yaşlanmanın asitlik değerinden tahmin edilebileceği sonucuna varmışlardır. Yine, Gleiter ve ark. (2006), kristalizasyon tipi ve durumunun balın su aktivitesi üzerine etkisini inceledikleri araştırmalarında, Almanya'da üretilen 249 farklı bal örneğinin su aktivitesi bakımından analizini yapmışlardır. Bal örneklerini öncelikle melissopalinojik ve fiziko-kimyasal özelliklerine göre

tanımlamışlardır. Su içeriği 20 °C’de refraktometre ile tespit edilmiş, kristalize olmuş bal örneklerinin su içeriğinin sıvı ballara göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte salgi ve çiçek ballarının su içerikleri arasında önemli farklılıklar bulunduğunu, sıvı durumda aynı su içeriğine sahip çiçek ve salgi ballarından; salgi ballarının daha yüksek su aktivitesine sahip olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca kristalize olmuş farklı bal tiplerinin su aktiviteleri arasında önemli farklılıklar gözlenmemiştir. Sonuç olarak su aktivitesinin baldaki glikoz içeriğine bağlı olduğunu tespit etmişlerdir. Su aktivitesi ile ilgili bir başka araştırmada, Zmora ve Chirife (2006), Arjantin’den elde edilen 49 bal örneğinde kristalizasyon nedeniyle değişen su aktivitesini tespit etmeye çalıştıkları araştırmalarında, örneklerin çoğunda su aktivitesinin 0.03–0.04 aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar kristalize olmuş baldaki su aktivitesini baldaki glikoz oranıyla ilişkilendirmişlerdir. Yapılan literatür incelemesinde balın kristalizasyonu ile ilgili olarak ülkemizde yapılmış araştırma, proje yada makaleye rastlanılmamıştır.

Balın kristalizasyonu işleme ve pazarlama açısından istenmeyen bir özelliktir (Hanna ve ark., 1991). Diğer yandan krem bal üretimi gibi amaçlarla istenilen bir özellik te olabilir. Balın kristalizasyonu, hem arıcı hem de bal paketleyicileri açısından önemlidir. Bununla birlikte herbir bal tipinin kristalizasyonu birbirinden farklıdır. Bazıları hiç kristalize olmaz iken bazıları çok yavaş bazıları ise hızlı kristalize olmakta, yine bazıları ince kristaller sahipken diğerleri kaba tanecikli kristalizasyon özelliğine sahiptir. Bu durum hem arıcılar hem de bal paketleyicileri için tedarik ve işleme açısından belirsizliklere sebep olmaktadır. Buna ilaveten bal kristalize olduğunda kristalize olmayan kısım kristallerden su çekip yüksek miktarda su içereceğinden kaliteyi etkileyen bir faktör haline gelmektedir (Wilson ve Maurin, 1931).

İlginç olan normal koşullarda petekteki balın kristalize olmayışıdır. Crane (1980) e göre petekteki balın kristalize olmasının önlenmesi, peteğin nem, toz ve diğer kontaminantlardan korunmuş bir ortam sağlamasından kaynaklanmaktadır. İşleme sırasındaki bal glikoz kristallerinin erimesini sağlamak için 70-75 °C de 5-10 dk ısıtılması gerekir. Tüm kristal ve nukleusların erimesinden sonra balların çoğu aylar boyunca sıvı formda kalabilmektedir (Gupta ve ark., 1992; White, 1979). Çeşitli araştırmalarda 55 °C nin altında ısıtma sonuçta daha hızlı kristalizasyona neden olan bazı mikroskobik çekirdeklerin erimesinde etkili değildir (Sethi, 1995). Kristalizasyonun başlangıç aşamasında çekirdek kristalizasyonu sadece polariskop kullanılarak belirlenebilmektedir (Bonvehi, 1989). Kristalizasyon ve çekirdeklenmenin vektörel hızı ve kristal tipi, belirgin bir şekilde balın

kompozisyonu ve sıcaklıktan etkilenmektedir (Lupano, 1997; Bonvehi, 1989). Kirler (toz ve kir partikülleri), hava kabarcıkları, polen tanecikleri, bal konteynırının çeper, bal toplanan konteynırdaki daha önce mevcut olan glikoz kristalleri ve balmumu partikülleri balın kristalizasyon çekirdeklerini oluşturan faktörler olarak rapor edilmiştir (Crane, 1980; Hanaa, 1991). Bal kristalleri gelişme durumuna göre iğne şekilli, düz tabak şeklinde ya da yıldız şeklinde olabilmektedir (White, 1979). Düz tabak formundaki kristaller, dile pürüzsüz his veren ince kristalizasyonun karakteristiğidir. Yavaş kristalizasyon sağlayan büyük yıldız şekilli kristaller birbirlerinin tabanı üzerinden gelişirler ve bala tırtıklı bir tekstür kazandırlar (Dyce, 1979). Bu tip kristaller süpermarket raflarındaki sıvı bal kavanozlarında gözlenmektedir. White (1978) ham baldaki kristalizasyon genelde ince tanecikli iken ısıtılmış yani işlem görmüş baldaki kristalizasyon yavaş ve kaba tanecikli olduğunu bildirmiştir. Buna ilaveten Lupano (1997) 20 °C de depo edilen balların kaba tanecikli iken -20 °C de depo edilen balların ince, orta sıcaklıkta (4-10 °C) depolananlarınsa karışık büyüklükte kristal içerdiği rapor etmiştir. Bu gözlem çekirdekleşme ve kristal gelişiminin sıcaklığa bağlı olduğunu ve düşük sıcaklıkların balda moleküllerin sınırlı mobilitesi nedeniyle daha küçük boyutta kristal ürettiklerinin göstermiştir (Lupano 1997).

Balların çoğu glikozun superstaur olduğu solusyonlardır; bu şeker oda sıcaklığında glikoz monohidrat formnda kendiliğinden kristalize olabilir. Balın kristalize olması sıvı formdaki glikoz konsantrasyonunun düşmesi ve bu nedenle su aktivitesinin artmasıdır ki bu durum balın fermentasyonuna neden olan maya hücrelerinin doğal olarak gelişimine neden olmaktadır. Balın kristalizasyonu genel olarak granulasyon olarak adlandırılır, sıvı fazda glikoz konsantrasyonu düşer ve bu nedenle su aktivitesi artar, böylece balın fermentasyonuna neden olan maya hücrelerinin gelişimi mümkün hale gelir. Nerdeyse tüm ballar zamanla kristalize olur, bazı ballar uniform olarak kristalize olurken bazıları üst kısımda sıvı kısma ayrılırlar (Zamora ve Chirife 2006).

1.4. Balda kristalizasyonu etkileyen faktörler

Balın kompozisyonu; floral kaynak, iklim, çevresel şartlar ve arıcı tarafından yapılan işlemlerden etkilenmektedir. Bu nedenle dünyanın her bölgesinde üretilen balın kompozisyonu birbirinden farklıdır. Bal çeşitli şekerlerden oluşan bir solüsyondur ve sıklıkla normal sıcaklıklarda glikoz bakımından supersaturatedir. Glikoz ve fruktoz (invert şekerler) baldaki temel şekerlerdir ve baldaki oranları sırasıyla % 33-35 ve % 38-40 civarındadır. Fruktoz içeriği normalde glikozdan yüksek olmasına karşın bazı istisnalar vardır (Sanz ve

ark., 1994). Bu iki indirgenmiş şeker balın % 65 den fazlasını oluşturmaktadır. İndirgenmiş şekerlerin baldaki minimum miktarı Australian Food Standards Code tarafından % 60 olarak (w/w) belirlenmiştir (ANZFA, 1998). Buna ilaveten balda minor oranda bulunan şekerler de vardır, özellikle sukroz ve maltoz gibi, bu şekerlerin oranları % 1-5 arasında değişmektedir. Balda çeşitli trisakkaritler ve yüksek oligosakkaritler de minor oranda bulunmaktadır (Swallow ve Low 1990; White, 1979). Yüksek şekerlerin miktarı (maltoz gibi) depolama koşullarına bağlı olarak balın depolanma süresince monosakkaritlerin aleyhine arttığı bildirilmektedir. Bu duruma sebep olan iki mekanizma vardır: enzim aktivitesi ve reversiyon (Crane, 1980).

Balın kompozisyonundaki değişkenlik Tablo 1.4.1'de özetlenmiştir (White, 1979; Crane, 1980). Bal çeşitli şekerlerin kompleks bir karışımı olduğu için bu kompleks yapıda glikozun kristalizasyonunu tahmin etmek zorlaşmaktadır. Bu nedenle kristalizasyon ve çözünürlüğün diğer şeker komponentleri tarafından pozitif ya da negatif olarak etkileniyor olması bir gerçektir. Glikoz-fruktoz-su sistemi göz önünde tutularak balın kristalizasyon davranışını karakterize etmek için çeşitli deneysel metotlar gerçekleştirilmiştir (White, 1978; Sanz ve ark., 1994; Bonvehi 1989; Hanaa 1991).

Tablo 1. Balın kompozisyonundaki değişkenlik (White, 1975)

İçerik	% Kuru madde (kg/kg örnek) x 100
Glukoz	22-41
Fruktoz	27-44
Sukroz (sakkaroz)	0,25-8
Maltoz	3-16
Yüksek şekerler	0.13-8.5
Su	13-23
pH	3.42-6.1
Toplam asit	0.2-1.2
Kül	0.02-1.0

Kristalizasyonu karakteriz etmek için kullanılan tüm faktörler Tablo 1.4.2'de verilmiştir. Bununla birlikte glikoz/su (G/W) oranı diğer metotlardan daha gerçekçidir. Belirli bir kompozisyonda sıvı baldaki %1 lik nem varyasyonu kristalizasyonu etkileyebilmektedir (Townsend, 1975).

Çeşitli araştırmalarda G/W oranı <1.7 olduğunda bal granule olmazken 2.2 ve üzerindeki değerler balın hızla granule olacağını göstermektedir (White, 1975). Bununla birlikte Chandler ve ark. (1974) kullanılan 3 yaygın formülün (G/W, F/G ve G-W/F) hiçbiri 25 Avusturya balının test edildiği araştırmada kristalizasyonu formüle etmek için uygun bulunmamıştır. Araştırmacılar glikozun supersaturasyon durumunun stabilitesini uzatmak ve glikozun çözünürlüğünü artıran dekstrin bulunmasına atfetmişlerdir. Diğer yandan Sanz ve ark. (1994) hiçbir metodun % 100 tahmin edememekle birlikte F/G oranının bazı İspanyol ballarının kristalizasyon oranını tahmin etmek için iyi bir belirleyici olduğunu bildirmişlerdir.

Tablo 2. Balda kullanılan kristalizasyon indikatörleri (Bonvehi, 1989)

İndikatörler	Granülasyon yok	Hızlı granülasyon
G/W oranı	<1.7	>2.16
F/G oranı	>1.33	<1.11
(G-W)/F oranı	<0.3	>0.49
% Glikoz	<27.7	>35
GSK (glikozun supersaturasyon katsayısı)	<1.8	>2.6
Tabouret indeksi	<9.8	>12.6

Tabouret (1979) kristalizasyonun tahmininde su aktivitesi ve G/W oranına dayanan bir metod (Tabouret İndeksi) önermiştir:

$$(\text{Tabouret İndeksi})I = \frac{G / W}{1 - W}$$

Viskozite balın en önemli fiziksel özelliklerinden biridir. Bu özellik özellikle depolama ve işleme sırasında önem kazanmaktadır (White, 1979; Assil ve ark., 1991). Balın akış özelliği; kompozisyon, sıcaklık, kristallerin miktarı ve büyüklüğü gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu konuda dominant faktörlerden biri nem içeriğidir. Normal koşullarda yüksek nem içeriği viskozitenin azalmasıyla sonuçlanır. Balın viskozitesini etkileyen diğer faktörler ise bireysel şekerlerin kompozisyonu ve balda mevcut olan kolloidlerin miktarı ve tipidir. Bal temel olarak şeker şurubudur ve viskozite karakteristikleri balda mevcut olan şekerlerin moleküler zincir uzunluğu ile yönetilebilmektedir. Aynı özellikte bir solusyon sisteminde monosakkaritlere göre disakkaritler viskoziteye daha fazla katkıda bulunmaktadır (Chirife ve Buera 1997). Balın viskozitesinde sıcaklık ta diğer önemli rolü olan faktördür.

