

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ  
KESİN RAPORU**

**Süzme Ballarda Muhafaza Sıcaklığının HMF  
Değeri ve Diastaz Aktivitesi Üzerine Etkisi**

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Özlem KÜPLÜLÜ  
Yardımcı Araştırmacı: Seda Dicle KAHRAMAN  
Proje Numarası: 10B3338011  
Başlama Tarihi: 01.07.2010  
Bitiş Tarihi: 01.10.2011  
Rapor Tarihi: 25.12.2011

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Ankara - " 2011 "

## **I.Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri**

### **Süzme Ballarda Depolama Sıcaklığının HMF ve Diastaz Aktivitesi Üzerine Etkisi**

Çocuklar başta olmak üzere tüm yaş gruplarınca tüketilen balın kimyasal kalitesinin belirlenmesi, özellikle depolama koşullarına bağlı olarak HMF ve diastaz gibi bazı kalite niteliklerinin değişmesi nedeniyle gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önem taşımaktadır. Şeker miktarı yüksek, teknolojisi gereği ısı işlemi görmüş bir çok gıdada artan HMF, gıdanın organoleptik özellikleri ve sağlık üzerine olumsuz etki oluşturabilmesi dolayısıyla sınırlandırılmıştır. Doğal bir gıda olan balın kalite değerlendirilmesinde kullanılan HMF değerinin, gerek balın işlenmesi sırasında yüksek sıcaklık uygulamaları gerekse muhafaza edildiği ortamın sıcaklığı ve muhafaza süresine bağlı olarak artışı; renkte esmerleşmeye, tat ve kokuda değişimlere, besleyici değerinde kayıplara neden olmaktadır. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarla HMF ve onun türevleri olan 5-klorometilfurfural ile 5-sülfoksimetilfurfuralin sitotoksik, genotoksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerinin ortaya konulması halk sağlığı yönünden önemini gözler önüne sermektedir.

Dünyada bal üretiminde ilk dört içerisinde yer alan Türkiye’de, tüketime sunulan ambalajlı ballarda kalite kriterlerinin belirlenmesine ilişkin birçok araştırma yapılmasına rağmen dolum tarihlerindeki HMF ve diastaz sayılarının muhafaza sıcaklığı ve süresine bağlı değişimi göz önünde bulundurularak raf ömrünün değerlendirilmesine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Türkiye’nin subtropikal iklim kuşağında olduğu göz önüne alındığında balların muhafaza şartlarının kontrol edilmesi gerekliliği de önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada öncelikle fabrikalarından dolum tarihlerinde alınan balların HMF değerleri HPLC, diastaz sayıları spektrofotometre ile ölçülerek, deneysel olarak belirli muhafaza sıcaklıklarının bu değerler üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca piyasa taraması bölümünde, satışa sunulan farklı firmalara ve farklı üretim

tarihlerine ait bal örnekleri toplanarak HMF değerleri HPLC, diastaz sayıları spektrofotometre ile belirlenmiştir. Böylelikle değişebilen muhafaza süresi ve sıcaklıklarının balın önemli kalite kriterlerinden olan HMF ve diastaz üzerine etkisi incelenmiştir. Piyasa taraması kapsamında alınacak olan ballar özellikle HMF miktarı yönünden değerlendirilerek olası sağlık riskleri ortaya konulmuştur.

### **Effect of Storage Temperature on HMF and Diastase Activity of Strained Honey**

Determining the chemical quality of honey, which is consumed by all age groups but primarily by children, is important in terms of food safety and public health because of the changes in the quality of diastase and HMF occurring due to storage conditions. HMF, which increases in food that has a high level of sugar content and is heat treated, is restricted due to its negative effects on health and the organoleptic characteristics of food. The increase of HMF value -used in determining the quality of honey, a natural food- is due to the application of high heat during honey processing, with the temperature and duration of the storage causing changes in the colour (it turns brown), taste, and smell of the honey, as well as a loss in nutritional value. Furthermore, the studies done in recent years reveal that presenting the cytotoxic, genotoxic, mutagenic and carcinogenic effects of HMF and its derivatives such as 5-chloromethylfurfural and 5-sulfoxymethylfurfural is important in terms of public health.

Although there are many studies concerning the determination of quality standards of honey in packaged consumer products, there hasn't been any study done in Turkey on the shelf life of honey which considers the changes in HMF and diastase numbers on the filling dates due to the temperature and duration of storage, despite the fact that Turkey ranks among the largest four honey producers worldwide. Considering that Turkey is in a subtropical climate zone, it is crucial that the storage conditions of honey be monitored and controlled.

This study aims to determine the effects of specific storage temperatures on the HMF values, HPLC and diastase numbers of the honey taken during filling at the factory

by measuring them with a spectrophotometer. Moreover, in the section which looks at the honey available in markets, honey samples produced on different dates collected from different brands and their HMF values, HPLC and diastase numbers will be measured by spectrophotometer. This way, the importance of the effects of different storage durations and temperatures on HMF and diastase determined and established as quality criteria. The honey samples collected during the market scan will be evaluated especially in terms of HMF amount, and the possible health risks they carry presented.

