



**TÜRKİYE'DEKİ
KESTANE ARI POLENLERİNİN
FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN VE
ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

BÜŞRA KARKAR



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DEKİ KESTANE ARI
POLENLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN VE
ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Büşra KARKAR

Doç. Dr. Saliha ŞAHİN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2018
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Büşra KARKAR tarafından hazırlanan "TÜRKİYE'DEKİ KESTANE ARI POLENLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

Başkan: Doç. Dr. Saliha ŞAHİN
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

Üye: Prof. Dr. Ömer KOZ
Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve
Doğa Bilimleri Fakültesi,
Kimya Bölümü

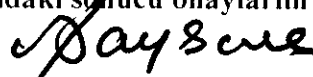
Üye: Doç. Dr. Elif TÜMAY ÖZER
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

Imza


Imza


Imza


Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

28.06.2018

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
 - atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
 - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
 - ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı
- beyan ederim.**

27/06/2018

Büşra KARKAR



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE'DEKİ KESTANE ARI POLENLERİNİN FENOLİK BİLEŞİKLERİNİN VE ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Büşra KARKAR

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Saliha ŞAHİN

Arı poleni, zengin ve doğal gıda içeriğine sahip besinsel ve tıbbi değeri yüksek, vücut tarafından çok çabuk sindirilen, kana karışan ve insanlar tarafından tüketilebilen değerli bir üründür. Arı poleni aminoasit, protein, hormon, enzim, karbohidrat, mineral, yağ, vitamin, fenolik bileşikler, fitokimyasallar ve antioksidatif ajanlar içermektedir. Arı polenin kimyasal içeriği, coğrafi ve botanik özelliklere göre değişmektedir. Bu çalışmada Marmara ve Karadeniz Bölgeleri'nden toplanan kestane arı poleni örneklerinde bulunan fenolik bileşikler ve karotenoidler HPLC-DAD cihazı ile tayin edilmiştir. Örneklerin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasiteleri Folin-Ciocalteu, FRAP (demir iyonu indirgeyici antioksidan güç) ABTS ve CHROMAC (Cr (VI) indirgen antioksidan kapasite) yöntemleri ile belirlenmiştir. Zengin fenolik bileşik içeriğine sahip olan kestane arı poleni örneklerinin Fenton ortamında, DNA oksidasyonunu %11 oranında önlediği tespit edilmiştir. Ayrıca GC-MS/MS ile oksidatif stres sonucu oluşan DNA baz hasar ürünleri incelenmiştir. Kestane arı polenin DNA baz hasar ürünlerinin oluşumunu %68,12 oranında önlediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kestane arı poleni, fenolik bileşik, karotenoid, oksidatif stres, HPLC-DAD

2018, x + 102 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF CHESTNUT BEE POLLEN IN TURKEY

Büşra KARKAR

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Saliha ŞAHİN

Bee pollen is a rich and natural food with high nutritional and medicinal content. It can be very quickly digested by the body, bloodstream and can be consumed by humans. Bee pollen contains amino acids, proteins, hormones, enzymes, carbohydrates, minerals, fats, vitamins, phenolic compounds, phytochemicals and anti-oxidative agents. Chemical composition of bee pollen can be varied according to geographical and botanical features. In this study, phenolic compounds and carotenoids in chestnut bee pollen samples collected from the Marmara and Black Sea regions were determined by HPLC-DAD. The total phenolic contents and antioxidant capacities of the samples were determined by Folin-Ciocalteu, FRAP (ferric reducing antioxidant power), ABTS and CHROMAC (Cr(VI) reduction antioxidant capacity) methods. It was identified that chestnut bee pollen samples with rich phenolic compound content prevented DNA oxidation by 11% in the Fenton environment. In addition, oxidative stress-induced DNA base damage products were examined by GC-MS / MS. It was determined that chestnut bee pollen prevented the formation of DNA base damage products by 68.12%.

Key words: chestnut bee pollen, phenolic compound, carotenoid, oxidative stress, HPLC-DAD

2018, x + 102 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bilgi, deneyim ve disiplinli çalışma prensibiyle bana her zaman yol gösteren, annelik ruhunu ve desteğini üzerimden hiç eksik etmeyen, öğrencisi olmaktan her zaman onur duyduğum danışman hocam Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e,

Öneri ve yardımlarını esirgemeyen, samimi ve içten sohbetleriyle çalışmaktan keyif aldığım değerli hocam Dr. Önder AYBASTIER'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte eğlenip birlikte üzüldüğüm, onları tanımaktan haz duyduğum canım meslektaşlarım Recep KARALI, Buse PARLAK, Merve GÜMRÜKÇÜ, Tuğçe YAZICI ve Tuğba YAPICI'ya,

Deneysel çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Çiğdem YÜKSEL, Eftal Alp DORKEN ve Gökhan ÇOLAKOĞLU'na,

Hayatım boyunca maddi manevi her daim destekçim olan, bana inanan, güvenen, sevgilerini hiç eksilmeden her zaman hissettiğim değerlilerim annem Semiha ve babam Mehmet KARKAR'a,

Her bunaldığımda varlıklarıyla bana huzur veren, zor zamanlarımda en büyük destekçilerim olan kıymetlilerim Ebru ve Derya KARKAR'a

Pozitif enerjisi ile gücüme güç katan, varlığına her an şükrettiğim anne yarım Deniz YILDIZ ve bana olan inancını, sevgisini, desteğini her an hissettiğim canım teyzem Gülşen KÜRKÜT'e,

Her çıkmaza girdiğimde desteğiyle bana yeniden doğru yolu gösteren, zor zamanlarımda yanımda olup bana tekrar ayağa kalkma gücü veren biricik dayım ve en değerli meslektaşım Doğan YILDIZ'a,

Bu tez çalışmasını HDP(F)-2016/66 nolu proje kapsamında destekleyen U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne

TEŞEKKÜR EDERİM.