Fiziksel olarak sıvı bal, tüm şekerlerin amorf durumda bulunduğu viskoz yapıdadır. Solüsyonun viskozitesi sıcaklık arttıkça azalır. Solüsyon hızla soğutulduğunda 10^{12} Pas civarında viskozite vitrifiye olmakta, bu viskozite değerinde tüm fiziksel ve kimyasal reaksiyonlar oldukça düşük olmaktadır. Bu katı solüsyon belli bir sıcaklıkta yavaşça ısıtıldığında viskozitenin 10^7 Pas civarında olduğunda akış başlamaktadır. Böylece moleküler mobilite yeniden kazanılmakta ve reaksiyon oranı hızla artmaktadır. Bu özel sıcaklık derecesi “glass transition temperature” olarak bilinmektedir ve bu sıcaklığın bilinmesi balın depolanması ve işlenmesi sırasında pratik önem kazanmaktadır. Bu sıcaklığın altında bal soğutulduğunda kristalizasyon fenomeni tümüyle inhibe olmaktadır. Balın viskozitesi ve sıcaklık kristalizasyon oranını etkilemektedir. Bu noktada balın kristalizasyonu viskozite ve moleküler mobilite ile ilişkilidir (Bhandari ve ark., 1999).

Glikozun supersaturasyon değeri saptanabilir (baldaki glikoz değeri/su, 100 g sudaki gr glikoz) ve genelde 1.5-2.5 aralığındadır. Baldaki fruktozun saturasyon değeri 25 °C’de 405.1 g fruktoz/100 g sudur (Bubnik ve ark., 1995). Farklı botanik ve coğrafik orijine sahip balların suyundaki en yüksek fruktoz konsantrasyonu 222-295 g fruktoz/100 g sudur (Mateo Bosch-Reig 1998; Mendes ve ark., 1998).

Saturasyonda bireysel olarak bileşiklerin herbiri kendi sabit dengeli su aktivitesi değerini oluşturur ve glikoz için bu değer 25 °C’de 0.891 dir (Rüegg ve Blanch, 1981), ancak sature olmuş bir glikoz solusyonu süpersature olduğunda su aktivitesi düşmektedir. Çünkü süpersaturasyon termodinamik olarak denegersiz bir durumdur, saturasyon üzerindeki fazla solüt kristalize olmaya eğilim gösterir ve solüsyonun su aktivitesi çözünürlük denge konsantrasyonunun üzerine çıkar. Sonuç olarak kristal-slurry (kristalize bal=bulamaç) ısıtılarak glikoz kristalleri yeniden çözülürse bu süpersature solüsyonun su aktivitesi düşer çünkü su aktivitesi colligative (bağlaşık) özellik gösterir.

Glikoz konsantrasyonundan sonra sudaki glikoz dışındaki şekerlerin konsantrasyonu artmaktadır (solüsyon formundan glikoz monohidrat formuna su emdiği için). Bununla birlikte total solüt (tüm şekerler) sudaki konsantrasyonu kristalizasyondan sonra azalmaktadır yani sıvı fazın su içeriği yükselmektedir. (Bhandari ve ark., 1999; Bhandari ve Hartel, 2002).

Farklı balların nem içeriklerindeki farklılık ve/ya da koloid içeriklerindeki fark nedeniyle bu ballar farklı viskoziteye sahiptirler. Agitasyon, depolama sıcaklığı ve yabancı maddeler kristalizasyonu artırırken bazı çözünebilir kirlilikler kompleks karbonhidratlar ve proteinler kristalizasyonu inhibe eder. Balda fruktozun bulunuşu kristalizasyonu önlediği için özellikle önemli bir faktördür.

Balın fermentasyonu, glikoz ve fruktoz üzerinden sonuçta etilalkol ve karbondioksit oluşturan “sugar tolerant” mayaların aktivitesiyle oluşmaktadır ve oksijen varlığında etil alkol, asetik asit ve suya ayrışmaktadır. Sonuç olarak balın tadı etkileşerek fermente olmaktadır. Fermentasyondan sorumlu mayalar balda doğal olarak oluşmaktadır ve bu konuda etkili başta *Saccharomyces spp.* olmak üzere çok sayıda maya cinsi rapor edilmiştir (Snowdan ve Cliver 1996). Bal endüstrisinde bir balın su içeriği fermentasyonun neden olduğu bozulmada anahtar faktör olarak göz önünde tutulmaktadır. Bununla birlikte Scott (1953) bir gıdada mikrobiyel gelişimi yönetenin su içeriği değil su aktivitesi olduğunu, su aktivitesinin düşük olmasının mikroorganizmaların gelişimi ve toksin üretimine engel olduğu bildirilmiştir (Beuchat, 1983). Bu nedenle yüksek oranda monosakkarit içeriği (glikoz+fruktoz) ve nispeten düşük nem içeriği, balda 0.60’ın altında su aktivitesi ozmofilik mayaların gelişimini inhibe etmek için yeterlidir (Rüegg ve Blanc, 1981). Kristalizasyonu etkileyen faktörler aşağıda verilmiştir

1. Arılar tarafından toplanan nektar kaynağı (balın şeker kompozisyonu)
2. Balın işleme metotları
3. Depolama sıcaklığı

Balın zamanla kristalize olması çoğunlukla glikoz/früktoz oranı ile glikoz/su oranına bağlıdır. Glikoz şekerince zengin bal düşük früktoz/glikoz oranına sahiptir ve hızla kristalize olur. Yonca, karahindiba, mesquite (*Prosopis* cinsinde küçük ağaçlar), kolza (*Brassica napus*) ve hardal balları bu kategoriye girmektedir. Yüksek F/G oranına sahip ballar (% 30 dan daha az glikoz) oldukça yavaş kristalize olurlar ve özel bir uygulama gerektirmeksizin yılarca sıvı formda kalabilirler, örneğin black locust (*Robinia pseudoacacia*), adaçayı, longan (*Dimocarpus longan*-ejderha gözü), tupelo, ve jujube/sidr (*Ziziphus spina chrsti*) gibi.

1.5. Balda kristalizasyonu önleme metotları

Balın kristalizasyonunu durdurmak için çeşitli metotlar denenmiştir. Bunlardan bazıları; -40 °C’de dondurmak, sıcaklık uygulaması ile kristal ve kristal çekirdeklerini çözmek, filtrasyonla hava kabarcıkları ve polen partiküllerini uzaklaştırmak, dolun sırasında oluşan hava kabarcıklarından kaçınmak için daha yüksek sıcaklıklarda (>45 °C) dolun yapmak, glikoz ve fruktoz oranları ile su içeriğini ayarlayan izobutirik asit yada sorbik asit gibi inhibitörlerin ilavesi (Gupta ve ark., 1992; Lupano ve ark., 1997; White, 1979; Hanaa, 1991). Ancak çoğu ülkede katkı maddesi ilavesi yasaklanmıştır, bu nedenle ısıtma ya da kompozisyonları bilinen çeşitli balların blending (belli oranlarda karıştırma) kristalizasyonun

kontrolü için bilinen en iyi yollardır. Balın ısıtılması kristalizasyonu geciktirmektedir ancak tohumlanma var ise yine de kristalize olabilmektedir.

Kovan içindeki sıcaklık yaklaşık 35 °C'dir ve arıların balı olgunlaştırdığı yaz periyodu boyunca 40 °C'ye yükselebilir. Balı sıvı tutabilmek için en iyisi 35-40 °C'ye ısıtmaktır. Aşırı ısıdan kaçınmak için 40 °C'nin üzerine çıkılmamalıdır. Herhangi bir zaman periyodunda balın aşırı ısıtılması enzimlerini bozarak, hassas olan tat ve aroma kaybına yol açarak ve balın renginin koyulaşmasına neden olarak balın kalitesini düşürmektedir. Balın besin değerinin kaybolmaması için ısıtma işleminin dikkatli yapılması gerekmektedir. Benmari usulü yada ısıtma kabinlerinde yapılan ısıtmada düşük sıcaklıkta (35-40 °C) uzun süre tutmak en iyisidir. Kristalizasyondan kaçınmak için

1. Bal oda sıcaklığında iyi kapatılmış konteynırarda depolanmalıdır
2. Balın depolanması için optimum sıcaklık 21-27 °C'dir.
3. Balı kristalizasyon formasyonu için ideal olan 11-18 °C'de soğukta depolamaktan kaçınmalı
4. Bal kristalizasyon prosesini hızlandıran buzdolabında depolanmamalı
5. Kristalizasyonu başlatan kristal, hava kabarcıkları mum parçaları polen tanecikleri gibi küçük partikülleri uzaklaştırmak için bir yada birkaç tabakalı tülbenten geçirilmeli yada 80 mikropordan filtre edilmeli
6. Balın double boiler (benmari) de ısıtılması 40 °C'de şeker kristallerini eriterek kristalizasyonu geciktirmektedir
7. Aşırı ısıtma riskinden kaçınmak için bir el termometresi ile sıcaklığı kontrol etmek gerekmektedir.
8. Amerika'da bal paketleyicileri sıvı balı 63 °C'de yarım saat ya da 71 °C'de 1 dakika ya da ısıtıp hızla 49-52 °C'ye soğutmak sıcaklık zararını minimize etmektedir. Bu sıcaklık fermentasyonuna neden olan maya hücrelerini öldürmekte ve balın raf ömrünü uzatmaktadır (Hamdan, 2010).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Araştırmada kullanılan bal örnekleri

Araştırmada kullanılan 8 (kekik, üçgül, narenciye, ayçiçeği, kestane, geven, pamuk ve çam) monofloral bal örneği Türkiye'nin farklı bölgelerinde bal tipinin üretildiği yörelere gitmek suretiyle direk arıcıdan temin edilmiştir. Bal örnekleri TSE tarafından bildirilen yönteme uygun olarak toplanıp, etiketlenerek hasat tarihi, botanik ve coğrafik orijin gibi bilgiler yazılmıştır.

2.2. Melissopalinojik analizler

Bal örneklerinin monofloral ya da polifloral olarak sınıflandırılabilmesi ve botanik orijin tespit edilebilmesi için polen analizi yapılmıştır. Polen analizleri Louveaux ve ark. (1978)'nin bildirdikleri metoda göre yapılmıştır. Preparat mikroskop altında incelenerek polenlerin hangi taksona ait olduğu familya ve cins düzeyinde belirlenmiştir. Bu yöntemde baget yardımıyla homojen hale getirilmiş stok baldan 10 gram alınarak üzerine 20 ml distile sui lave edilerek balın erimesi için iyice karıştırılmıştır. Örnek tüpleri 3500-4000 rpm de 45 dakika süre ile santrifüj edildikten sonra santrifüj edilen tüplerin suyu dökülerek bir kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip tüpteki suyun iyice süzülmesi sağlanmıştır. Bir diseksiyon iğnesi ile gliserin jelatinden bir parça alınarak tüpün dibine çöken kısma değdirilip çökelti ile bulaşık gliserin jelatin lam üzerine konularak üzerine lam kapatılmıştır. Preparatların mikroskopta incelenmesi suretiyle bala kaynak olan bitkilerin polenleri teşhis edilmiştir. Polenlerin sayılmış sonucunda dominant (>%50) olan polenlere sahip olan ballar araştırmaya dahil edilmiştir.