### **Yardımcı Bilgiler**

Bal tarih boyunca insanlar tarafından tüketilen, bitkisel ve hayvansal kökenli doğal bir ürün olup sağlıklı yaşamı destekleyen bir gıda olarak hemen hemen tüm mitolojik metinlerde yer almıştır. İnsanlar tarafından işleme tabi tutulmadan tüketilen tek tatlandırıcı gıda olarak bilinmektedir (Crane, 2004).

Bal bitkilerin nektarının, canlı kısımlarının, salgılarının veya bu kısımları üzerinde beslenen bazı böceklerin salgılarının bal arıları tarafından toplanarak, kendilerine özgü maddelerle karıştırılıp, dehidre edilerek olgunlaşması için peteğe bırakılan doğal tatlı bir ürün olarak tanımlanmaktadır. Orijinine göre çiçek ve salgı balı olarak ayrılmaktadır (Anon, 2005).

Piyasa ballarının büyük çoğunluğu farklı bitki türlerinin nektar ve salgılarını içerdiğinden bunlar polifloral ya da multifloral olarak adlandırılmaktadır.

Ülkemiz arı yetiştiriciliği ve bal üretiminde coğrafya, iklim ve flora bakımından oldukça zengin bir yapıya sahiptir. Dünyanın önde gelen bal üreticileri arasında yer alan Türkiye'nin (2007 verilerine göre, yılda 65 bin ton) bu potansiyelini ihracaatta arttırabilmesi için baldaki kalite standartlarını yükseltmesi büyük önem taşımaktadır (Anon, 2009<sub>a</sub>).

Bal kalitesinin belirlenmesinde fiziksel, kimyasal, melitopalinolojik (balın mikroskopik analizi) ve organoleptik analizlerinin birlikte yapılması gerekmektedir. Fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklılıklar özellikle bitki kaynağına, içeriğini oluşturan nektar ve polenin rengine, nemine, şeker ve protein içeriğine göre değişmektedir (Fallico ve ark, 2009).

Bala kolay sindirilebilme niteliği kazandıran önemli enzimlerden biri olan amilazın kaynağı arıların tükürük bezi salgılarıdır. Bala uygulanan ısı işlemi ve zamana bağlı olarak yıkılan bu enzim balların tazeliğinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir indikatördür (Anon, 2009<sub>b</sub>). Ancak enzim etkinliği taze ballarda bile oldukça geniş sınırlar içinde değişiklik göstermektedir (çiçek ve salgı ballarında en az 8 olarak belirlenen diastaz sayısı, narenciye balları için en az 3'tür). Enzimin ölçülmesinde kullanılan diastaz sayısı 38-40 °C'de 1 saatte 1 g baldaki enzim tarafından hidrolize edilebilen %1'lik nişasta çözeltisinin ml'si olarak tanımlanmaktadır (Anon, 2005).

Karbonhidrat içeren bazı gıdaların tazeliği ve kalitesiyle son derece ilişkili olan HMF balın kalitesinin belirlenmesinde de kullanılan önemli bir kriterdir. Proses sırasında maruz kaldığı sıcaklığın, depolama şartlarının ve kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan bir indikatördür. HMF, heksosların asidik ortamda dehidrasyonu ya da maillard (enzimatik olmayan esmerleşme) reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Asitlerin ayrılmasıyla; pentozlardan oluşan furfural, heksoslardan oluşan HMF, maddeler arasında mutajenik aktivite ile sınıflandırılmaktadır (Teixido ve ark., 2006). Reaksiyon hızının pH, su aktivitesi (aw), indirgen şeker ve aminoasit içeriği ile ortam sıcaklığına bağlı olarak değiştiği, her 10 °C'lik artışın reaksiyon hızını 4 misli arttırdığı bildirilmektedir (Burdurlu ve Karadeniz, 2002).

Isı işlemi görmüş birçok gıda (kurutulmuş meyve, meyve suyu, marmelat, reçel, pekmez, salça, sirke, bisküvi, karamelli ürünler v.b.) yüksek düzeyde (1-9.5g/kg) HMF içermektedir. Kalite değerlendirilmesinde kullanılan HMF'nin, gıdalarda belli değerlerin üzerinde bulunması halinde renkte esmerleşmeye, tat ve kokuda değişimlere, gıdanın besleyici değerinde kayıplara neden olduğu bilinmektedir. Bu

nedenle bazı gıdalarda, bulunmasına izin verilen HMF miktarı sınırlandırılmıştır (Janzowski, 2000).

İnsan sağlığına etkisi tam olarak ortaya konulamamış olan HMF'nin gıdalarda oluşumu ve günlük alınan yüksek değerleri (45-150 mg/kg vücut ağırlığı) konu ile ilgili araştırmaların artmasına neden olmaktadır (Janzowski, 2000). Mutajenik ve DNA zincirine zarar verici etkilerine ilişkin yapılan çalışmalarda, sülfotransferazlar ile aktif hale gelen HMF'nin genotoksik etki gösterdiği bildirilmektedir (Rufian-Henares ve Cueva, 2008, Durling ve ark., 2009). Yüksek konsantrasyondaki HMF'nin sıçanlarda sitotoksik özellik gösterdiği üst solunum yolu, göz, deri ve mukoza membranlarına iritan etki yaptığı saptanmış, LD<sub>50</sub> değeri 3.1 g/kg vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir (Teixido ve ark., 2006). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda ağız yolu ile uygulanan farklı HMF dozlarının fare hücrelerinde genotoksisite ve karsinojenitede biyo işaretleyici olan ACF'yi (colonic aberrant crypt foci) arttırıcı etkisi ile deri ve karaciğer tümör gelişimini stimüle ettiği belirtilmektedir (Monien ve ark., 2009).