Büşra KARKAR

.../.../.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Kestane	3
2.2. Kestane Üretimi ve Dünya Sıralaması	4
2.3. Kestane ve Kestane Ürünlerinin Önemi.....	5
2.4. Arı Poleni	5
2.5. Arı Poleninin İçeriği ve Önemi	6
2.6. Fenolik Bileşikler ve Önemi	8
2.7. Polenin Antioksidan Özelliği ve Fenolik Bileşiklerin Tayini	10
2.8. Fenolik Bileşiklerin Spektroskopik Tayini	16
2.9. DNA ve Oksidasyonu	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Tez kapsamında çalışılan kestane arı polenleri.....	18
3.1.2. Tez kapsamında kullanılan cihazlar	18
3.1.3. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar	20
3.1.4. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler	23
3.1.5. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler.....	23
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Kestane arı poleni örneklerinin toplanması	26
3.2.2. Kestane arı poleni örneklerinin palinolojik analizleri.....	27
3.2.3. Örnek hazırlama işlemleri	28
3.2.4. Spektroskopik yöntemler	30
3.2.5. Kromatografik yöntemler.....	36
4. BULGULAR.....	41
4.1. Spektroskopik Yöntemler.....	41
4.1.1. İndirgen şeker tayini.....	41
4.1.2. Toplam fenolik madde tayini	41
4.1.3. Antioksidan kapasite tayini	43
4.1.4. Kestane arı polenlerinin DNA oksidasyonunu önleme etkisi	46
4.2. Kromatografik Yöntemler	47
4.2.1. Fenolik bileşiklerin analizi için validasyon parametrelerinin belirlenmesi	47
4.2.2. Kestane arı poleni örneklerinde bulunan fenolik maddelerin tayini	53
4.2.3. Kestane arı poleni örneklerinde bulunan karotenoidlerin tayini	65
4.2.4. Kestane arı poleni örneklerinin DNA oksidatif baz hasar ürünlerine etkisi	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	75

5.1. Spektroskopik Yöntemler.....	76
5.1.1. Kestane arı poleni örneklerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi	76
5.1.2. Kestane arı polenin DNA oksidasyonuna etkisinin incelenmesi	79
5.2. Kromatografik Yöntemler	79
5.2.1. Kestane arı poleninde bulunan fenolik bileşiklerin tayini	79
5.2.2. Kestane arı poleninde bulunan karotenoidlerin tayini	91
5.2.3. Ekstraksiyonda Kullanılan Çözücülerin ve Ekstraksiyon Yönteminin Etkisi.....	94
5.2.4. Kestane arı polenin DNA hasarını önleme kabiliyetinin incelenmesi	95
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	102



SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
A	Absorbans
dk	Dakika
C	Derişim
eV	Elektrovolt
G	Gram
g/cm ³	Gram/santimetreküp
R ²	Korelasyon Katsayısı
L	Litre
m	Metre
µm	Mikrometre
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
µg/mL	Mikrogram/mililitre
µM	Mikromolar
mbar	Milibar
mg	Miligram
mg/100g	Miligram/100gram
mg/kg	Miligram/kilogram
mg/L	Miligram/litre
mg/mL	Miligram/mililitre
mL	Mililitre
mL/dk	Mililitre/dakika
mM	Milimolar
mm	Milimetre
E	Molar absorpsiyon katsayısı
M	Molarite
ng/L	Nanogram/litre
Nm	Nanometre
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin
2HA	2-hidroksiadenin
FapyGua	2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
28DHA	2,8-dihidroksiadenin
46D5NP	4,6-diamino-5-nitropirimidin
FapyAde	4,6-diamino-5-(formilamino)pirimidin
5H5MH	5-hidroksi-5-metilhidantonin
5HH	5-hidroksihidantonin
5FU	5-formilurasil
5HU	5-hidroksiurasil
5HMU	5-hidroksimetilurasil
5HC	5-hidroksisitozin
5HMC	5-hidroksimetilsitozin
56DHT	5,6-dihidotimin
56DHU	5,6-dihidourasil
8HA	8-hidroksiadenin
8HG	8-hidroksiguanin
Alx	Allakson
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DAD	Diyot seri dedektör
GC	Gaz Kromatografisi
DW	Kuru ağırlık
SIM	Seçili iyon izleme
SRM	Seçili reaksiyon izleme
LOQ	Tayin limiti
LOD	Tespit limiti
TG	Timin glikol
TMCS	Trimetilklorosilan
MS	Kütle spektrometri
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid
UV	Ultraviyole
UV/VIS	Ultraviyole/Görünür bölge
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Antioksidan kapasite tayin yöntemleri	16
Şekil 3.1. Kestane arı poleni örneklerinin lokaliteleri	18
Şekil 3.2. Kestane arı poleni örneklerinin ultrasonik ekstraksiyon akım şeması	29
Şekil 3.3. Kestane arı poleni örneklerinin katı-faz ekstraksiyon akım şeması	30
Şekil 3.4. GC-MS/MS analizi için örnek hazırlama aşamaları	40
Şekil 4.1. DNA'nın oksidatif strese karşı durumu	46
Şekil 4.2. DNA'nın kestane arı poleni varlığında oksidatif strese karşı durumu	47
Şekil 4.3. Standart fenolik bileşiklerin 280 nm'deki kromatogramları	50
Şekil 4.4. M0 numaralı kestane arı poleni etanol ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı	53
Şekil 4.5. Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD kromatogramları	55
Şekil 4.6. Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD karotenoid kromatogramları	66
Şekil 5.1. Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri	80
Şekil 5.2. Kestane arı poleni örneklerinin karotenoid profilleri	92
Şekil 5.3. Kestane polenin DNA baz hasar ürünlerinin oluşumunu önleme etkisi	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa	
Çizelge 2.1.	2000-2009 yılları arasında Dünya'daki kestane üretimi	4
Çizelge 2.2.	Türkiye'de kestane üretiminin durumu	5
Çizelge 2.3.	Arı polenin kimyasal içeriği	7
Çizelge 2.4.	Çeşitli coğrafi bölgelerdeki farklı arı poleni örneklerinin fenolik bileşik içerikleri	12
Çizelge 2.5.	Hidroksil radikalının oluşumu	17
Çizelge 3.1.	Çalışmalarda kullanılan cihazların özellikleri ve kullanım amaçları	19
Çizelge 3.2.	Çalışmalarda kullanılan kimyasallar	20
Çizelge 3.3.	Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler	23
Çizelge 3.4.	Kestane arı poleni örneklerinin lokaliteleri	27
Çizelge 3.5.	İndirgen şeker tayini kalibrasyon verileri	31
Çizelge 3.6.	Toplam fenol tayini kalibrasyon verileri	31
Çizelge 3.7.	ABTS yöntemi kalibrasyon verileri	32
Çizelge 3.8.	FRAP yöntemi kalibrasyon verileri	33
Çizelge 3.9.	CHROMAC yöntemi kalibrasyon verileri	34
Çizelge 3.10.	Fenton reaksiyonu için hazırlanan örnek karışımları	35
Çizelge 3.11.	Fenolik bileşiklerin tayini için HPLC-DAD gradient hareketli faz programı	37
Çizelge 3.12.	Karotenoidlerin tayini için HPLC-DAD gradient hareketli faz programı	38
Çizelge 3.13.	GC-MS/MS cihazı çalışma koşulları	39
Çizelge 3.14.	GC-MS/MS cihazı için sıcaklık programı	39
Çizelge 4.1.	Kestane arı poleni örneğinin indirgen şeker sonuçları	41
Çizelge 4.2.	M0 kestane arı poleni ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı	42
Çizelge 4.3.	Kestane arı poleni örneklerinin toplam fenolik madde miktarları	43
Çizelge 4.4.	M0 kestane arı poleni ekstraktlarının antioksidan kapasite sonuçları	44
Çizelge 4.5.	Kestane arı poleni örneklerinin antioksidan kapasite miktarları	45
Çizelge 4.6.	Standart fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları ve kodlaması	49
Çizelge 4.7.	Standart fenolik bileşiklerin validasyon parametreleri	51
Çizelge 4.8.	M0 numaralı kestane arı polenindeki fenolik madde miktarları (mg/kg örnek)	53
Çizelge 4.9.	Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik madde miktarları (mg/kg örnek)	61
Çizelge 4.10.	Standart karotenoid bileşiklerin alıkonma zamanları ve kodlaması	65
Çizelge 4.11.	Standart karotenoidlerin validasyon parametreleri	65
Çizelge 4.12.	Kestane arı poleni örneklerindeki karotenoid miktarları (mg/kg örnek)	72
Çizelge 4.13.	DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin validasyon parametreleri	73



1. GİRİŞ

Yaşamımız boyunca hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonlar veya UV-ışınları, sigara dumanı, çevre kirlilikleri gibi birçok dış etkenlerle birlikte vücudumuzda serbest radikal oluşumu gerçekleşmektedir. Oluşan bu serbest radikaller oldukça kararsız ve reaktif özellikte olduklarından lipid, protein, DNA gibi hücresel yapılara saldırarak yapılarda oksidatif hasara sebep olurlar. DNA’da oluşan hasarlar yaşlanma, kanser, mutasyon gibi durumların oluşmasına neden olur. Hücrelerde gerçekleşen reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikalleri vücuttaki doğal savunma mekanizmaları önlemektedir. Ancak dış etkenlerle serbest radikal miktarının artmasıyla bu savunma mekanizmaları yetersiz kalır. Dolayısıyla bu serbest radikallerle savaşacak, antioksidan özellik gösteren bileşenlerin vücuda alınması oldukça önem arz etmektedir.