2.3. Bal örneklerinde şeker analizi

Bal örneklerinde şeker analizi HPLC ile DIN 10758 metoduna göre yapılmış ve bu amaçla waters marka ve alliance model HPLC sistemi, refraktif indeks dedektör, amin modifiye silika jel kolon (3 x 100 mm) kullanılmıştır. Uygulanan yönteme göre mobil faz asetonitril/su (80/20), kolon sıcaklığı 35 °C ve akış debisi 0.5 mL/dakikadır. Bal örneklerinde glikoz, fruktoz, maltoz, turanoz, izomaltoz, erloz, maltotrioz, sakkaroz, trehaloz, melezitoz miktarları belirlenmiştir.

2.4. Balda toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Bal örneklerinin toplam fenolik madde içeriği Folin-Ciocalteu metodundan bazı modifikasyonlarla belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Kısaca her bir bal örneği (1 g) 4 ml distile suda çözülecek vorteks kullanılarak karıştırılmış ve solusyon Whatman No. 1. den süzümüştür. Solüsyona (40 µl) 2400 µl su 200 µl dilue edilmemiş Folin-Ciocalteu ayırıcı ve 600 µl sodyum karbonat (20 % Na₂CO₃) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkubasyondan sonra 765 nm de absorbans ölçülmüş ve sonuçlar mg gallik asit/ 100 g bal olarak ifade edilmiştir.

2.4. Bal örneklerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi

Bal örneklerinde antioksidan aktivite fosfomolibden (Prieto ve ark., 1999) metoduna göre yapılmıştır. Kısaca 0.4 ml örnek eşit miktarda metanolla karıştırılarak, 4 ml ayıraç solusyonu (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) ile karıştırılmıştır. Kör olarak bal solusyonu yerine metanol kullanılmıştır. Karışım vortekslenip 95 °C su banyosunda 90 dakika bırakılmıştır. Absorbans 695 nm de ölçülerek, antioksidan aktivite askorbik asit eşitliğine göre (mg/1 g metanol ekstrak) hesaplanmıştır.

2.5. Bal örneklerinin fenolik madde kompozisyonlarının belirlenmesi

Bal örneklerinde mevcut fenolikleri belirlemek için reverse faz LiCrochart RP-18 (Merck) (12.5 x 0.4 cm, 5µm particle size) kolon, solvent olarak ise methanol ile su: formik asit (19:1) kullanılmıştır. Elusyon 30 dakikada % 55 methanole ulaşana kadar % 5 methanol ile başlanarak solvent akış oranı 1ml/dk oranında ayarlanmıştır. Nektar flavonoid fraksiyonunun asit hidrolizinden sonra elde edilen aglikonlar aynı kolon ve solvent ile analiz edilerek, elusyon 40 dk'da % 80 methanol, 35 dk'da % 50, 25 dk'da % 35, 15 dk'da % 30, 10 dk'da % 15 ile oluşturulmuştur. Amberlite XAD-2 kolonda elde edilen metanol ekstrak konsantre edilerek Sephadex LH-20 (Pharmacia) (10 x 0.5 cm) kolonundan geçirilerek flavonoid fraksiyonu dehidrate edilip 2 ml 2 N HCl de yeniden çözülmüştür (40 dk boyunca stoppered bir tüp içerisinde). Daha sonra aglikonlar ethylic eter (2 ml x 3) ile sıvı/sıvı ekstraksiyonu ile ekstrakt edilip metanolde çözümlenerek HPLC ile analiz edilmiştir (Ferrerres ve ark. 1996).

2.6. Bal örneklerinde antiradikal aktivitenin belirlenmesi (DPPH deneyi)

Bal örneklerinin DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikallerine karşı koruyucu etkisi Brand-Williams ve ark. (1995) ve Gyamfi ve ark. (1999)'un metotlarına göre bazı minör modifikasyonlarla belirlenmiştir. Kısaca her bir bal örneği (1 g) vorteks kullanılarak 4 ml metanolde çözülerek solusyon Whatman No. 1. den filter edilmiştir. 50 µL bal örneği 450 µL Tris-HCL ve 1000 µL of 6 x10⁻⁵ mM DPPH ile karıştırılmıştır. Karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bırakılıp 517 nm de spektrofotometrik olarak absorbans ölçülmüştür. Antiradikal aktivite aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Antiradikal Antivite (\%)} = \frac{\text{Kontrol Absorbansı} - \text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100$$

2.7. Balda antimikrobiyel aktivite

Disk difüzyon metodu kullanılarak gram + ve gram – bakterilere karşı antimikrobiyel aktivite testi yapılmıştır. Bu metot kapsamında iki kez aktiveleştirmeye tabi tutulmuş mikroorganizma örnekleri nutrient agar besiyeri içerisine eklenerek petrilere yaklaşık 15 ml besiyeri dökülmüştür. Bal örneklerinden steril NaCl (% 95) çözeltisi ile farklı konsantrasyonlar hazırlanarak (% 10, 25, 50, 75) petrilere üzerinde mantar delici ile açılmış kuyucuklara 50 µl bal örneği pipetlenmiştir. 37 °C'de 24 saat süren inkübasyon periyodu sonunda inhibisyon zonları mm cinsinden ölçülmüştür.

2.8. İstatistiksel analiz:

Normal ve değişik oranlarda kristalize olmuş bal örneklerinin analizlerinden elde edilen verilerin analizinde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA), gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde DUNCAN Çoklu Karşılaştırma Testi (Duncan, 1975) ve İkili grupların karşılaştırılmasında da independent-samples t-test uygulanmıştır. Verilen analizinde SPSS for Windows 13.0 İstatistik Paket programı kullanılmıştır.

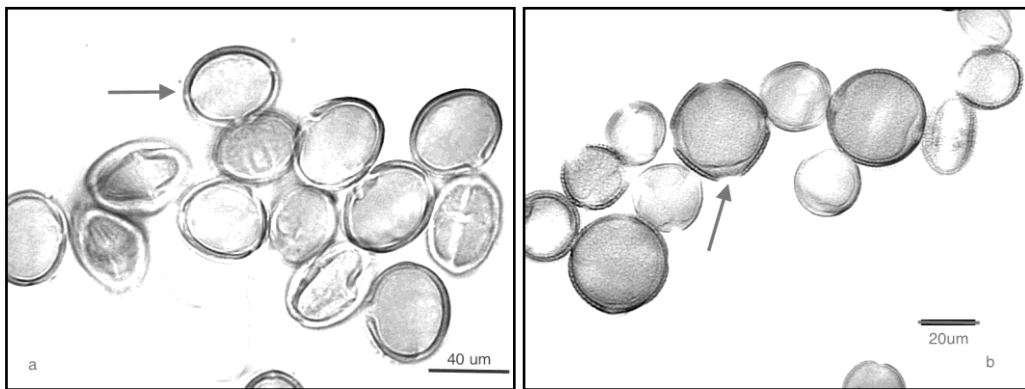
3. BULGULAR

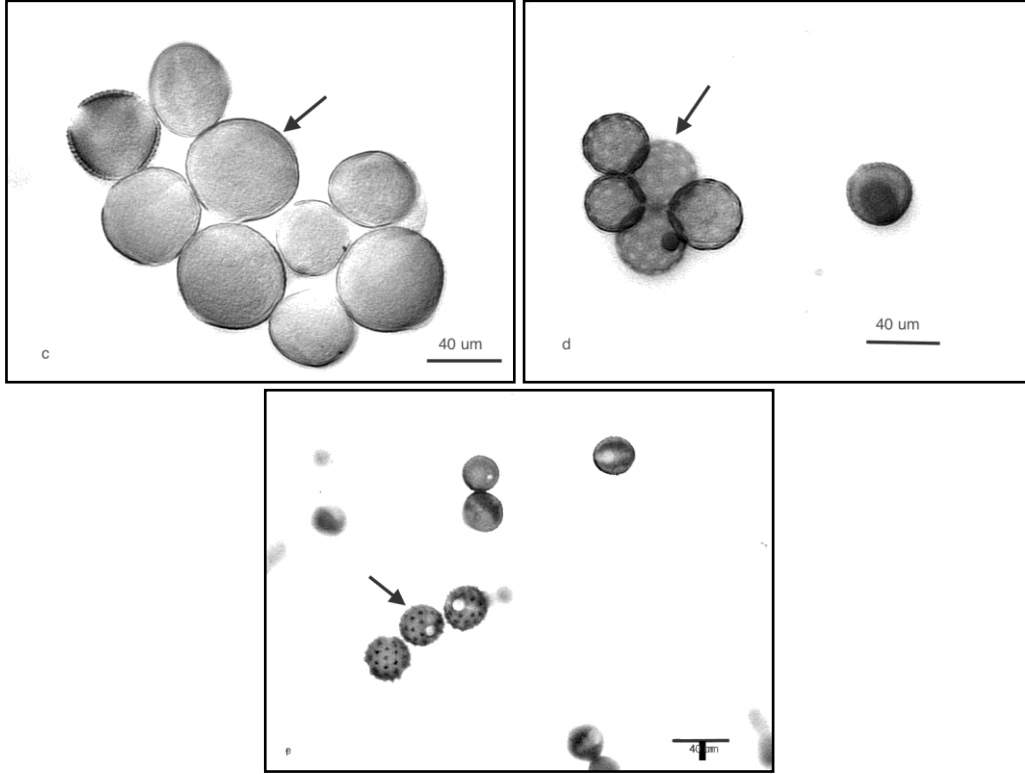
Araştırmada kullanılmak üzere monofloral bal örneklerinin her birinden en az 5 örnek temin edilmiş, örneklerde polen analizi yapıldıktan sonra en yüksek polen yüzdesine sahip bal örneği araştırmaya dahil edilmiştir. Monofloral bal örneklerinin temsil ettikleri bitkiye ait ortalama polen yüzdeleri ve coğrafik orijinleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo.3.1. Monofloral balların coğrafik ve botanik orijinleri

Coğrafik Orijin	Botanik Orijin	Temsil edilen Polen (%)
Bursa	Castanea spp. (Kestane)	93.60
Adıyaman	Trifolium spp. (Üçgül)	76.8
Aydın	Thymus spp. (Kekik)	92.18
Kayseri	Astragalus spp. (Geven)	60.39
Muğla	Pinus spp. (Çam, salgı)	Salgı, >3 HDE
Mersin	Citrus spp. (Narenciye)	71.5
Edirne	<i>Helianthus annuus</i> (ayçiçeği)	78.6
Adana	Gossypium spp. (pamuk)	62.5

Kestane polenleri ortalama % 93.60 (over represented) temsil edilirken, üçgül balı % 76,8, Kekik % 92,8, Geven % 60,39, Narenciye balı % 71,5, ayçiçeği % 78,6 ve pamuk % 62,5 oranında bala ismini veren bitkinin poleniyle temsil edilmiştir. Çam balı ise salgı balı olduğundan honeydew element sayısı göz önüne alınarak değerlendirme yapılmıştır (Şekil 3.1.).