Baldaki HMF oluşumu; balın kimyasal özelliklerine (şeker, pH, toplam asitlik, mineral madde), bal işleme prosesine, depolama şartlarındaki sıcaklık ve süreye bağlı olarak değişmektedir (Krell, 1996).

Ballarda; işlenmeleri sırasında, fermentasyona uğramaması ve kristalizasyonun önlenmesi için uygulanan ısı işleminin, balın uzun süre kristallenmeden muhafaza edildiği ve pazarlama kalitesini arttırdığı düşünülmektedir (Anon, 2009<sub>b</sub>). Ancak uygulanan yüksek ve uzun süreli ısıtma işlemi ile depolama sıcaklığı ve süresinin balın sindiriminde önem taşıyan diastaz enziminin yıkımlanmasına, besin değerinin azalmasına, tat aroma ve renk değişikliklerine sebep olmaktadır. Balda kalite kaybına neden olan bu durum, HMF artışına bağlı olarak şekillenmektedir (Kalábová ve ark, 2003).

## **II. Amaç ve Kapsam**

Bu çalışmada, Türkiye'de farklı firmalar tarafından üretilen bal örneklerinin HMF miktarı ve diastaz aktivitesi üzerine farklı depolama sıcaklıklarının etkisinin

ortaya konulması amaçlanmıştır. Ayrıca tüketime sunulan süzme ballar, HMF miktarı ve diastaz aktivitesi yönünden analize alınarak piyasa taraması yapılmıştır. Bal örneklerinde HMF miktarı HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), diastaz aktivitesi ise UV Spektrofotometre yöntemleriyle belirlenmiştir.

### **III. Materyal ve Yöntem**

Çalışma kapsamında, 5 firmaya ait 850 g'lık cam kavanozlarda 2'şer adet süzme çiçek ve salgı balı örnekleri, fabrikalardan dolun tarihlerinde alındı. Örneklerin aynı gün içinde HMF ve diastaz sayıları belirlenerek ve kalite kriterlerinin belirlenmesine ilişkin olarak şeker, serbest asitlik, nem, kül, pH, polen analizleri yapıldı. Örnekler, belirli sıcaklıklarda (10 °C, 22 ±2 °C ve 35 °C) muhafaza edilerek, üç aylık periyotlar (3., 6., 9. ve 12. ay) sonunda HMF ve diastaz sayısına ait analizler tekrarlandı. Dolayısıyla sıcaklık ve zaman parametreleri göz önünde bulundurulduğunda, analizler kontrol tekrarlı olarak 300 örnek için gerçekleştirilmiş oldu. Ayrıca tüketime sunulan, üretim tarihleri farklı 25 adet çiçek ve 25 adet salgı balı olmak üzere toplam 50 süzme bal örneğinin HMF değeri ile diastaz sayısı belirlendi.

### **Örneklerde HMF Tayini**

Bal numunelerinin HMF tayini, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) - UV **dedektör** kullanılarak Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) metoduna göre yapıldı.

#### Kalibrasyon materyalleri

% 99 saflıkta 5-(hydroxymethyl-)furan-2-carbaldehyde (HMF) (Merck No. 820 678) standardı kullanılarak HMF stok standardından 1, 2, 5 ve 10 mg /L 'lik çalışma standartları günlük hazırlandı.

#### Örneklerin Ön Hazırlığı

Yaklaşık olarak 10 gram alınan bal örneği üzerine yaklaşık 25 ml saf su ilave edilerek çalkalayıcı yardımıyla bal çözülür. Çözelti, 50 ml'lik balon jöjeye aktarılarak saf su ile 50 ml'ye tamamlandı. 0.45 µm membran filtreden süzülerek 285 nm dalga boyunda ölçüm yapabilen UV dedektörlü HPLC cihazına verildi.

### HPLC Analizi

Ölçümler, 285 nm dalga boyunda ölçüm yapabilen UV dedektörlü HPLC ile yapılmıştır. Tespit limiti (Detection Limit-LOD) ölçülebilir sinyal veren en düşük analit miktarına göre hesaplandı. Araştırmada kullanılacak bütün kimyasal malzemeler HPLC ölçümüne uygun saflıkta kullanıldı.

#### *Cihaz Şartları :*

Mobil Faz: Saf su-methanol (90+10 olacak şekilde)

Analitik Kolon : C18-reversed phase (Hypersil ODS 5 µm,125x4 mm or 250x4 mm)

Akış Oranı ve Enjeksiyon Miktarı: 1,0 ml/dk ve 20 µl

### **Örneklerde Diastaz Tayini**

Bal numunelerinin diastaz tayini, UV-Spektrometre yöntemi kullanılarak Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) metoduna göre yapıldı (Anon<sub>c</sub>, 2009).