Gıdalar, önemli biyolojik aktiviteleri olan çeşitli sağlık destekleyici maddelerin doğal kaynağıdır. Meyve, sebze ve tıbbi bitkilerin içerdikleri doğal fenolik bileşikler sayesinde gösterdikleri antioksidan etki son yılların en önemli araştırma konuları arasında yer almıştır. Özellikle flavonoidler açısından zengin olan arı ürünleri, sahip oldukları anti-kanserojenik, anti-allerjik, anti-inflamatuar, anti-oksidan gibi biyoaktif özellikleri nedeni ile ilgi çekmektedir. Diğer arı ürünleri gibi zengin ve doğal gıda içeriğine sahip, besinsel ve tıbbi değeri yüksek bir ürün olan arı poleni yüzyıllardır halk tarafından kullanılmaktadır. Aminoasit, protein, hormon, enzim, karbohidrat, mineral, yağ, vitamin, fenolik bileşikler, fitokimyasallar ve antioksidatif ajanlar bakımından oldukça zengin olmasının yanında vücut tarafından çok çabuk sindirilen, kana karışan ve insanlar tarafından tüketilebilen değerli bir üründür. Kimyasal içeriği botanik ve coğrafik özelliklere göre değişkenlik gösteren arı poleni %1-5 oranında fenolik bileşik (flavonoid, fenolik asit, antosiyanin ve tanen) içermektedir.

Dünya’daki kestane üretimi her geçen yıl artış göstermekte ve Türkiye’de bu artışa destek olmaktadır. Türkiye, 2009 yılında gerçekleştirdiği 61 697 tonluk üretimle dünya üçüncüsü olmuştur. Türkiye’nin kestane üretimi açısından Dünya sıralamasında önemli bir yere sahip olması ve literatüre bakıldığında kestane arı polenin fenolik

bileşiklerinin kantitatif analizine dayalı yapılmış bir çalışma olmaması bizim için ilgi çeken nokta olmuştur.

Bu doğrultuda, tez kapsamında Marmara ve Karadeniz bölgelerinin farklı coğrafi kesimlerinden toplanan kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik içeriğinin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Hedeflenen amaç kapsamında, kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik ve karotenoid içerikleri kromatografik olarak belirlenmiştir. Yüksek fenolik içeriği spektroskopik olarak yapılan antioksidan kapasite tayin yöntemleri ile desteklenmiştir. Son olarak kestane arı polenin fenolik maddelerce zengin olması göz önüne alınarak, DNA oksidatif hasarını önleme kabiliyeti incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kestane

Halk arasında ‘dağların ekmeği’ olarak bilinen aynı zamanda yetiştiği mevsimden dolayı ‘hüznün meyvesi’ olarak adlandırılan kestane, *Fagaceae* (kayingiller) familyasının *Castanea* cinsine ait doğal bir orman ağacı meyvesidir (Karahocagil ve Tosun 2004, Karadeniz 2013). Kuzey yarım kürenin nemli-ılıman bölgelerinde yetişen kestane ağacının ilk yerleştiği yerin kesin olmamakla birlikte Anadolu olduğu bilinmektedir. Daha sonra kestane ağacı, Anadolu’dan Yunanistan’a oradan da İspanya ve Güney İtalya’ya yayılmıştır (Karahocagil ve Tosun 2004).

Kestane ağaçları, gençken gri-çatlaksızken ileri yaşlarda kahverengi-çatlaklı bir yapıya dönüşen, 30 m’ye kadar boylanabilen dik bir gövde yapısına sahiptir. Geniş ve sert bir yapıda olan yaprakların üst yüzeyleri parlak yeşil, alt yüzeyleri ise tüylü gri-yeşil, kenarları ise dişlidir. Erkek ve dişi olmak üzere iki çeşit çiçek yapısına sahip olan kestane ağacının meyveleri (tohumları) ise sık-batıcı dikenlerle örtülü bir kabuk içerisinde yer almaktadır (Atasoy ve Altıngöz 2011, Karadeniz 2013).

200-500 yıl kadar yaşayabilen kestane ağaçları meyve türlerine, yaprak/dalların şekil ve tüylenmelerine göre sınıflandırılmaktadır (Atasoy ve Altıngöz 2011). 16 farklı türe sahip olan kestanenin, meyve türlerine göre ticari olarak en önemli türleri maddeler halinde verilmiştir (Atasoy ve Altıngöz 2011).

- *Castanea sativa* Mill.
- *Castanea dentata* Borkh.
- *Castanea mollissima* Bl.
- *Castanea crenata* Sieb.&Zucc.



Kestane Çiçeği

https://www.google.com.tr/search?q=kestank+%C3%A7i%C3%A7e%C4%9Fi&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiah_jhzODbAhWBAJoKHUlrCU8Q_AUICiAU&biw=1242&bih=577#imgcr=79xR74Y94mHbbM:
Erişim tarihi: 18.06.2018



Kestane Meyvesi

https://www.google.com.tr/search?q=kestane+meymeyv&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUahUKEwjDwqXgzUDBAahUKEwj1BL0Q_AUAUICi&biw=1242&bih=577#imgcr=WinrM-jfD-ZXIM:
Erişim tarihi: 18.06.2018

Türkiye’de yetişen kestane türleri *Castanea sativa* Mill türü içerisinde yer almaktadır (Coşkuncu ve Mert 2011).

2.2. Kestane Üretimi ve Dünya Sıralaması

Dünya’da kestane üretimi her geçen yıl artış göstermektedir. Dünya’daki toplam kestane üretimi 2000 yılında 937 747 ton iken 2009 yılında 1 408 329 tona yükselmiştir (Çizelge 2.1). Çin %77’lik (2009 yılı) bir oranla başlıca kestane üretimini gerçekleştiren ülke olmasına rağmen, 1980 yılında kestane üretiminde dünya altıncısı olan Türkiye, 2009 yılında gerçekleştirdiği 61 697 tonluk üretimle dünya üçüncüsü olmuştur (Atasoy ve Altıngöz 2011).