Şekil 3.1. Örneklerin polen analizi a- *Castanea sativa* b-*Citrus* spp. c- *Trifolium* spp. d- *Gossypium hirsutum* e. *Helianthus annuus*

Yapılan fizikokimyasal analizlerde bal örneklerine ait 23 fizikokimyasal analiz tamamlanmıştır. Bu analizlerde bal örneklerinin renk değerleri Pfund skalasına göre 20.20-81.82 arasında tespit edilmiştir. Buna göre en açık renkli bal üçgül en koyu renkli bal ise kestane balıdır. Bal örneklerinin su içerikleri (nem değerleri, %) 18.5'un altındadır ve 17.02-18.27 arasında değişmiştir. En yüksek nem içeriği narenciye balında en düşük nem içeriği ise geven ve çam ballarında belirlenmiştir HMF verileri ise 3.66-23.97 aralığında olup, analiz edilen ballar hem Avrupa Birliği Bal Kodeksi (Council Directive, 2002) hem de Türk Bal Tebliğine (Resmi Gazete: 27.07.2012) uygun değerlerdedir. Bal örneklerinin asitlik değerleri 16.15-29.83 mEq/g/kg aralığında tespit edilmiştir. Analiz edilen bal örneklerinin iletkenlik değerleri 0.18-1.11 aralığında tespit edilirken en yüksek iletkenlik değerine sahip bal örneği çam balıdır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Bal örneklerinin fizikokimyasal özellikleri

PARAMETRE	BALLAR							
	KEKİK	ÜÇGÜL	NARENCİYE	AYÇİÇEK	KESTANE	GEVEN	PAMUK	ÇAM
Renk (Pfund)	53.78±2.44b*	20.20±2.10a	20.50±11.91a	81.22±4.58c	81.82±6.85c	22.90±6.71a	21.50±4.40a	77.30±8.26c
Nem (%)	17.07±0.81abc	17.02±0.27abc	18.27±1.34d	17.47±0.39c	17.31±0.83c	16.36±0.30a	17.12±0.83bc	16.49±0.35ab
HMF (mg/kg)	23.97±22.91b	3.66±0.86a	5.76±9.35a	6.68±1.28a	22.38±17.55b	6.18±2.83a	4.88±1.43a	5.95±4.76a
Diastaz Sayısı (DIN)	19.83±4.43e	18.25±1.87de	5.70±1.95a	18.28±2.51de	15.65±3.60cd	17.93±1.62cde	12.88±2.04b	15.38±2.82c
Prolin	896.89±61.88g	597.20±58.11cd	298.70±59.65a	699.67±56.68ef	740.00±94.44f	647.70±38.16de	458.00±50.02b	539.70±90.10c
Asit (mq.g/kg)	29.83±6.05d	16.20±1.55a	16.15±3.22a	28.39±2.95d	28.87±4.78d	16.90±3.01a	20.05±1.19b	23.90±2.81c
İletkenlik (20°C)	0.67±0.25c	0.18±0.01a	0.23±0.08a	0.52±0.04bc	0.89±0.36d	0.21±0.04a	0.46±0.05b	1.11±0.08e
Fruktoz (%)	35.70±2.65b	37.90±2.78c	36.13±1.03b	37.93±0.45c	37.09±2.29bc	37.05±0.90bc	36.93±0.86bc	32.30±1.01a
Glukoz (%)	31.29±3.32b	31.68±2.31b	30.32±0.99b	33.80±0.81c	30.41±4.08b	29.86±0.84b	31.62±1.07b	25.90±0.78a
Sakkaroz (%)	0.18±0.33ab	0.37±0.13ab	3.85±1.23c	0.03±0.05a	0.02±0.06a	0.27±0.12ab	0.56±0.31b	0.21±0.53ab
Turanoz (%)	1.59±0.41cd	1.34±0.08bc	0.91±0.11a	1.13±0.20ab	1.38±0.38bc	2.11±0.21e	1.72±0.26d	1.80±0.39d
Maltoz (%)	1.64±0.53a	2.20±0.24bcd	2.37±0.32cd	1.88±0.52ab	1.99±0.28abc	2.59±0.28d	2.61±0.28d	2.03±0.99abc
Trehaloz (%)	0.00±0.00a	0.01±0.03a	0.06±0.08b	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00a	0.00±0.00
İzomaltoz (%)	1.32±0.96c	0.29±0.07ab	0.01±0.03a	0.26±0.21ab	0.68±0.51b	0.55±0.10b	0.49±0.11ab	2.27±0.95d
Erloz (%)	0.47±0.28b	0.73±0.26b	1.15±0.30c	0.01±0.03a	0.13±0.13a	1.89±0.41d	2.23±0.38e	0.66±0.41b
Melezitoz (%)	0.00±0.00	0.01±0.03	0.04±0.13	0.01±0.03	0.02±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
Maltotrioz (%)	0.18±0.33	0.01±0.03	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.01±0.03	0.00±0.00	0.09±0.28
Fruktoz+Glukoz (%) (DIN)	66.99±5.23b	69.58±5.09bc	66.44±1.97b	71.73±1.18c	67.50±6.12b	66.91±1.66b	68.55±1.69bc	58.20±1.49a
Fruktoz/Glukoz Oranı (DIN)	1.15±0.11ab	1.20±0.01bc	1.19±0.01ab	1.12±0.02a	1.23±0.12c	1.24±0.02c	1.17±0.04ab	1.25±0.04c
Glukoz/Su Oranı (DIN)	1.84±0.24cd	1.86±0.15cd	1.67±0.14ab	1.94±0.05d	1.76±0.29bc	1.83±0.04cd	1.85±0.12cd	1.57±0.06a
Yüksek Şekerler (%)	3.74±2.53c	1.51±0.20a	2.33±0.62ab	1.40±0.29a	3.18±2.26bc	2.29±0.33ab	2.39±0.56ab	9.40±0.71d
Toplam Disakkarit (%)	7.86±1.88bc	6.90±0.26b	9.61±0.90d	5.37±0.40a	7.29±2.66b	8.91±0.34cd	7.86±0.75bc	11.73±1.07e

*: Aynı satırdaki farklı harfler farklı grupları temsil etmektedir (P<0.05).

Bal örneklerinin kristalizasyon davranışında nem, glikoz/su, früktoz/glikoz ile früktoz+ glikoz değerleri önem kazanmaktadır. Bu çalışmada test edilen bal örneklerinde, en düşük nem içeriği geven ve çam ballarında tespit edilirken bunu sırasıyla üçgül, kekik, pamuk, kestane, ayçiçeği ve narenciye balları takip etmiştir. Bu haliyle en yüksek nem içeriği narenciye balında tespit edilmiştir. Balda genel olarak en yüksek oranda bulunan şekerler glikoz ve früktozdur. Bal örneklerinin şeker analizi sonuçları değerlendirildiğinde; en yüksek früktoz içeriği (%) 37.90 ile ayçiçeği balında en düşük früktoz içeriği ise 32.30 ile çam balında belirlenmiştir. Balların glukoz içerikleri 25.90 ile en düşük çam balında 31.68 değeri ile en yüksek narenciye balındadır. Bu anlamda test edilen ballar içerisinde en yüksek glukoz ve früktoz içeriğine sahip bal ayçiçeği balıdır. Balların sakkaroz içerikleri % 4 ün altında olup 0.02-3.85 aralığındadır. Test edilen şeker içeriklerinden turanoz, maltoz, trehaloz, izomaltoz, erloz, melezitoz ve maltotrioz bakımından en düşük ve en yüksek değerler olarak sırasıyla; 0.91-2.11, 1.64-2.61, 0.00-0.06, 0.01-2.27, 0.01-2.23, 0.00-0.04, 0.00-0.18 olarak tespit edilmiştir. Früktoz+glikoz değerleri bakımından en düşük çam balı 58.20, en yüksek ayçiçek (71.73) balıdır. Benzer şekilde Früktoz/glikoz açısından en yüksek değere sahip çam balı en düşük değere sahip bal ise ayçiçeği balıdır. Aynı durum Glikoz/su oranı için de geçerlidir. Balların glikoz/su oranları 1.57-1.94 aralığındadır. Analiz edilen ballar yüksek şekerler açısından değerlendirildiğinde, diğer bal örneklerine göre oldukça yüksek oranda yüksek şeker içeriğine sahip bal çam balı olup bu değer % 9.40 dır. Test edilen diğer balların yüksek şeker içerikleri 1.40-9.40 aralığında değişmektedir. Benzer şekilde en yüksek toplam disakkarit oranına sahip bal diğer ballardan orijin olarak da farklılık gösteren ve bir salgı balı olan çam balıdır. Bu oran çam balında 11.73 iken diğer çiçek ballarında 5.37-8.91 aralığındadır.

Bal örneklerinin 18 ay boyunca her üç ayda bir yapılan biyolojik analizlerinde antioksidan aktivitenin zamanla düştüğü gözlenmiştir (Tablo 3.3, 3.4 ve 3.5). Genel olarak ilk 3 ayda balların antioksidan aktivitesi 130.68- 139.95 mg AAE/g bal arasında değişmiştir. Daha sonraki analiz olan 6. Ayda bu değerler 110.68-131.89 mg AAE/g bal'a gerilemiş en son analiz olan 18. Ay analizlerinde ise balların antioksidan aktivitesinin 56.59-100.78 mg AAE/g bal arasında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Depolama öncesi analizlerde en yüksek antiradikal aktivite kestane balında gözlenmiştir. Bunu ayçiçeği narenciye, pamuk ve üçgül balları takip etmiştir. Bal örneklerinin antiradikal aktivitesi de antioksidan aktivite de olduğu gibi düşme eğilimi göstermiştir. Depolama öncesi yapılan analizlerde bu aktivite 4.73-56.18 arasında iken 18 ay depolama

sonucunda bu değerlerin 2.81-34.39 aralığına gerilediği belirlenmiştir. Aynı zamanda uğer aylık yapılan analizlerde tüm örneklerde zamanla bu düşüş gözlenmiştir.

Tablo 3.3. Bal ęeřitlerinin 0-18 ay arasındaki antioksidant aktivite değişimleri (mg AAE/g bal), Ort.±S.Hata

Bal ęeřitleri	0. ay	6. ay	12. ay	18. ay
Narenciye	136.89±2.79 a	131.89±2.79 b	125.10±4.23 b	56.59±5.81 a
Ayęięeęi	130.68±4.33 a	110.68±4.33 a	88.35±5.35 a	64.88±4.35ab
Kestane	130.79±3.49 a	112.79±3.49 a	96.63±3.08 a	74.57±2.62 b
ğgl	158.93±3.96 b	129.93±3.96 b	99.51±11.26 a	97.49±2.66 c
Pamuk	139.95±4.52 a	118.95±4.52 ab	107.59±9.01 ab	100.78±6.74 c

*: Aynı sütundaki farklı harfler farklı grupları temsil etmektedir (P<0.05)

Tablo 3.4. Bal ęeřitlerinin 0-18 ay arasındaki antiradikal aktivite değişimleri (% inhibisyon), Ort.±S.Hata

Bal ęeřitleri	0. ay	6. ay	12. ay	18. ay
Narenciye	27.07±1.72 b	17.25±2.34 b	8.13±0.36 bc	3.57±0.21 a
Ayęięeęi	56.18±2.88 c	33.18±2.88 c	10.79±1.35 c	10.08±1.03 b
Kestane	71.19±3.98 d	42.05±2.83 d	37.65±1.06 d	34.39±1.69 c
ğgl	4.73±0.51 a	3.73±0.51 a	3.26±0.57 a	2.81±0.28 a
Pamuk	6.67±0.42 a	5.67±0.42 a	5.48±1.84 ab	5.04±0.30 a

*: Aynı sütundaki farklı harfler farklı grupları temsil etmektedir (P<0.05)

Tablo 3.5. Bal ęeřitlerinin 0-18 ay arasındaki toplam fenolik madde değişimleri (mg GAE/100 g bal), Ort.±S.Hata

Bal ęeřitleri	0. ay	6. ay	12. ay	18. ay
Narenciye	94.45±2.57 c	29.99±1.97 a	25.54±2.32 b	21.04±2.49 ab
Ayęięeęi	69.08±3.52 b	63.08±3.52 b	57.60±2.84 c	30.92±2.78 b
Kestane	156.86±3.82 d	153.92±7.37 c	97.23±6.01 d	74.17±8.92 c
ğgl	38.34±1.77 a	23.34±1.77 a	8.51±0.56 a	7.96±0.62 a
Pamuk	38.99±5.08 a	36.99±5.08 a	35.96±3.52 b	25.05±2.79 b

*: Aynı sütundaki farklı harfler farklı grupları temsil etmektedir (P<0.05)

Depolama öncesi yapılan analizlerde test edilen bal örnekleri içerisinde en yüksek fenolik madde içeriğine kestane balının sahip olduğu görülmüştür. Bunu narenciye, ayçiçeği pamuk ve üçgül balları takip etmiştir. Test edilen diğer biyolojik aktivitelerde olduğu gibi test edilen bal örneklerinin 18 ay süresince depolama boyunca toplam fenolik madde miktarında düşme görülmüştür. Bal örneklerinin 0, 6, 12 ve 18. Aylarda toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 38.34-156.86, 23.34-153.92, 8.51-97.23 ve 7.96-74.1 arasında düşme eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre depolama öncesinde bal örnekleri biyoaktif özellikleri bakımından değerlendirildiğinde, kestane balı toplam fenolik madde ve antiradikal bakımından üçgül balı da antioksidant aktivite bakımından en yüksek değerlere sahiptir. Bununla birlikte 18 ay süresince tüm örneklerin biyolojik aktivitesinde düşme gözlenmiştir.