#### Nişasta Çözeltilisinin Kalibrasyonu

6 ayrı tüpe 20, 21, 22, 23, 24, 25 ml saf su ve 5 ml seyreltilmiş iyodin çözeltisi alınarak, her tüp için 10 ml su ile 5 ml nişasta içeren çözeltiliden 0,5 ml eklendi ve iyice karıştırılarak absorbands değeri 600 nm olan UV- spektrofotometrede okutuldu.

#### Örneklerin Analizi

10 g bal, 15 ml saf su ve 5 ml acetat buffer solusyonu (pH 5.3) içerisinde çözülerek 50 ml'lik balon jöjeye aktarıldı. İçerisine 3 ml sodyum klorit ilave edilerek üzeri saf su ile tamamlanan çözelti, 10 ml nişasta çözeltisi (% 1) ile birlikte 40 °C'de su banyosunda 15 dakika bekletildi. Nişasta çözeltisinden (% 1) 5 ml alınarak bal çözeltisine ilave edilerek iyice karıştırılıp absorbands değeri 600 nm olan UV-spektrofotometrede değerler belirlendi.

### **Örneklerde Şeker Tayini**

Bal numunelerinin Şeker (fruktoz, glikoz) tayini, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) - refraktif-indeks (RI) dedektör kullanılarak Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) metoduna göre yapıldı (Anon, 2009<sub>c</sub>).



### Standartların hazırlanması

Früktoz ve glikoz standartları karıştırılarak hazırlandı. Bu amaçla 100 ml'lik balon jojeye 25 ml metanol ve 40 ml saf su koyularak üzerine 2 g früktoz ve 1,5 g glikoz ilave edilip 100 ml'ye tamamlandı. 0.45 µm membran filtreden süzülerek viale alınarak HPLC'de analiz gerçekleştirildi. (Standart +4 °C'de 4 hafta, -18 °C'de 6 ay stabil olduğu bilinmektedir.)

5 g bal örneği, bir beher içine alınarak 40 ml su ile çözülüp, 25 ml metanol ilave edilerek 100 ml'lik balon jojeye aktarılıp saf su ile 100ml'ye tamamlandı. 0.45 µm'lik membran filtreden süzülen örnek, viale alınarak HPLC cihazına verildi.

### Cihaz Şartları :

Mobil Faz: Asetonitril-su (80+20 olacak şekilde)

Analitik Kolon : C18-reversed phase (125x4 mm)

Akış Oranı ve Enjeksiyon Miktarı: 1,3 ml/dk ve 10 µl

Kolon ve dedektör sıcaklığı: 25 °C

### **Örneklerde pH ve Asitlik Tayini**

Bal numunelerinin pH tayini, pH-metre kullanılarak Harmonised Methods of the International Honey Commission'un (2009) önerdiği metoda göre yapıldı (Anon, 2009c).

Bal numunelerinin Asitlik tayini, titrimetrik yöntem kullanılarak TSE'nin önerdiği metoda göre yapıldı (Anon, 2002).

Her örnek için 10 g bal, 0.01 g hassasiyetle tartılarak 250 ml'lik erlenlere alınıp üzerine 75 ml karbondiyoksiti uzaklaştırılmış distile su eklendi. Ağzı kapatılan erlenler, iyice çalkalanarak balların çözülmesi sağlandı ve çözeltiler içine 4-5 damla fenol ftalein çözeltisi damlatıldı. Erlen içerisine magnet konarak manyetik karıştırıcı üzerine alınıp büretten akıtılan 0.05 M NaOH titrisolü ile eşdeğerlik noktasına titre edildi. Fenol ftalein'in kırmızı rengi en az 15 sn kaybolmadan kaldığında harcanan çözelti hacmi (Vt) kaydedildi. Ayrıca bal örneği olmaksızın şahit bir deney yapılarak

titrasyonda kullanılan su ve indikatörün harcadığı titrisol hacmi (Vo) okundu. Son olarak, bal örneğinin tam karşılığı olan 0.05M NaOH titrisol hacmi (Vt-Vo) bulundu.

#### Sonuçların Hesaplanması

$A = \frac{1000 \times M \text{ NaOH çözeltisinin molaritesi, mmol/ml} \times V \text{ (Harcanan NaOH hacmi, ml)}}{M \text{ (Bal örneği kütlesi, g)}}$

#### **Örneklerde Nem Tayini**

Bal numunelerinin nem tayini, refraktometrik yöntem kullanılarak Harmonised Methods Of The International Honey Commission (2009) metoduna göre yapıldı (Anon, 2009c).

#### **Örneklerde Kül Tayini**

Bal numunelerinin kül tayini, kül fırını kullanılarak Harmonised Methods of the International Honey Commission (2009) metoduna göre yapıldı (Anon, 2009c).