Çizelge 2.1. 2000-2009 yılları arasında Dünya’daki kestane üretimi

Ülkeler	Üretim (Ton)					
	2000	2003	2005	2007	2009	2009 (%)
Çin	465 197	797 168	1 031 860	925 000	1 085 000	77,2
Güney Kore	72 203	60 017	76 447	77 524	73 000	5,2
Türkiye	50 000	48 000	50 000	55 100	61 697	4,4
İtalya	38 884	42 416	52 000	50 000	52 146	3,7
Bolivya	26 752	50 000	57 057	42 801	53 577	3,8
Portekiz	25 910	33 267	22 327	22 000	20 752	1,5
Japonya	20 764	25 100	21 800	22 100	21 700	1,5
Yunanistan	11 900	16 800	19 086	14 999	14 000	1,0
İspanya	7 178	16 821	8 629	15 000	6 090	0,4
Fransa	10 284	10 118	8 144	8 284	8 692	0,6
Kuzey Kore	6 558	9000	11 528	9 000	7 785	0,6
Peru	1 547	759	600	778	864	0,06
Azerbaycan	462	937	1 937	1 887	839	0,06
Dünya	937 747	1 113 652	1 363 986	1 246 554	1 408 329	100

Kestane ağaçları kestane dal kanseri (*Crphonectria parasitica*) ve mürekkep (*Phytophthora cambivora*) hastalıkları ile savaşılmaktadır (Karadeniz 2013, Karahocagil ve Tosun 2004). Ülkemizde kestane üretiminde yıllar geçtikçe artış-azalışların olduğu görülmektedir (Çizelge 2.2). Bu durumda kestane kanseri ve mürekkep hastalığının etkisi büyüktür. Son yıllarda üretimde artış gözlenirse de bu hastalıklarla mücadelede kültürel ve biyolojik önlemler dışında henüz bir yöntem uygulanmamaktadır.

Çizelge 2.2. Türkiye’de kestane üretiminin durumu

Ülke	Üretim (ton)							
	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Türkiye	61 697	59 171	60 270	57 881	60 019	63 762	63 750	64 750

2.3. Kestane ve Kestane Ürünlerinin Önemi

Kestane kerestesi suya dayanıklı olmasından dolayı iskele, kayık, yat ve gemi yapımının yanı sıra ev ve ofis dekorasyonlarında (masa, sandalye, çit, kapı, pencere vb.) kullanılmaktadır. Ayrıca tanen içeriği zengin olan kestanenin meyve kabuğu, dal ve yaprakları boya sanayisinde renk pigmenti olarak kullanılmaktadır.

Kestane meyvesi ise taze ve çerez olarak tüketilmenin haricinde reçel ve konserve sanayisi, bal üretimi, şeker, dondurma ve çikolata sanayisi gibi farklı gıda alanlarında da çok fazla kullanılmaktadır. Ayrıca yeterli buğday ununa sahip olmayan eski toplumlar ‘ekmek ağacı’ olarak ifade ettikleri kestaneyi un olarak kullanmışlardır.

2.4. Arı Polen

Apiterapi; bal, arı sütü, polen, propolis gibi arı ürünlerinin insan sağlığı için kullanılmasıdır ve yüzyıllardır halk tıbbında hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Yıldız ve ark. 2013, Amany ve ark. 2014). Arı ürünleri geleneksel tıbbın yanı sıra besin takviyesi olarak gıda alanında da kullanılmaktadır (İsra ve ark. 2001). Arı poleni, insanlar tarafından tüketilebilen, zengin ve doğal gıda içeriğine sahip besinsel ve tıbbi değeri oldukça yüksek olan özel bir gıda ürünü olarak kabul edilmektedir (Bogdanov 2004). Ayrıca diğer apikültürel ürünlerin yanı sıra anti-bakteriyel, anti-fungal gibi

terapötik özelliklere sahip olmasından dolayı arı poleni son yıllarda artan ilgiye sahiptir (Carpes ve ark. 2007).

“Hayat veren toz” olarak adlandırılan arı poleni zengin protein içeriğinden dolayı bal arısı kolonilerinin hayatta kalması ve yeniden üreyebilmesi için gerekli olan temel besin kaynağıdır (Bogdanov 2004, Roman ve ark. 2007, Kao ve ark. 2011, Pascoal ve ark. 2014). Bitkilere nektar almak için konan işçi arılar, üzerlerine yapışan, bitkilerin erkek üreme organı olan, polen tozlarını ağızlarından çıkan salgı ile birlikte yapışkan hale getirerek arka ayaklarındaki polen sepetçiklerine yerleştirirler. Kovana gelen arılar polen sepetçiklerindeki polenlerin bir kısmını koloninin beslenmesi için kullanırken bir kısmını da kovan girişlerindeki tuzaklara süpürürler (Erdoğan ve Dodoloğlu 2005, Kao ve ark. 2011, Pascoal ve ark. 2014). Tuzaklarda biriken polenler arıcılar tarafından toplanarak temizlenir ve kurutulur.