Farklı ambalaj materyalinde depolanan balların biyolojik özelliklerinin belirlendiği araştırmada, plastik ve cam olmak üzere iki farklı ambalaj kullanılmıştır (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. Farklı sıcaklık ve saklama koşullarında depolanan balların biyolojik özellikleri (Ort.±S. Sapma)

Depolama Koşulları	Depolama sıcaklığı	Toplam fenolik madde (mg GAE/g bal)	Antiradikal aktivite (% inhibisyon)
Cam	4 °C	11.19±0.13	17.34±2.11
Plastik	4 °C	10.53±0.43	16.77±0.78
		-*	-
Cam	25°C	12.92±0.26	9.84±0.98
Plastik	25°C	12.74±0.24	7.76±0.61
		-	-
Cam	65°C	12.24±0.24	17.23±1.67
Plastik	65°C	11.54±0.32	15.47±0.99
		-	-

*: Gruplar arasındaki fark önemsiz (P>0.05)

Farklı sıcaklıklarda ve farklı depolama ambalajlarında depolanan ballar üç ay boyunca takip edilmiş ve biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Tüm örneklerde cam ambalajda depolanan balların daha yüksek toplam fenolik madde ve antiradikal aktiviteye sahip olduğu belirlense de bu farklılık istatistik olarak önemli bulunmamıştır (P>0.05). Örneğin test edilen 4 °C de depolanan bal örneğinde toplam fenolik madde miktarı ortalama 11.19 iken aynı sıcaklıkta plastik ambalajda depolanan bal örneği için bu değer 10.53 mg GAE/g bal olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde 25 ve 65 °C de depolanan örneklerde de cam ambalajda

depolanan örneklerin toplam fenolik madde miktarı plastik ambalajda depolananlardan rakamsal olarak daha yüksektir. Farklı sıcaklıkların toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisine bakıldığında ise istatistik olarak önemli farklılık belirlenmemiştir. Ancak bal örneklerinin 25 °C de en yüksek fenolik madde miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Antiradikal aktivite bakımından ise 4 ve 65 °C de depolanan örneklerin antiradikal aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte tüm sıcaklıklarda istatistik olarak önemli olmamakla birlikte cam ambalajda depolanan balların daha yüksek antiradikal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bal örneklerinin fenolik kompozisyonu tespit edilmiştir (Tablo 3.7.). Bal örneklerinin analizinde 20 fenolik standart kullanılmakla birlikte sadece 9 fenolik tespit edilmiştir. Araştırmada şu flavonodiler kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmiştir; gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, kumarik asit, ferulik asit, kateşin, epikateşin, kuersetin ve pinosembrin. Salgı ballarında toplam fenolik madde miktarı 72.6 mg/kg tespit edilirken çiçek ballarında 161.71 mg/kg olarak belirlenmiştir. Kuersetin ve pinosembrin salgı ballarında tespit edilmezken çiçek ballarında mevcuttur. Bununla birlikte salgı ballarında kateşin ve epikateşin toplam fenolik madde içeriğine göre (% 53) en yüksek oranda tespit edilen flavonoidler olmuştur.

Gallik asit salgı ballarında 0.11-2.95 mg/kg aralığında tespit edilmekle birlikte tüm salgı ballarında tespit edilmiştir. Kateşin bir örnek dışında tüm salgı ballarında mevcuttur ve 1.19-8.45 aralığındadır. Test edilen örneklerin % 50 sinde tespit edilmeyen kafeik asit 0.05-0.21 aralığında belirlenmiştir. Test edilen diğer fenolik bileşikler arasında epikateşin, kumarik ve ferulik asitler test edilen örneklerin sadece ikisinde belirlenmemiş olup, örneklerde bulunma aralığı sırasıyla 0.91-2.38, 0.50-3.67 ve 0.12-0.24 mg/kg aralığındadır. Kuersetin ve pinosembrin ise salgı ballarının hiç birinde tespit edilmemiştir.

Çiçek ballarında kumarik asit sadece bir ferulik asit ise sadece iki örnekte rastlanmamıştır ve örneklerde bulunma aralığı sırasıyla 0.44-11.96 ile 0.09-0.41 mg/kg dır. Bunun dışında gallik asit, kateşin, klorojenik asit, kafeik asit, epikateşin ve kuersetin sırasıyla 0.21-2.95, 0.31-5.80, 0.04-28.34, 0.04-2.65, 0.28-7.00 ve 0.21-3.58 aralığında tespit edilmiştir. test edilen 25 örneğin 9 unda bulunmayan pinsembrin ise 0.1-0.69 mg/kg aralığında belirlenmiştir.

Tablo 3.7. Çiçek ve salgı ballarının fenolik madde kompozisyonu

Bal Çeşidi	Örnek Sayısı	Gallik asit	Kateşin	Klorojenik asit	Kafeik asit	Epikateşin	Kumarik asit	Ferulik asit	Kuersetin	Pinosembrin
Salgı	1	0.94	3.21	0.08	-	-	-	-	-	-
	2	0.32	2.18	-	-	-	2.14	0.15	-	-
	3	2.83	-	-	-	1.08	0.50	0.24	-	-
	4	0.11	1.19	0.95	-	2.38	3.67	0.15	-	-
	5	2.95	2.59	2.50	-	1.19	-	-	-	-
	6	1.14	2.90	-	0.11	1.47	2.27	0.13	-	-
	7	0.31	1.19	0.08	0.05	0.84	2.17	0.24	-	-
	8	1.16	1.55	0.16	0.05	2.17	2.75	0.23	-	-
	9	0.21	3.26	0.14	0.21	0.91	1.67	0.12	-	-
	10	1.43	8.45	0.11	0.10	1.96	1.47	0.24	-	-
Çiçek	1	0.53	0.41	10.77	0.11	-	2.27	0.13	-	-
	2	0.24	-	-	-	-	-	0.34	2.27	0.69
	3	-	5.80	-	0.10	0.28	2.06	0.13	-	-
	4	-	1.09	0.06	0.04	-	2.72	-	0.24	-
	5	1.22	2.23	0.04	0.04	-	0.44	0.25	-	-
	6	2.95	-	28.34	2.65	6.58	11.96	0.21	3.58	-
	7	0.22	1.92	-	0.13	3.83	4.23	0.11	0.30	0.31
	8	0.21	-	-	-	4.69	3.64	0.15	0.38	-
	9	-	-	0.30	-	7.00	3.36	0.46	0.22	0.24
	10	1.18	-	-	0.14	-	3.64	0.24	0.87	0.22
	11	1.09	0.31	-	0.04	2.66	1.08	0.35	-	0.14
	12	0.63	-	-	0.17	2.66	2.01	0.09	0.21	-
	13	0.59	3.01	0.10	0.30	0.98	1.15	-	0.28	-
	14	0.21	2.02	0.12	0.53	1.47	3.22	0.32	1.69	0.10
	15	0.09	1.04	0.13	0.25	1.05	2.43	0.24	0.19	-

(-): Tespit edilmedi

Bal örneklerinin farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyel etkinliği test edilmiştir. % 25 konsantrasyonda hiç bir bal örneği test edilen mikroorganizmalar üzerinde aktivite göstermemiştir (Tablo 3.8.). Bununla birlikte etkili konsantrasyonun % 75 olduğu görülmüştür. *A.hydrophyla*'ya etkinlik gösteren tek bal örneğinin kekik balı olduğu ve % 75 konsantrasynda etkili olduğu belirlenmiştir. Bal örnekleri % 50 ve 75 konsantrasyonlarda *P. mirabilis*'e karşı etkinlik göstermekle birlikte en yüksek etkinlik 0-14 mm aralığındadır. *E.coli*'ye karşı sadece iki bal örneği (salğı ve geven balları) % 75 konsantrasynda etkinlik göstermiştir. *S. typhimurium* bal örneklerine karşı en hassas suşlardan biri olduğu belirlenmiştir. Bal örnekleri % 50 ve 75 konsantrasynda bu mikroorganizmaya karşı etkinlik göstermekle birlikte aktivite 0-8 mm aralığında tespit edilmiştir. Gram pozitif bakterilerden biri olan *S. aureus*'a karşı salğı balı dışında tüm ballar aktivite göstermiştir ve inhibisyon zon aralığı 0-8 mm aralığındadır. Test edilen bal örneklerinden sadece kestane ve geven balı *B. subtilis*'e karşı etkili bulunmuştur. Bal örneklerinin en etkili olduğu mikroorganizmalardan biri de *B. cereus*'tur. Bal örneklerinin bu bakteriye karşı inhibisyon zon arlığı 0-7 mm dir. Test edilen son mikroroganizma olan *P. aeruginosa* 'ya karşı tespit edilen inhibisyon zon aralığı 0-6 mm dir. Sonuç olarak test edilen mikroorganizmalardan *S.typhimurium*, *S. aureus* ve *B. cereus* bal örneklerine karşı en hassas bakteriler iken *P. mirabilis*, *E.coli*, *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* dirençli bakteriler olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.8. Bal örneklerinin antimikrobiyel aktivitesi (inhibisyon zon aralığı, mm)

Örnek	Konsantrasyon (%)	A. hydrophyla	P. mirabilis	E. coli	S. typhimurium	S. aureus	B. subtilis	B. cereus	P. aeruginosa
Kestane	50	0	0	0	0	0-6	0	0	0
	75	0	0-9	0	0-6	0-8	0-6	0-6	0-6
Salgı	50	0	0	0	0	0	0	0-6	0
	75	0	0	0-6	0-8	0	0	0-7	0
Kekik	50	0	0-6	0	0-5.5	0	0	0	0
	75	0-6	0-14	0	0-8	0-6	0	0-6	0
Geven	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	75	0	0-	0-6	0	0-8	0-8	0-6	0-6
Üçgül	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	75	0	0	0	0-5	0-6	0	0-6	0-6
Narenciye	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	75	0	0	0	0-5	0-6	0	0-6	0-6
Pamuk	50	0	0	0	0	0	0	0	0
	75	0	0	0	0-5	0-6	0	0-6	0

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Avrupa'da 100'den fazla monofloral bal tipi olduğu bilinmektedir (Oddo ve Piro, 2004). Türkiye'de de zengin florası sayesinde çok sayıda monofloral bal üretmek mümkün olmaktadır. Ayçiçeği, narenciye, üçgül, kestane, ıhlamur, püren, kekik, geven ve çam balı bunlardan sadece bazılarıdır. Balın temel komponentleri olan şekerler daha çok botanik ve coğrafik orijine daha az oranda ise hava, işleme ve depolama koşullarına bağlıdır (Dobre ve ark., 2012; Marghitas ve ark., 2009).