#### **Örneklerde Polen Tayini**

Bal numunelerinin polen analizi için cam bagetle homojen hale getirilmiş örneklerden 10 g alınarak üzerine 20 ml distile su ilave edilip tüplere aktarıldı. Balın su içinde çözünmesi için 45 °C'lik su banyosunda 10 dk bekletilen tüplere, polenlerin boyanmasını sağlayan bir kaç damla bazik fuksin ilave edilerek 4000 rpm'de 45 dk santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüplerin süpernatant kısmı dökülerek suların iyice süzülmesi sağlandı ve 0.1 ml kadar % 50'lik gliserin ilave edilerek dipteki çökeltinin gliserin ile homojen olarak karışması sağlandı. Lam üzerine alınan bir damla çözelti, lamel kapatılarak mikroskopta incelendi (Moar, 1985).

#### IV. Analiz ve Bulgular

Fabrikalarından alınan çiçek ve çam balı örneklerine ait 3 ay aralıklarla belirlenen HMF değerleri ve diastaz aktivitelerine ilişkin değerler Tablo1, Tablo 2, Tablo 3 ve Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 1. Fabrikalarından alınan çiçek balı örneklerinin farklı muhafaza sıcaklıklarında, 3 ay aralıklarla değişen HMF değeri

HMF değeri	0. gün	3. ay	6. ay	9. ay	12. ay	
A	22±2 °C	14.2	17.1	20.9	25.4	29.1
	10±2 °C	-	15.5	17.9	19.4	21.8
	35±2 °C	-	26.7	60.2	83.7	132.8
B	22±2 °C	21.4	25.0	29.7	35.3	38.9
	10±2 °C	-	22.1	23.3	25.4	27.7
	35±2 °C	-	37.9	83.7	115.0	165.2
C	22±2 °C	9.7	12.4	15.8	18.3	22.1
	10±2 °C	-	10.5	11.8	12.9	14.2
	35±2 °C	-	24.7	53.1	121.2	176.5
D	22±2 °C	15.7	20.1	24.9	28.8	35.6
	10±2 °C	-	16.8	18.2	18.9	23.5
	35±2 °C	-	28.8	71.4	136.1	198.5
E	22±2 °C	17.3	20.5	24.5	29.1	33.2
	10±2 °C	-	16.9	17.8	18.2	20.1
	35±2 °C	-	29.8	77.1	110.7	164.4

Tablo 2. Fabrikalarından alınan çam balı örneklerinin farklı muhafaza sıcaklıklarında, 3 ay aralıklarla değişen HMF değeri

HMF değeri	0. gün	3. ay	6. ay	9. ay	12. ay	
A	22±2 °C	11.1	13.2	15.9	19.3	20.8
	10±2 °C	-	11.1	11.8	11.8	12.5
	35±2 °C	-	19.0	31.2	51.4	84.3
B	22±2 °C	13.9	15.4	17.1	18.7	21.8
	10±2 °C	-	14.1	14.6	15.0	15.8
	35±2 °C	-	22.7	38.6	52.9	79.7
C	22±2 °C	12.4	14.4	17.0	19.8	21.2
	10±2 °C	-	12.7	12.6	13.0	13.4
	35±2 °C	-	24.1	41.0	77.5	115.8
D	22±2 °C	24.5	27.8	30.8	35.2	41.4
	10±2 °C	-	25.6	26.6	26.8	28.3
	35±2 °C	-	39.6	70.3	102.2	136.6
E	22±2 °C	19.1	22.0	23.8	27.5	32.2
	10±2 °C	-	20.1	21.7	21.5	22.1
	35±2 °C	-	27.8	46.9	63.1	102.2

Tablo 3. Fabrikalarından alınan çam balı örneklerinin farklı muhafaza sıcaklıklarında, 3 ay aralıklarla değişen diastaz aktivitesi

Diastaz aktivitesi	0. gün	3. ay	6. ay	9. ay	12. ay	
A	22±2 °C	13.2	12.8	12.0	11.5	10.9
	10±2 °C	-	13.0	13.0	12.7	12.5
	35±2 °C	-	10.9	8.7	8.0	6.9
B	22±2 °C	10.8	10.4	9.7	9.3	8.7
	10±2 °C	-	10.8	10.6	10.5	10.1
	35±2 °C	-	9.3	7.8	7.1	6.2
C	22±2 °C	14.1	13.4	12.4	11.7	10.8
	10±2 °C	-	14.0	13.7	13.4	13.0
	35±2 °C	-	12.1	9.8	8.6	6.3
D	22±2 °C	12.7	12.0	11.2	10.4	9.1
	10±2 °C	-	12.4	12.2	11.7	11.0
	35±2 °C	-	10.4	8.3	7.1	5.8
E	22±2 °C	11.1	10.5	9.8	9.4	8.8
	10±2 °C	-	10.8	10.7	10.2	9.8
	35±2 °C	-	9.5	7.6	6.8	6.0

Tablo 4. Fabrikalarından alınan çam balı örneklerinin farklı muhafaza sıcaklıklarında, 3 ay aralıklarla değişen diastaz aktivitesi