2.5. Arı Poleninin İçeriği ve Önemi

Arılar tarafından toplanan polen insan tüketimi için potansiyel bir enerji kaynağı olarak düşünülebilir. Arı poleni protein, amino asit, karbohidrat, mineral, yağ, vitamin, hormon, enzim gibi fitokimyasallara ek olarak flavonoidler başta olmak üzere önemli miktarda polifenolik madde içermektedir (Bogdanov 2004, Carpes ve ark. 2007, Eraslan ve ark. 2010, Feas ve ark. 2012, Hegazi 2012, Yıldız ve ark. 2013, Pascoal ve ark. 2014, Ulusoy ve Kolaylı 2014). Ancak arı poleninin kimyasal bileşimi bitki türüne, bitkinin yaşına ve beslenme durumuna, toprak tipine, iklim koşullarına ve arıcılık faaliyetlerine bağlı olarak değişmektedir (Feas ve ark. 2012, Pascoal ve ark. 2014). Buna bağlı olarak arı poleni taneleri biçim, boyut, açıklık, renk gibi morfolojik özellikleri bakımından farklılıklar göstermektedir (Carpes ve ark. 2007). Arı poleninin sahip olduğu bileşenlerin içeriği genel hatlarıyla Çizelge 2.3’te verilmiştir (Erdoğan ve Dodoloğlu, 2005).

Arı poleni antioksidan (Morais ve ark. 2011), anti-bakteriyel (Basim ve ark. 2006), anti-fungal (Özcan 2004), anti-radyasyon (Bevzo 1997), anti-kanser (Furusawa 1995) hepatoprotektif (Eraslan ve ark. 2009), kemoprotektif (Pinto ve ark. 2010), anti-inflamavuar (Maruyama ve ark. 2010) gibi birçok terapötik özelliklere sahiptir (Kao ve

ark. 2011, Feas ve ark. 2012, Carpes ve ark. 2013, Yıldız ve ark. 2013, Pascoal ve ark. 2014, Ulusoy ve Kolaylı 2014). Arı polenin bu terapötik ve koruyucu etkileri bünyesindeki polifenolik madde içeriğinden kaynaklanmaktadır (Pascoal ve ark. 2014).

Çizelge 2.3. Arı polenin kimyasal içeriği

Bileşen	İçerik
Enerji	2,46 kcal/g
Protein	%23,7
Karbohidrat	%27
Yağ	%4,8
Su	%11
İndirgenmiş şeker	%26
İndirgen olmayan şeker	%3
Nişasta	%3
Aminoasit	Bilinen tüm aminoasitler
Enzim	Diastaz, fosfotaz, amilaz vb.
Vitaminler	C, E, B1, B2, B3, B5, B6, B9
Mineraller	Makro Elementler: K, Na, Ca, Mg, P, S. İz Elementler: Al, B, Cl, Cu, I, Fe, Mn, Ni, Si, Ti, ve Zn.
Büyüme düzenleyicileri	Auxins, brassins, gibberellins, kinins
Flavonoidler	En az 8 çeşit
Karotenoidler	En az 11 çeşit
Organik asitler	Fenolik asitler dahil en az 6 çeşit

Zengin ve doğal içeriği sebebiyle günlük ihtiyacımız olan bileşenleri karşılamamıza büyük ölçüde yardımcı olan arı poleni vücudumuz için oldukça önemli bir besin maddesidir. Arı poleni soğuk algınlığı, solunum yolu hastalıkları, kardiyovasküler ve sindirim sistemi hastalıkları, ülser, anemi gibi hastalıkların tedavisinde yararlı etkileri olduğu tespit edilmiştir (Medeiros ve ark. 2008, Kao ve ark. 2011, Pascoal ve ark. 2014, Ulusoy ve Kolaylı 2014). Ayrıca arı polenin;

- Alerjik hastalıkların tedavisinde etkili olduğu,
- Aşırı stresin etkisini ortadan kaldırdığı,
- Büyüme ve gelişmenin hızlanmasında etkili olduğu,
- Zekâyı kuvvetlendirdiği,
- Prostatı iyileştirici etkiye sahip olduğu,
- Saç dökülmelerini önlediği,
- Yanık ve yaraların tedavisinde etkili olduğu,
- Yüksek tansiyon hastaları için iyileştirici etkisi olduğu,
- Mikrop öldürücü etkiye sahip olduğu,
- Kısırlık sorununun çözülmesinde etkili olduğu,
- Radyasyon ve X-ışınlarının zararlı etkilerinden koruduğu,
- Yaşlanmayı geciktirdiği

rapor edilmiştir.

Arı poleni apiterapi dışında,

- Verimliliklerini ve gelişimlerini arttırmak için evcil hayvanların beslenmesinde,
- Gıda sanayisinde pasta, kek, çörek gibi ürünlerin yapımında,
- Hücre yenileyici etkisi sayesinde kozmetik sanayisinde krem, yüz temizleme losyonu, yüz temizleme sütü gibi ürünlerin yapımında kullanılmaktadır.

2.6. Fenolik Bileşikler ve Önemi

Benzen halkasına bir ya da daha fazla hidroksil (-OH) grubunun bağlı olduğu bileşikler polifenoller ya da fenolik bileşikler olarak adlandırılır. Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve bitkisel fenoliklerin en önemli kısmını oluşturan flavonoidler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin lezzetinin oluşmasında aynı zamanda renklerinin belirlenmesinde etkili olan doğal bileşenlerdir. Genellikle güçlü antioksidan aktivitelerine atfedilen sağlığa yararlı etkileriyle bilinirler. Emilimden önce gastrointestinal sistemde görülürler. Flavonoidler elde edilen yüksek konsantrasyonları sebebiyle gastrointestinal sistemde direk antioksidan etki gösterebilir veya toksin metabolize edici enzimleri düzenleyebilirler (Sousa ve ark. 2015).