Balın kristalizasyonu pazar değeri açısından büyük önem taşımaktadır. Nitekim karasal iklimlerde çoğu bal normal depolama sıcaklıklarında bile kristalize olabilmektedir. Balların büyük çoğunluğu glikoz ile süperdoymuş (supersature) solusyonlardır ve bu şeker oda sıcaklığında (20 °C) kendiliğinden glikoz-monohidrat formuna kristalize olabilmektedir. Balın kristalize olma hızı sadece kompozisyonuna bağlı değildir, aynı zamanda baldaki tohum kristalleri polen tanecikleri ve mum parçacıkları gibi katalistlerin varlığına da bağlıdır. Bu minik partiküller kristalizasyon için nukelus vazifesi görürler. Ham bal (ısıtılmamış ve filtre edilmemiş) küçük miktarda mum, polen, propolis içerir ve daha hızla kristalize olur. İşlem görmüş bal (yani ısıtılmış ve filtre edilmiş) nukleusların eliminasyonu nedeniyle ham bala göre daha uzun süre sıvı formda kalır. Marketler için ticari olarak hazırlanmış bal genelde ısıtılmış ve filtre edilmiştir. Isıtma ve filtrasyon şeker kristallerini çözer ve olası yabancı partikülleri uzaklaştırır. Böylece kristalizasyon engellenmiş olur (Hamdan, 2010)

Bal örneklerinin kristalizasyon davranışında nem, glikoz/su, früktoz/glikoz ile früktoz+glikoz değerleri önem kazanmaktadır. Bu araştırmada test edilen bal örneklerinde, en düşük nem içeriği geven ve çam ballarında tespit edilirken bunu sırasıyla üçgül, kekik, pamuk, kestane, ayçiçeği ve narenciye balları takip etmiştir. Bu haliyle en yüksek nem içeriği narenciye balında tespit edilmiştir. Balda genel olarak en yüksek oranda bulunan şekerler glikoz ve früktozdur. Araştırmamızda kekik, üçgül, narenciye, ayçiçek, kestane, geven, pamuk ve çam ballarının früktoz içeriği sırasıyla % 35.70, 37.90, 36.13, 37.93, 37.09, 37.05, 36.93 ve 32.30 olarak tespit edilmiştir. Üçgül balı en yüksek früktoz içeriğine sahipken çam (salgı) balı en düşük früktoz içeriğine sahiptir. Bu araştırmada test edilen monofloral balların hepsinde früktoz baskındır, yani glikoz dahil diğer şekerlerden fazla miktardadır. Escuredo ve ark. (2014) yaptığı araştırmada kolza balında glikoz oranı früktozdan yüksek bulunmuştur. Yine bu araştırmada akasya balı en yüksek früktoz konsantrasyonuna sahip olup (% 42.3) bu değer bramble, kestane, ökaliptus ve salgı ballarından yüksek bulunmuştur. Salgı balının

fruktoz içeriği oldukça düşük bulunmuştur (% 32.9). Benzer şekilde araştırmamızda da salgı balının früktoz içeriği diğer ballardan daha düşük bulunmuştur (% 32.30).

Araştırmamızda kekik, üçgül, narenciye, ayçiçek, kestane, geven, pamuk ve çam ballarının glikoz içeriği sırasıyla % 31.29, 31.68, 30.32, 33.80, 30.41, 29.86, 31.62 ve 25.90 olarak tespit edilmiştir. Ayçiçek balı en yüksek glikoz içeriğine sahip olarak tespit edilmiştir. Benzer şekilde Escuredo ve ark. (2014) nın yaptığı araştırmada ayçiçeği ve kolza ballarının glikoz içeriği diğer ballara göre önemli oranda yüksek bulunmuştur ve en az glikoz içeriği salgı balında tespit edilmiştir. Nitekim glikoz içeriği % 30 un altında olan balların yavaş granulasyon özelliği gösterdiği bildirilmektedir (Manikis ve Thrasivoulou, 2001). Escuredo ve ark. (2014) nın yaptığı araştırmada salgı balı, kestane, püren, bramble ve akasya ballarının yavaş kristalize olduğu ayçiçeği, ihlamur ve kolza ballarının ise hızlı kristalizasyon özelliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Bu araştırmada test edilen kekik, üçgül, narenciye, ayçiçek, kestane, geven, pamuk ve çam ballarının sakkaroz içeriği sırasıyla 0.18, 0.37, 3.85, 0.03, 0.02, 0.27, 0.56 ve 0.21 tespit edilmiştir. Başka bir araştırmada akasya balının sakkaroz içeriği en yüksek (% 2.30) iken kestane ve ökalıptus ballarının (% 0.2) en düşüktür ve aradaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur (Escuredo ve ark., 2014). Oddo ve Piro (2004) ayçiçeği balının hızlı bir şekilde kristalize olmasını yüksek glikoz içeriğine, kestane balının uzun süre sıvı formda kalmasını ise yüksek fruktoz ve düşük glikoz içeriğine atfetmişlerdir. Püren balının diğer balara göre orta kristalizasyon değeri göstermektedir. Bu varyasyonun her ne kadar yüksek oranda polenle temsil edilse de sekonder katkı nedeniyle olabileceğini nitekim kestane, ökalıptus ve hatta salgı ballarının bal arıları tarafından tercih edilen temel bal kaynakları olduğu bildirilmiştir.

Genel olarak çiçek ballarındaki temel oligosakkaritler ve disakkaritler, sakkaroz, maltoz, trehaloz ve turanoz iken salgı ballarında melezitoz, erloz ve rafinoz gibi oligosakkaritler daha yüksek miktarda bulunmaktadır (Földházi, 1994). Salgı balının önemli markör bileşiklerinden biri olan melezitoz bu araştırmada diğer ballardan daha yüksek oranda belirlenmemiştir. Nitekim başka araştırmalarda diğer şekerler açısından en yüksek maltoz içeriği bramble balında (% 2.9) melezitoz içeriği ise bramble (% 0.21), kestane (% 0.1) ve salgı (% 0.14) ballarında belirlenmiştir. Bununla birlikte Fas (Terrab ve ark., 2003), Romanya (Dobre ve ark., 2012) ve Hırvatistan yada Makedonya (Primorac ve ark., 2009) salgı ballarında yüksek melezitoz içeriğinin tespit edilmesi bu bal için markör olarak değerlendirilmesini sağlamıştır.

Kekik, üçgül, narenciye, ayçiçek, kestane, geven, pamuk ve çam ballarının glikoz+früktoz değeri sırasıyla 66.99, 69.58, 66.44, 71.73, 67.50, 66.91, 68.55, ve 58.20 olarak tespit edilmiştir. En düşük glikoz+früktoz değerine sahip bal çam balı olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde başka araştırmalarda da salgı balının glikoz+früktoz içeriği de diğer ballardan düşük bulunmuştur. Salgı balının minör şeker içeriğine sahip olduğu başka araştırmacılar tarafından da rapor edilmiştir (Bentabol ve ark., 2011; Escuredo ve ark., 2013). Escuredo ve ark. (2014) früktoz+glikoz değeri açısından kolza ve ayçiçeği balları en yüksek değere sahip olduğunu (% 75 üzeri) salgı balının ise en düşük monosakkarit konsantrasyonuna sahip (% 56.1) olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar araştırmamızla uyumlu bulgulardır. Genelde çiçek balları % 60 ın üzerinde F+G değerine sahipken salgı ballarında bu değer % 60 ın altında tespit edilmektedir. Nitekim European Legislation ve Codeks standartlarında belirtildiği gibi bu değer çiçek ve salgı ballarının ayırımında kullanılan bir değerdir.

Fruktoz/ glikoz (F/G) oranı balın granülasyonunu açıklamak için önerilen bir orandır, çünkü glikoz fruktoza göre daha az suda çözünmektedir ve bu nedenle balın kristalizasyon eğilimini en iyi tahmin eden parametre olarak görülmektedir (Laos ve ark., 2011). Bu araştırmada kekik, üçgül, narenciye, ayçiçek, kestane, geven, pamuk ve çam ballarının F/G değeri sırasıyla 1.15, 1.20, 1.19, 1.12 1.23, 1.24, 1.17 ve 1.25 olarak belirlenmiştir. F/G oranı 1.14 ve altı hızlı kristalizasyon 1.58 üzeri değer ise balın kristalizasyon eğilimi olmadığını (Venir ve ark., 2010) ve 1.3 değeri ise yavaş kristalizasyon olacağını göstermektedir (Dobre ve ark., 2012). Nitekim araştırmamızda 1.14'ün üzerinde F/G oranına sahip olan ayçiçeği ve narenciye balları hızlı kristalizasyon eğilimi gösteren ballardır. Başka bir çalışmada F/G oranı ayçiçeği, kolza ve ihlamur için 1.02, 1.13 ve 1.17 bulunmuştur (Escuredo ve ark., 2014).

Araştırmamızda kekik, üçgül, narenciye, ayçiçek, kestane, geven, pamuk ve çam ballarının glikoz/su (G/W) değeri sırasıyla 1.84, 1.86, 1.67, 1.94, 1.76, 1.83, 1.85 ve 1.57 olarak tespit edilmiştir. National Honey Board'a (2010) göre balın kristalizasyon zamanı çoğunlukla F/G ile G/W oranına bağlıdır. Bu nedenle nem balın üretildiği bölgedeki üretim sezonu ve meteorolojik faktörlerin hesaba katıldığı diğer bir faktördür (Escuredo ve ark., 2013). Su içeriği balın fiziksel özelliklerini (viskozite, kristalizasyon, reolojik davranış gibi) etkilediği gibi görünüş, renk, lezzet, tat, spesifik gravite, çözünürlük, muhafaza ve sonuçta da ticari değerini etkileyen bir faktördür. Escuredo ve ark. (2014) araştırmalarında en yüksek nem içeriğini % 22.4 oranla ayçiçeği balında gözlemişlerdir. Ayrıca kestane ve salgı ballarının ortalama G/W oranı 1.5 iken kolza balının 2.0 olarak rapor etmişlerdir. Bazı

araştırmacılar G/W oranının balın kristalizasyonunu tahmin etmek için en iyi indikatör olduğunu bildirmişlerdir (Dobre ve ark., 2012; Manikis ve Thrasivoulou, 2001). Yüksek glikoz ve düşük su içeriğine sahip ballar daha hızlı kristalize olmaktadır. Literatüre göre G/W oranı 1.7 den daha az olduğunda kristalizasyon daha yavaş ya da sıfırdır. 2.0 den yüksek olduğunda ise tam ve hızlıdır (Dobre ve ark., 2012). Escuredo ve ark. (2014) kolza, ayçiçeği ve ihlamur ballarının F+G ile G/W oranları birbirine yakın olduğunu tespit etmişler ve bu balların hızlı kristalize olduğunu rapor etmişlerdir.

Yapılan araştırmalara göre; botanik orijin balın şeker içeriği ile kristalizasyon üzerine büyük etkiye sahiptir. Fruktoz, glikoz ve nem içeriği ile şeker oranlarının (F+G, F/G ve G/W oranları) balda kristalizasyon fenomenini en iyi tahmin eden indikatörlerdir. Escuredo ve ark. (2014) kolza ve ayçiçeği ballarının en yüksek indirgenmiş şeker (F+G) içeriğine sahipken salgı ballarında bu değer en düşük olduğunu, yüksek glikoz içeriği ile düşük F/G oranına sahip kolza ve ayçiçeği gibi balların hızla kristalize olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yüksek F/G oranına sahip (% 30 dan az glikoz) bramble, kestane, ökaliptus, püren, akasya ve salgı ballarının yavaş kristalize olduğunu rapor etmişlerdir. Hamdan (2010) ise yonca, ayçiçeği, pamuk gibi balların hızlı kestane, kekik ve narenciye ballarının yavaş, geven balını ise çok yavaş kristalize olduğu bildirmişlerdir.