Diastaz aktivitesi	0. gün	3. ay	6. ay	9. ay	12. ay	
A	22±2 °C	14.3	13.9	13.2	12.8	12.2
	10±2 °C	-	14.2	13.9	13.9	13.5
	35±2 °C	-	12.4	11.0	10.1	8.9
B	22±2 °C	15.5	15.1	14.7	14.5	14.1
	10±2 °C	-	15.4	15.5	15.1	14.8
	35±2 °C	-	13.5	12.7	12.0	11.0
C	22±2 °C	16.7	16.0	15.2	14.6	13.7
	10±2 °C	-	16.5	16.2	16.0	15.6
	35±2 °C	-	13.6	12.3	11.1	9.2
D	22±2 °C	12.9	12.4	11.8	11.4	10.8
	10±2 °C	-	12.9	12.4	11.9	11.2
	35±2 °C	-	10.9	9.5	8.8	7.9
E	22±2 °C	14.9	14.0	13.2	12.3	11.1
	10±2 °C	-	14.9	14.6	13.9	13.3
	35±2 °C	-	12.2	10.7	9.2	8.9

Çalışmada, 25 çiçek balı ve 25 çam balı olmak üzere toplam 50 adet süzme bal örneği incelendi. Analize alınan 25 süzme çiçek bal örneğinden 2'si HMF değeri, 1'i diastaz aktivitesi, 7'si ise hem HMF değeri hem de diastaz aktivitesi yönünden toplam 10 örnek T.G.K. Bal Tebliği'ne uygun bulunmadı. Buna göre; analize alınan 9 bal örneğine ait limit değeri aşan HMF miktarları, sırasıyla 119.8, 114.6, 102.4, 100.3, 98.5, 87.4, 73.3, 49.2, 40.2 bulunurken, 8 bal örneğinde limit değerinin altında saptanan diastaz aktiviteleri ise sırasıyla 0.9, 1.5, 5.4, 5.9, 6.0, 6.2, 7.5, 7.7 olarak saptandı (Tablo 6).

Tablo 5. Çiçek ballarına ait HMF değerleri ve diastaz aktiviteleri

No	Üretim Yılı	Dolum Tarihi	Son Tüketim Tarihi	Analiz Tarihi	HMF değeri (mg/kg)	Diastaz aktivitesi
1	-	05.01.09	05.01.11	17.12.10	114.6*	6.0*
2	2009	27.10.09	29.04.11	25.01.11	100.3*	5.4*
3	-	15.05.09	15.05.11	25.01.11	119.8*	1.5*
4	2009	12.12.09	12.12.11	17.06.11	73.3*	0.9*
5	2009	20.04.10	20.04.12	17.06.11	37.2**	10.1
6	2010	10.10	10.13	17.06.11	102.4*	5.9*
7	2009	28.07.10	28.07.12	17.06.11	36.76	8.3**
8	2010	06.01.11	06.07.12	17.06.11	27.2	10.6
9	2009	31.07.10	31.01.12	17.06.11	28.2	11.5
10	2009	22.06.10	22.12.11	17.06.11	49.2*	10.8
11	2009	23.06.10	23.12.11	17.06.11	35.1	12.6
12	2010	28.12.10	28.06.12	17.06.11	26.8	11.0
13	2009	12.02.10	12.02.12	06.07.11	98.5*	8.0
14	2010	10.05.10	10.11.11	06.07.11	27.5	10.7
15	2010	12.10	12.13	06.07.11	26.7	8.0**
16	2011	04.11	04.12	06.07.11	30.9	12.9
17	2010	01.12.10	01.06.12	06.07.11	19.8	15.8
18	2010	06.04.11	06.10.12	06.07.11	24.2	12.2
19	2009	02.10	02.12	06.07.11	40.2*	7.7*
20	2010	04.02.11	04.08.12	06.07.11	87.4*	7.5*
21	2010	03.01.11	03.07.12	06.07.11	27.0	12.7
22	2010	28.05.10	29.11.11	12.07.11	38.9	6.2*
23	2010	21.01.11	21.01.13	12.07.11	29.8	9.4
24	2009	12.10	06.12	12.07.11	30.2	8.8
25	2010	26.10.10	26.04.12	12.07.11	29.7	8.5**

\* >40 mg/kg (HMF değeri); <8 (diastaz aktivitesi)

\*\* T.G.K. göre sınır değerlere yakın HMF değerleri ve diastaz aktiviteleri

İncelenen 25 süzme çam balı örneğinden 4'ü HMF değeri, 1'i ise hem HMF değeri hem de diastaz aktivitesi yönünden toplam 5 örnek T.G.K. Bal Tebliği'ne uygun bulunmadı. Buna göre çam balı örneklerinin 5'inde limit değeri aşan HMF miktarları sırasıyla 82.5, 50.2, 46.4, 44.7, 40.6 iken sadece 1 örneğin diastaz aktivitesi 7.5 ile sınır değerinin altında bulundu (Tablo 6).