Antioksidan aktivite genellikle antioksidan enzimlerinin (peroksidaz, katalaz vb.) aktivitesine bağlı olduğu kadar karotenoid, askorbik asit, tokoferoller ve fenolik maddeler gibi düşük moleküllü bileşenlerin içeriğine de bağlıdır (Leja ve ark. 2007). Antioksidan bileşiklerin en önemli kaynakları insan beslenmesi için sağlığı geliştiren meyve ve sebzelerdir (Leja ve ark. 2007). Meyve ve sebzelerin sahip olduğu bu antioksidan özellikler bünyelerinde barındırdıkları C-E vitaminleri ve karotenoidlerden çok flavonoidlerden kaynaklanmaktadır. Besin fitokimyasallarının antioksidatif aktivitesi, yüksek miktarda meyve ve sebze tüketen popülasyonlarda insan dejeneratif hastalıklarında azalma ile ilişkilendirilmiştir (Caldwell 2003).

Flavonoidler, insan vücudunda metabolizma sonrası ortaya çıkan serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif hasarı etkisiz hale getirerek, doku fonksiyonlarının bozulması sonucu ortaya çıkan birçok hastalığa neden olabilecek zincir reaksiyonları önlediği bilinmektedir (Leja ve ark. 2007, Kolaç ve ark. 2017). Bu doğal antioksidanların (flavonoidler) serbest radikal süpürücü özellikleri ile reaktif oksijen türleri arasındaki etkileşimi; iltihaplanmalarda, kalp hastalığı veya kanser gibi anjiyogenez ile ilgili hastalıklarda olumlu etkilere sebep olmaktadır (Saric ve ark. 2009). Flavonoidler farklı yapısal özelliklere sahiptirler ve bu farklı yapılarından dolayı çeşitli biyolojik aktiviteler gösterirler. Epidemiyolojik çalışmalar, fenolik antioksidanların tüketiminin artması ile kardiyovasküler hastalık ve belirli kanser türlerine yakalanma riskinin azalması arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Cook ve Samman 1996, Pinto ve ark. 2010). Ayrıca flavonoidlerin östrojenik ve anti-östrojenik etkileriyle menopozal semptomları ve menopoz sonrası osteoporozu önleyebileceği veya hafifletebileceği, kadınlarda meme kanserinin önlenmesinde kullanılabileceği önerilmiştir (Oh ve Chung 2006, Saric ve ark. 2009).

Flavonoidlerin antioksidan ve radikal süpürücü özellikleriyle tanınmalarının yanı sıra anti-mikrobiyal, anti-fungal, anti-radyasyon, immünomodülatör ve anti-inflamatuar aktiviteleri ile de bilinir, proinflamatuvar sitokin üretimini ve reseptörleri inhibe ederler. Ayrıca alerjik ve inflamatuvar tepkilerde yer alan birçok enzim sistemini etkilemektedirler (Medeiros ve ark. 2008, Pascoal ve ark. 2014). Flavonoidler antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-kanser aktivitenin yanı sıra in-vitro hücre sistemlerinde mutajenik, pro-oksidan veya pro-apoptotik oldukları kanıtlanmıştır (Pinto ve ark. 2010).

Gıdalar, önemli biyolojik aktiviteleri olan çeşitli sağlık destekleyici maddelerin doğal kaynağıdır. İnsan sağlığını geliştirmek için gıda bileşenlerinin fonksiyonel ve besinsel özellikleri incelenmektedir. Meyve, sebze ve tıbbi bitkilerin farklı fenolik içerikleri ile antioksidan özellikleri arasındaki karşılıklı bağımlılık uzun yıllardan beri incelenmektedir (Leja ve ark. 2007). Özellikle flavonoidler açısından zengin olan bal arısı ürünlerinin araştırılması son yıllarda önem ve hız kazanmıştır (Leja ve ark. 2007). Fenolik bileşiklerin araştırılmasında ve antioksidan kapasitenin belirlenmesinde çeşitli yöntemler mevcuttur. Ancak bu yöntemler deney prensipleri ve koşulları açısından farklılık göstermektedirler (Mohdaly ve ark. 2015). Bu nedenle sağlam, hassas, seçici ve güvenilir analitik tekniklerin kullanılması son derece önemlidir (Fanali ve ark. 2013). Flavonoid ve türevlerinin nitel ve nicel olarak incelenmesinde kullanılan en popüler ve en güvenilir kromatografik teknikler; HPLC-DAD (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diyot Serili Dedektör), HPLC-MS (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Dedektörü), UHPLC (Ultra-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), LC-UV (Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör) ve LC-MS olarak sıralanabilir (Sıvı Kromatografisi-Kütle Dedektörü) (Fanali ve ark. 2013).