Balın kristalizasyonu tüketici tarafından çok iyi anlaşılammıştır. Bazıları kristalize olmuş balı hileli ya da doğal olmayan ürün olarak nitelendirmektedir. Oysa kristalizasyon prosesi doğaldır ve kendliğinden oluşmaktadır. Saf, ham ya da ısıtılmamış balların çoğu zamanla kristalizasyona doğal eğilim göstermektedir. Kristalizasyonun renk ve tekstür dışında balı etkilemediği bildirilmektedir (Hamdan, 2010). Bu araştırmada farklı sıcaklıklarda ve farklı depolama ambalajlarında depolanan ballar üç ay boyunca takip edilmiş ve biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Tüm örneklerde cam ambalajda depolanan balların daha yüksek toplam fenolik madde ve antiradikal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bogdanov (2008) a göre bal depolama kapları alüminyum, paslanmaz çelik ya da plastik materyalden yapılmalı, korozif metal kaplar asiditeye dayanıklı uygun kaplama materyali ile kaplanmalıdır.

Farklı sıcaklık koşulları değerlendirildiğinde ise oda sıcaklığında depolanan (25 °C) bal örneklerinin fenolik madde miktarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Antiradikal aktivite bakımından ise 4 ve 65 °C de depolanan örneklerin antriadikal aktivitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örneğin 4 ve 65 °C de cam kapta depolanan örnekte aktivite sırasıyla % 17.34 ve 17.23 iken 25 °C de depolanan örnekte bu değer % 9.84 olarak belirlenmiştir.

Bal optimum koşullarda depolandığında uzun süre saklanabilmektedir. Balın koku ve nem nedeniyle oluşacak zararı önlemek için hava geçirmez konteynırlarda depolanması gerektiği ve depolama için optimum sıcaklığın 10-16 °C olduğu bildirilmiştir (Bogdanov, 2008). Hamdan (2010) ise balın kristalizasyonunun 10-15 °C de (50-59 °F) civarında en hızlı olduğunu. 10 °C nin altındaki sıcaklıklarda kristalizasyonun yavaşladığını bildirmiştir. Ayrıca düşük sıcaklık balın viskozitesini artırmaktadır (bal soğuduğunda kalınlaşır) ve bu durum kristallerin formasyonu ve difüzyonunu geciktirmektedir. Bal 25 °C den daha yüksek sıcaklıklarda kristalizasyona en iyi direnmekte, sıcaklık 40 °C olduğunda kristaller çözülmemektedir (Hamdan, 2010). Yüksek sıcaklıklarda ısıtma, pastörizasyon: bazı ülkelerde bal kristal ve mayaları yok edecek şekilde pastörize edilmektedir. Ticari pastörizasyon 70-78 °C de birkaç dakika flash-heating (hızlı ısıtma) yapıp sıcaklık hasarını minimize etmek için hızla soğutulmalıdır. Patörizasyondan sonra HMF içeriği ve diastaz aktivitesi aynı kalmakta ancak invertaz enzimi zarar görmektedir (Tabouret ve Mathlouth, 1972; Gonnet, 1975). Balın kristalizasyonu için optimum sıcaklık 10-18 °C arasında iken 14 °C sabit sıcaklık optimaldir. Düşük sıcaklıklarda kristalizasyon yavaşlar. Derin dondurucuda (deep freeze) ballar uzun süre sıvı halde kalabilir. Kolza balı gibi çok hızlı kristalize olan ballar fine (ince) kristalizasyon formundadır. Yüksek sıcaklıkta (25 °C den fazla) kristalizasyon yavaşlar. Bu sıcaklıklarda bal kaba kristal tekstüründedir. % 15-18 arasında su içeriğine sahip ballar optimal kristallenme olur. Bunun altı ve üstü değerlerde daha yavaş kristalizasyon olur. En iyi yayılma % 17-18 arasında su içeriğine sahip ballarda olur. Düşük su içeriğine sahip ballar sert Kristal tekstürüne sahiptir % 18 den yüksek olanlar daha yumuşak kalır (Bogdanov, 2008)

Bal örneklerinin fenolik kompozisyonu tespit edilmiştir. Bal örneklerinin analizinde 20 fenolik standart kullanılmakla birlikte sadece 9 fenolik tespit edilmiştir. Araştırmada şu flavonodiler kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilmiştir; gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, kumarik asit, ferulik asit, kateşin, epikateşin, kuersetin ve pinosembriin. Salgı ballarında toplam fenolik madde miktarı 72.6 mg/kg tespit edilirken çiçek ballarında 161.71 mg/kg olarak belirlenmiştir. Kuersetin ve pinosembriin salgı ballarında tespit edilmezken çiçek ballarında mevcuttur. Bununla birlikte salgı ballarında kateşin ve epikateşin toplam fenolik madde içeriğine göre (% 53) en yüksek oranda tespit edilen flavonoidler olmuştur. Araştırma sonuçlarımız Polonya balları için rapor edilen sonuçlarla uyumludur (Socha ve ark., 2009). Araştırmanın bu kısmından elde edilen sonuçlar kristalizasyon açısından geç kristallenme özelliği gösteren salgı balları ile salgı ballarına göre daha hızlı kristalize olan çiçek balları arasında fenolik madde açısından farklılıkları göstermiştir. Nitekim salgı ve nektar ballarının

fenolik madde profile birbirinden farklı göstermiştir. Tanımlanan fenolik maddeler arasında gallik, ferulik ve kumarik asitler test edilen bal örneklerinin çoğunda tespit edilmiştir, ancak bireysel olarak her iki bal tipinin kalitatif ve kantitatif olarak fenolik madde içeriği arasında önemli farklılık belirlenmiştir.

Bal örneklerinin farklı konsantrasyonlarda antimikrobiyel etkinliği test edilmiştir. % 25 konsantrasyonda hiç bir bal örneği test edilen mikroorganizmalar üzerinde aktivite göstermemiştir. Bununla birlikte etkili konsantrasyonun % 75 olduğu görülmüştür. *A. hydrophyla*'ya etkinlik gösteren tek bal örneğinin kekik balı olduğu ve % 75 konsantrasyonda etkili olduğu belirlenmiştir. Bal örnekleri % 50 ve 75 konsantrasyonlarda *P. mirabilis*'e karşı etkinlik göstermekle birlikte en yüksek etkinlik 0-14 mm aralığındadır. *E.coli*'ye karşı sadece iki bal örneği (salgı ve geven balları) % 75 konsantrasyonda etkinlik göstermiştir. *S. typhimurium*'un bal örneklerine karşı en hassas suşlardan biri olduğu belirlenmiştir. Bal örnekleri % 50 ve 75 konsantrasyonda bu mikroorganizmaya karşı etkinlik göstermekle birlikte aktivite 0-8 mm aralığında tespit edilmiştir. Gram pozitif bakterilerden biri olan *S. aureus*'a karşı salgı balı dışında tüm ballar aktivite göstermiştir ve inhibisyon zon aralığı 0-8 mm aralığındadır. Test edilen bal örneklerinden sadece kestane ve geven balı *B. subtilis*'e karşı etkili bulunmuştur. Bal örneklerinin en etkili olduğu mikroorganizmalardan biri de *B. cereus*'tur. Bal örneklerinin bu bakteriye karşı inhibisyon zon aralığı 0-7 mm dir. Test edilen son mikroroganizma olan *P. aeruginosa* 'ya karşı tespit edilen inhibisyon zon aralığı 0-6 mm dir. Sonuç olarak test edilen mikroorganizmalardan *S.typhimurium*, *S. aureus* ve *B. cereus* bal örneklerine karşı en hassas bakteriler iken *P. mirabilis*, *E.coli*, *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* dirençli bakteriler olarak belirlenmiştir.

5. KAYNAKLAR

- Alissandrakis E, Daferera D, Tarantalis P, Polissiou M, Harizanis PC. 2003. "Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey", *Food Chemistry*, 82 (4): 575-582.
- Anklam E. 1998. "A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey". *Food Chemistry*, 63 (4): 549-562.
- Anonim, 2004. Türkiye'ye Özgü Beslenme Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü ve Hacettepe Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara.
- ANZFA. 1998. "Honey and related products", Part K2 (13-200). In: The Australia New Zealand Food Authority Act 1991. Commonwealth of Australia.
- Arcot J, Brand-Miller. 2005. "A preliminary assessment of the glycemic index of honey". *Australian Government Rural Industries Research and Development Corporation*. <https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/05>. Son erişim tarihi: 19 Şubat 2014.
- Assil, HI., Sterling, R., Sporns, P. 1991. Crystal control in processed liquid honey. *Journal of Food Science*, 56 (4): 1034.
- Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, SJ., Das, DK., Ray, SD., Kuszynski, CA., Joshi, SS., Pruess, HG. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 148: 187-197.
- Bentabol, MA., Hernandez, GZ., Rodriguez, GB., Rodriguez, RE. 2011. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. *Food Chemistry*, 126: 664-672
- Beuchat, LR. 1983. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *J. Food Protection*, 46: 135-141.
- Bhandari, B., D'Arcy, B., Kelly, C. 1999. Rheology and Crystallization Kinetics of Honey: Present Status. *Int. J. Food Prop.*, 2: 217-226.
- Bhandari, BR., Hartel, RW. 2002. Co-crystallization of sucrose at high concentration in the presence of glucose and fructose. *Journal of Food Science*, 67 (5): 1797-1802.
- Bianchi, F., Careri, M., Musci, M. 2005. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 89: 527-535.

- Bogdanov, S. 2004. "Honey composition", Bee Hexagone. <http://www.bee-hexagon.net/en/honey.htm>, *Son erişim tarihi: 19 Şubat 2014*.
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., 2008. "Honey for nutrition and health: a review", *The Journal of the American College of Nutrition*, 27: 677-89.
- Bonvehi, JS. 1989. Estudio de la validez de los indices que predicen la cristalización de la miel. *Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 29 (1): 47-62.
- Bouseta, A. Collin, S. 1995. Optimized Likens-ickerson methodology for quantifying honey flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 1890-1897.
- Bouseta, A., Collin, S., Dufour, JP. 1992. Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic headspace GC-MS system, *Journal of Apicultural Research*, 31 (2): 96-109.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, ME., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
- Bubnik, Z., Kadlec, P., Urban, D., Bruhns, M. 1995. Sugar Technologists Manual. 8th Edition, Germany: Bartens.
- Cavia, MM, Fernandez-Muino, MA., Alonso-Torre, SR, Huidobro, JF., Sancho MT. 2007. Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. *Food Chemistry*, 100: 1728–1733
- Cavia, MM., Fernandez-Muino, MA., Gomez-Alonso, E., Montes-Perez, MJ., Huidobro, JF., Sancho, MT. 2002. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. *Food Chemistry*, 78: 157-161.
- Cavia, MM., Fernandez-Muino, MA., Huidobro, JE., Sancho, MT. 2004. Correlation between moisture and water activity of honeys harvested in different years. *Journal of Food Science*, 69 (5): 368–370.
- Chandler, BV., Fenwick, D., Orlova, T., Reynolds, T. 1974. Composition of Australian honeys. CSIRO Australian Division of Food Research and Technology. Paper No. 38, 1-39.
- Chirife, J., Buera, MP. 1997. A simple model for predicting the viscosity of sugar and oligosaccharide solutions. *Journal of Food Engineering*, 33: 221-226.
- Conforti, PA., Lupano, CE., Malacalza, NH., Arias, V., Castells, CB. 2006. Crystallization of honey at -20 °C. *International Journal of Food Properties*, 9: 99–107.
- Council Directive 2001/110/EC of the 20 December 20012 relating to honey (2002). Official Journal of the European 334 Communities. L10 47-52.
- Crane, E. 1976. Honey, A comprehensive survey, International Bee Research Association.