Tablo 6. Çam ballarına ait HMF değerleri ve diastaz aktiviteleri

No	Üretim Yılı	Dolum Tarihi	Son Tüketim Tarihi	Analiz Tarihi	HMF değeri (mg/kg)	Diastaz aktivitesi
1	2008	12.08	12.10	24.10.10	39.1**	9.7
2	2008	03.11.08	03.11.10	24.10.10	82.5*	7.5*
3	2008	24.08.09	24.02.11	25.01.11	40.6*	8.6
4	2009	09.04.10	09.04.12	17.06.11	39.4**	10.9
5	2009	19.03.10	19.09.11	17.06.11	38.6**	9,8
6	2009	16.06.10	16.12.11	17.06.11	31.7	12.7
7	2010	14.12.10	14.06.12	17.06.11	28.4	12.4
8	2010	25.01.11	25.07.12	17.06.11	24.4	14.3
9	2009	18.03.10	18.09.11	06.07.11	20.6	12.5
10	2009	09.02.10	09.02.12	06.07.11	24.6	8.8
11	2009	04.02.10	04.02.12	06.07.11	28.4	13.4
12	2009	02.10	02.12	06.07.11	38.9**	12.5
13	2009	03.10	03.12	06.07.11	30.1	11.7
14	2009	17.05.10	17.05.12	06.07.11	46.4*	13.0
15	2010	16.10.10	16.04.12	06.07.11	28.3	16.5
16	-	04.05.11	04.05.14	06.07.11	15.6	14.2
17	2010	05.11	05.13	06.07.11	11.5	19.6
18	2010	05.01.11	05.07.12	06.07.11	31.1	8.9
19	2010	15.01.11	17.07.12	06.07.11	10.6	14.0
20	2010	16.10.10	16.04.12	06.07.11	22.4	12.0
21	2010	11.04.11	11.10.12	06.07.11	17.2	16.5
22	2010	10.01.11	10.07.12	12.07.11	25.5	12.3
23	2009	11.10	11.12	12.07.11	50.2*	10.3
24	-	08.05.10	08.11.12	12.07.11	44.7*	11.4
25	2010	25.09.10	25.03.12	12.07.11	27.3	14.9

\* >40 mg/kg (HMF değeri); <8 (diastaz aktivitesi)

\*\* T.G.K. göre sınır değerlere yakın HMF değerleri ve diastaz aktiviteleri

Çalışmada, 50 süzme bal örneğinden 10 çiçek balı ile 5 çam balı örneğinin Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde bildirilen limit değerlere uygun olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca analize alınan 1 çiçek ve 4 çam balı örneği HMF değeriyle; 3 çiçek balı örneği ise diastaz aktivitesiyle sınır değere yakın bulunmuştur.

## V. Sonuç ve Öneriler

Yapılan bu çalışma ile elde edilecek sonuçların; sağlıklı bal tüketimi için gerekli önlemlerin alınması yönünden konuyla ilgili kamu kuruluşları ile sektöre katkı sağlayacağı ve toplumu bilinçlendirmeye yönelik bilgiler sunacağı düşünülmektedir. Bu veriler doğrultusunda bala özgü kalite kriterlerinin korunması ve halk sağlığına zararlı bileşiklerin oluşumunun önlenmesi için Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nde yer almayan uygun muhafaza koşullarının belirlenmesine ilişkin değerlendirme yapılmıştır.

Sonuç olarak, sağlıklı beslenmede önemli bir yere sahip olan balda oluşan HMF'nin gıda güvenliği ve halk sağlığı yönünden potansiyel risk olduğu bilinmektedir. Bala ait uygun üretim ve muhafaza koşulları sağlanarak başta HMF ve diastaz olmak üzere tüm kalite kriterlerinin T.G.K. Bal Tebliği'ne uygunluğunun raf ömrünün sonuna kadar sağlanması hedeflenmelidir.

## VI. Kaynaklar

ANON (2002). Bal- Asitlik Tayini, TS 3036/ 02. 2002, TSE, Ankara.

ANON (2005). Bal Tebliği-2005/49. <http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2005-49.html> Erişim Tarihi: 12.11.2009.

ANON (2009)<sub>a</sub>. Arıcılık ve Arı Yetiştiriciliği. Erişim: <http://www.bahce.biz/hayvan/aricilik.htm> Erişim Tarihi: 01.12.2009.

ANON (2009)<sub>b</sub>. Teknik Arıcılık Erişim: [http://www.teknikaricilik.blogspot.com/2007\\_12\\_01\\_archive.html](http://www.teknikaricilik.blogspot.com/2007_12_01_archive.html) Erişim Tarihi: 26.11.2009.

ANON (2009)<sub>c</sub>. Harmonised Methods Of The International Honey Commission. Erişim: <http://www.bee-hexagon.net/en/network.htm> Erişim Tarihi: 15.11.2009.

BELITZ, H.D., GROSCH, W. (1999). *Food Chemistry*. Berlin: Springer, p.:145-157.

BURDURLU, H.S., KARADENİZ, F. (2002). Gıdalarda maillard reaksiyonu. *Gıda*, 27 (2): 77-82.

CRANE, E., (2004). A short history of knowledge about honey bees (*Apis*) up to 1800. *Bee World.*, **85**: 6-11.

DURLING, L.,J.K., BUSK, L., HELLMAN, B.E. (2009). Evaluation of the DNA damaging effect of the heat induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food and Chemical Toxicology*, **45**: 880-884.

FALLICO, B., ARENA, E., ZAPPALA, M. (2009). Prediction of Honey Shelf Life. *Journal of Food Quality*. **32**: 352-368.