- London: Heinemann.
- Crane, E. 1980. Constituents and characteristics of honey, Chapter 3. In: A Book of Honey. Oxford University Press, Melbourne, p. 40-65.
- Cuevas- Glory, LF., Pino, JA., Santiago, LS., Sauri-Duch, E. 2007. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 103(3): 1032-1043.
- D’Arcy, B., Caffin, N., Bhandari, B., Squires, N., Fedorow, P., Mackay, D. 1999. “Australian liquid honey in commercial bakery products”. *Australian Government Rural Industries Research and Development Corporation*. <https://rirdc.infoservices.com.au/.../99-145>
- De la Fuente, E., Martinez-Castro I., Sanz, J. 2005. Characterisation of Spanish unifloral honeys extractives. 1 Noroisoprenoids, monoterpenes, and others natural volatiles from. *Journal of Separation Science*, 28: 1093-1100.
- Dobre, I., Georgescu, LA., Alexe, P., Escuredo, O., Seijo, MC. 2012. Rheological behavior of different honey types from Romania. *Food Research International*, 49: 126–132.
- Duncan, DB. 1975. T tests and intervals for comparisons suggested by the data. *Biometrics*, 31: 339-59.
- Dyce, EJ. 1979 Producing finely granulated or creamed honey. In: Honey: A Comprehensive Survey (Crane, E., ed) Heinemann, London, UK, 293-306.
- English, R., Lewis, J. 1991. “Nutritional Values of Australian Foods”, Canberra, Australian Government Publishing Service.
- Ergün, A., Tuncer, ŞD., Çolpan, I., Yalçın, S., Yıldız, G., Küçükersan, MK., Küçükersan, S., Şehu, A. 2004. Yemler, yem hijyeni ve teknolojisi. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları ABD, 448 sayfa, Ankara.
- Escuredo, O., Míguez, M., Fernandez-Gonzalez, M., Seijo, MC. 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chem.*, 138: 851–856.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., Carmen, SM. 2014. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149: 84–90.
- Ferrerres, F., Andrade, P., Gil, MI., Tomas-Barberan, FA. 1996 Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 202: 40-44.
- Földházi, G. 1994. Analysis and quantitation of sugars in honey of different botanical origin

- using high performance liquid chromatography. *Acta Alimentaria*, 23(3): 299–311.
- Frankel, GE. Robinson, Berenbaum, MR. 1998. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research* 37: 27–31.
- Gebetta, B., Fuzatti, N., Griffini, A., Lolla, E., Pace, R., Ruffilli, T., Peterlongo, F. 2000. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. *Fitoterapia*, 71: 162–175.
- Gheldof, N., Engeseth, NJ. 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10): 3050- 3055.
- Gleiter, RA., Horn, H., Isengard, HD. 2006. Influence of type and state of crystallization on the water activity of honey. *Food Chemistry*, 96: 441–445.
- Gonnet, M. 1975. La pasteurisation du miel. *Bulletin Technique Apicole*, 3: 27-32.
- Gonnet, M. 1965. Les modifications de la composition chimique des miels au cours de la conservation. *Ann. Abeille.*, 8: 129–140.
- Gonnet, M., Vache G. 1984. Le Gout du miel. Union Nationale d'apiculture Française, Paris.
- Gupta, JK., Kaushik, R., Joshi, VK. 1992. Influence of different treatments, storage temperature and period on some physico-chemical characteristics and sensory qualities of Indian Honey. *Journal of Food Science and Technology*, 29: 84-87.
- Guyot, C., Bouseta, A., Scheirman, V., Collin, S. 1998. Floral origin markers of chestnut and lime tree honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 625-633.
- Gyamfi, MA., Yonamine, M., Aniya, Y. 1999. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *Gen. Pharmacol.: Vascular Syst.*, 32: 661-667.
- Hamdan, K. 2010. Crystallization of honey. *Bee World*, 87 (4): 71-74.
- Hanaa, IA., Sterling, R., Sporns, P. 1991. Crystal control in processed liquid honey. *Journal of Food Science*, 56: 1034-1041.
- Heitkamp, K. 1984. "Pro und kontra Honig-Sind Aussagen zur Wirkung des Honigs wissenschaftlich hinreichend gesichert". *Schriften zur Oecotrophologie*, 1–60.
- Kammerer, D., Kljusuric, JG., Carle, R., Schieber, A. 2005. Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. Cv. Cabernet Mito) using a polymeric adsorber resin. *European Food Research Technology*, 220: 431–437.
- Ko, SH., Choi, SW., Ye, SK., Cho, BL., Kim, HS., Chung, MH. 2005 Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *Journal of Medicinal*

- Food*, 8 (1): 41–6.
- Laos, K., Kirs, E., Pall, R., Martverk, K. 2011. The crystallization behaviour of Estonian honeys. *Agronomy Research*, 9 (Special Issue II), 427–432.
- Long, PL. 1984. Gordon memorial lecture. Coccidiosis control: past, present and future. *British Poultry Science*, 25 (1):3–18.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. 1978. “Methods of melissopalynology” *Bee World*, 59: 139–157.
- Lupano, CE. 1997. DSC study of honey granulation stored at various temperatures. *Food Research International*, 30: 683-688.
- Manikis, I., Thrasivoulou, A. 2001. The relation of physicochemical characteristics of honey and the crystallization sensitive parameters. *Apiacta*, 36 (2): 106–112.
- Marghitas, AL., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., Bogdanov, S. 2009. Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112(4): 863–867.
- Mateo, R., Bosch-Reig, F. 1998. Classification of Spanish unifloral honey by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 393-400.
- Mendes, E., Brojo Proenca, E., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Ferreira, M.A. 1998. Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate Polymers*, 37: 219-223.
- Moreira, RFA., Trugo, LC., Pietrolungo, M., De Maria, CAB. 2002. Flavor composition (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro cashew of (Croton species) honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7616–7621.
- National Honey Board. 2010. <http://www.honey.com/>
- Oddo, P., Piro, R. 2004. European Unifloral honeys: descriptive sheets. Technical Report from the International Honey Commission.
- Odeh, I., Abu-Lafi S., Dewik, H., Al-najjar, I., Imam, A., Dembitsky, VM, Hanus, LO. 2007. A variety of volatile compounds as markers in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsute*, and *Tolpis virgata*. *Food Chemistry*, 101: 1393-1397.
- Perez, RA., Sanchez-Brunete, C., Calvo, RM., Tadeo, JL. 2002. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas-chromatography mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2633-2637.
- Piasenzotto, L. Gracco, L., Conte L. 2003. Solid phase microextraction (SPME) applied to honey quality control. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 1037-1044.

- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.*, 269: 337-341.
- Primorac, L., Angelkov, B., Mandić, M.L., Kenjeric, D., Nedeljko, M., Flanjak, I., Pirički, AP., Arapceska, M. 2009. Comparison of the Croatian and Macedonian honeydew honey. *Journal of Central European Agriculture*, 10(3): 263–270.
- Resmi Gazete, Tarihi: 27.07.2012, Sayısı: 28366. Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği (Tebliğ No: 2012/58).
- Rüegg, M., Blanc, B. 1981. The water activity of honey and related sugar solutions. *Lebensm. Wiss. Und Technologie*, 14: 1-6.
- Sanz, S., Perez, C, Herrera, A., Sanz, M., Juan, YT. 1994. La Rioja honey composition. *Revista Espanola de Ciencia ye Tecnologia de Alimentos*, 34: 540-552.
- Scott, WJ. 1953. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C. *Australian J. Biol. Sciences*, 6: 549-564.
- Sethi, PS. 1995. Removal of crystallization of honey by heating method using microprocessor based programmable temperature controller. In: Food Processing Automation IV. Proceedings of the FPAC Conference, 3-5 Nov. ASAE, Chicago, p. 380-387.
- Shimoda, M., Wu, Y., Osajama Y. 1996. Aroma compounds from aqueous solution of haze (*Rhus succedanea*) honey determined by adsorptive column chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3913- 3918.
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult*, 16: 144-158.
- Snowdon, JA., Cliver, DO. 1996. Microorganisms in honey. *Int. J. Food Microbiology*, 31, 1-26.
- Socha R, Juszczak L, Pietrzyk S, Fortuna T. 2009. “Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys”. *Food Chemistry*, 113: 568–574.
- Soria, AC, Martinez-Castro I, Sanz J. 2003. Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry . *Journal of Separation Science*, 26: 793-801.
- Spagna, G., Barbagollo, RN., Todaro, A., Durante, MJ., Pifferi, PG. 2003. A method for anthocyanin extraction from fresh grape skin. *Italian Journal of Food Science*, 3 (15): 337-343.
- Stephen, CB., LeBel, CP. 1992. Formation of Excess Reactive Oxygen Species within the

- Brain. The Vulnerable Brain and Environmental Risks, pp. 255-272.
- Swallow, KW., Low, NH. 1990. Analysis and quantification of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38: 1828-1832.
- Tabouret, T., Mathlouthi, M. 1972. Essai de pasteurisation de miel. *Rev. Franc. Apic.*, 299: 258-261.
- Tananaki, CH., Thrasyvoulou, A., Giraudel, JL., Mountry, M. 2007. Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using Kohonen self organizing maps. *Food Chemistry*, 101: 1687-1693.
- Terrab, A., Díez, M.J., Heredia, F. 2003. "Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: III. Other unifloral honey types". *International Journal of Food Science & Technology*, 38 (4): 395–402.
- Thrasyvoulou, A., Manikis, J., Tselios, D. 1994. Liquefying crystallized honey with ultrasonic waves. *Apidologie*, 25: 297–302
- Tosi, EA., Re, E., Lucero, H., Bulacio, L. 2004. Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 37: 669–678.
- Townsend, GF. 1975. Processing and storing liquid honey, Chapter 9. In: Honey, a Comprehensive Survey. Crane E. ed. Heinemann, London, p. 269-292.
- Venir, E., Spaziani, M., Maltini, E. 2010. Crystallization in "Tarassaco" Italian honey studied by DSC. *Food Chem.*, 122: 410-415.
- White, JW. Jr. 1975. Composition of Honey. In Honey – A Comprehensive Survey; Eva, C., Ed. Heinemann: London, p. 157–206.
- White, JW. Jr. 1979. Physical Characteristics of Honey. In Honey – A Comprehensive Survey; Eva, C., Ed.; Heinemann: London, p. 207–239.
- White, JW. Jr. Kushnir, I., Subers, HM. 1964. Effect of storage and processing temperature on honey quality. *Food Technol.*, 18: 555–558.
- Wilson, HF., Marvin, GE. 1931. The effect of temperature on honey in storage. *Journal of Economic Entomology*, 24: 589-596.
- Wong, S., O'Reilly J, Pawliszyn J. 2004. Hig throughout method for meat spoilage analysis: SPME with combiPAL automation. In [www. Bioscienceworldca/therapeutics. html](http://www.Bioscienceworldca/therapeutics.html).
- Yao, L., Jiang, Y., Singanusong R, D'Arcy, B., Data, N., Caffin, N. 2004. Flavonoid in Australian Malaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their

potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86 (2): 169-177.

Zamora MC, Chrife, J. 2006. Determination of water activity change due to chrySTALLIZATION in honeys from Argentina. *Food Control*, 17: 59–64.