JANZOWSKI, C., GLAAB,V., SAMIMI, E., SCHLATTER, J., EISENBRAND, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: assesment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, **38**: 801-809.

KALÁBOVÁ, K., VORLOVA, L., BORKOVCOVA,I., SMUTNA, M.,VECEREK,V. (2003). Hydroxymethylfurfural in Czech honeys. *Czech Journal of Animal Science*, **48**(12): 551-557.

KRELL, R. (1996). Value, added products from beekeeping: FAO Agricultural Services. Rome: Bulletin. **124**: 10-11.

MOAR, N. (1985). Pollen Analysis of New Zealand Honey. *Journal of Agriculture Research*, **28**: 38- 70.

MONIEN, H.B., FRANK, H., SIEDEL, GLATT, H. (2009). Conversion of the Common Food Constituent 5-Hydroxymethylfurfural into a Mutagenic and Carcinogenic Sulfiric Acid Ester in the Mouse in Vivo. *Chemical Research in Toxicology*, **22**: 1123-1128.

RUFIAN-HENARES, J.A., DE LA CUEVA, S.P. (2008). Assessment of hydroxymethylfurfural intake in the Spanish diet. *Food Additives and Contaminants*, **25**(11): 1306-1312.

TEIXIDO, E., SANTOS, F.J., PUIGNOU, L., GALCERAN, M.T. 2006. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1135**(1): 85-90.



## VII. Ekler

### a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Bu proje gereği, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'nden istenen bütçe ile çalışmada kullanılacak makine donanımı, kimyasallar ve HPLC analiz testlerinde kullanılacak sarf malzemeleri karşılanmıştır. İhtiyaç duyulan bu malzemeler Anabilim Dalında bulunmadığından satın alınmasına ihtiyaç duyulmuştur. Ayrıca, özel bir laboratuvarında HPLC ile HMF tayinine ilişkin olarak gerçekleştirilmiş analizlerde, cihaz kullanım bedeli her bir analiz 25 TL olmak üzere kontrol tekrarlı 300 analiz için bütçede belirtilmiş olan toplam 7500 TL ilgili laboratuvara ödenerek analiz hizmeti alınmıştır.

Projede yer alan 5 kalem cihaz (Soğutmalı etüv, manyetik karıştırıcı, pHmetre, su banyosu, el tipi bal refraktometresi) için 4500 TL ek ödenek sağlanarak alımları yapılmıştır.

Projenin piyasa taraması bölümünde kullanılacak numunelerin (850 g cam kavanozda 25 adet süzme çiçek ve 25 adet süzme çam balı) temini, alınan avans ücreti ile yapıldı.

- Soğutmalı etüv, bal örneklerinin 1 yıl süre ile  $22\pm 2$  °C muhafaza sıcaklıklarında inkübe edilmesi için kullanıldı.
- pH metre, bal örneklerinin pH değerlerinin ölçümünde ve analiz öncesi solusyonların uygun pH da hazırlanması için kullanıldı.
- Bal refraktometresi ile bal örneklerinin rutubet tayini yapıldı.
- 5-hydroxymethyl-furan-2-carbaldehyde standardı, örneklerdeki HMF miktarını belirlemek amacı ile kullanılacak olan HPLC yönteminde kalibrasyon çözeltilerin hazırlanması için kullanıldı.
- Glikoz ve früktoz standardı, örneklerin şeker miktarının belirlemek amacı ile kullanılacak olan HPLC yönteminde kalibrasyon çözeltilerin hazırlanması için kullanıldı.
- Enjektör, örneklerin HPLC analizinin hazırlık aşamasında kullanıldı.
- Membran filtre (0.45µm) ve vial, örneklerin HPLC analizine hazırlık aşamasında kullanıldı.

- UV-spektrofotometre küveti, örneklerin diastaz aktivitelerinin UV-spektrometrede analizi için kullanıldı.
- Nişasta ve metanol, şeker tayini için früktoz, glikoz standartlarının hazırlanması, örneklerin HPLC analizine hazırlık aşaması ve HMF miktarının belirlenmesi sırasında HPLC yönteminde mobil faz olarak kullanıldı.
- Nişasta ve iyot, örneklerin UV-spektrofotometrede diastaz tayini için nişasta çözeltisinin kalibrasyonu ve örneklerin ön hazırlığı aşamasında kullanıldı.
- Asetonitril, örneklerin şeker miktarının belirlenmesinde HPLC yönteminde mobil faz olarak kullanıldı.

#### **b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklama**

Proje kapsamında alınan Soğutmalı etüv, pHmetre, manyetik karıştırıcı, su banyosu ve el tipi bal refraktometresi lisans ve yüksek lisans uygulama dersleri ile rutin araştırmalarda kullanılmak üzere, Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Bölümü kimya laboratuvarına yerleştirilmiştir.

#### **c) Sunum**

**KAHRAMAN, S.D., KÜPLÜLÜ, Ö.**, Süzme Ballarda HMF Değeri ve Diastaz Aktivitesinin Belirlenmesi, Sözlü Sunum, IV. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi 13-16 Ekim, 2011-Antalya.