2.7. Polenin Antioksidan Özelliği ve Fenolik Bileşiklerin Tayini

İşlenmiş gıdalar yapay tatlar, renklendirici maddeler, emülsiyeye edici bileşenler, stabilizatörler ve sentetik antioksidanlar içermektedir. Bütil hidroksi anisol (BHA) ve bütil hidroksi tolüen (BHT) gibi sentetik fenolik bileşikler gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda bu sentetik fenolik bileşiklerin düzenli olarak kullanımının sağlıksız ve kanserojen olabileceği yönünde endişeler ortaya

çıkmaya başlamıştır. Bu nedenle sentetik bileşenlerin yerini doğal bileşenlerin almasına yönelik gıda bilimcileri tarafından yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (Carpes ve ark. 2013, Mohdaly ve ark. 2015).

Arı poleni antioksidanlar olarak hareket edebilen vitaminler ve başlıca flavonoidler olmak üzere polifenolik bileşenlerce zengin olan doğal bir besin maddesidir (Ulusoy ve Kolaylı 2014). Çeşitli çalışmalar polifenollerin redoks özellikleri olan, indirgeyici ajanlar olarak hareket eden antioksidanlar olduğunu ortaya koymuştur (Caldwell 2003). Örneğin Cheng ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, fareler tarafından alınan arı polenin lipit oksidasyon ürünlerinin seviyesini düşürdüğü ve antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Arı poleni üzerine yapılan çalışmalarda, farklı coğrafi veya bitkisel kökenli yetişen bitkilerden toplanan polenlerin farklı fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu görülmüştür (Saric ve ark. 2009). Çizelge 2.4'te farklı coğrafi bölgelerdeki farklı türde toplanan arı poleni örneklerinin fenolik bileşik içerikleri verilmiştir.

Çizelge 2.4. Çeşitli coğrafi bölgelerdeki farklı arı poleni örneklerinin fenolik bileşik içerikleri

Polen Türü	Ekstraksiyon Türü	Analiz Yöntemi	Fenolik Bileşik	Kaynak
Sığırkuyruğu	Çözücü (Metanol) Ekstraksiyonu	LC-MS	Siyanidin-3-O-glikozit, Siyanidin-3-O-rutinosid, Siyanidin-3-(6''-malonyl-glikozit), Peonidin-3-O-rutinosid, Delfinidin-3-O-rutinosid, Delfinidin-3-O-glikozit, Petunidin-3-O-glikozit	Naranjo ve ark. 2004
Çiçek poleni	Çözücü (Etanol) Ekstraksiyonu	oaTOF-MS	Asetin glikozit, 7-O-metilherbasetin-3-sophorosid, Galloyl-glikoz, Kuersetin-3-sophorosid, Apigenin-6,8-di-C-glikozit, Kuersetin-3-rutinosid, Genistein-7-O-β-D-glikozit, Luteolin-7-O-glikozit, Apigenin-7-O-glikozit, 2',4',6'-trihidroksi-3'-formildihidrokalon	Roman ve ark. 2007
Çiçek poleni (Mimoza, Okalipütüs, Cecropia ve Sugüveyiotu)	Çözücü (Metanol) Ekstraksiyonu	HPLC-DAD	Mirisetin, Tirisetin, Kamferol, Luteolin	Medeiros ve ark. 2008

Çizelge 2.4. (Devam) Çeşitli coğrafi bölgelerdeki farklı arı poleni örneklerinin fenolik bileşik içerikleri

Laden	Çözücü (Metanol) Ekstraksiyonu	HPLC-UV/Vis	Kamferol, Kuersetin, Mirisetin, İsorhamnetin, Galangin, Taksifolin, Luteolin, Pinocembrin, Naringenin, Genistein, Daidzein, Krisin, Kafeik asit	Saric ve ark. 2009
<i>Cistus</i> sp. <i>Brassica</i> sp.	Çözücü (Etanol) Ekstraksiyonu	HPLC-DAD	Kuersetin-7-ramnosid, Kamferol-3-glikozit, Kuersetin, Kamferol, İsorhamnetin	Maruyama ve ark. 2010
<i>C. incanus</i> L. <i>S. alba</i> L.	Çözücü (Etanol) Ekstraksiyonu	HPLC-UV/Vis	Kafeik asit, Kumarik asit, Galangin, İsorhamnetin, Kamferol, Mirisetin, Kuersetin, Luteolin, Krisin, Daidzein, Genistein, Naringenin, Pinocembrin, Taksifolin	Pinto ve ark. 2010
Çay	Çözücü (Etanol) Ekstraksiyonu Çözücü (Su) Ekstraksiyonu	RP-HPLC	Gallik asit, Metil gallat, <i>p</i> -kumarik asit, Ferulik asit, Kafeik asit, Mirisetin, Rutin, Kateşin, Klorojenik asit	Kao ve ark. 2011
<i>S. chinensis</i>	Çözücü (Etanol) Ekstraksiyonu	HPLC-DAD	Gallik asit, Protokatekuik asit, Vanilik asit, <i>p</i> -kumarik asit, Resveratrol, Kuersetin, Hesperetin, Kamferol, Galangin	Cheng ve ark. 2013
Çiçek poleni	Çözücü (Metanol) Ekstraksiyonu	Nano-LC	Gallik asit, Protokatekuik asit, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit, Gentisik asit, Vanilik asit, Kafeik asit, Siringik asit, <i>p</i> -kumarik asit, Ferulik asit, <i>o</i> -kumarik asit, Mirisetin, Kuersetin, Sinamik asit, Naringenin, Hesperetin, Kamferol	Fanali ve ark. 2013

Çizelge 2.4. (Devam) Çeşitli coğrafi bölgelerdeki farklı arı poleni örneklerinin fenolik bileşik içerikleri

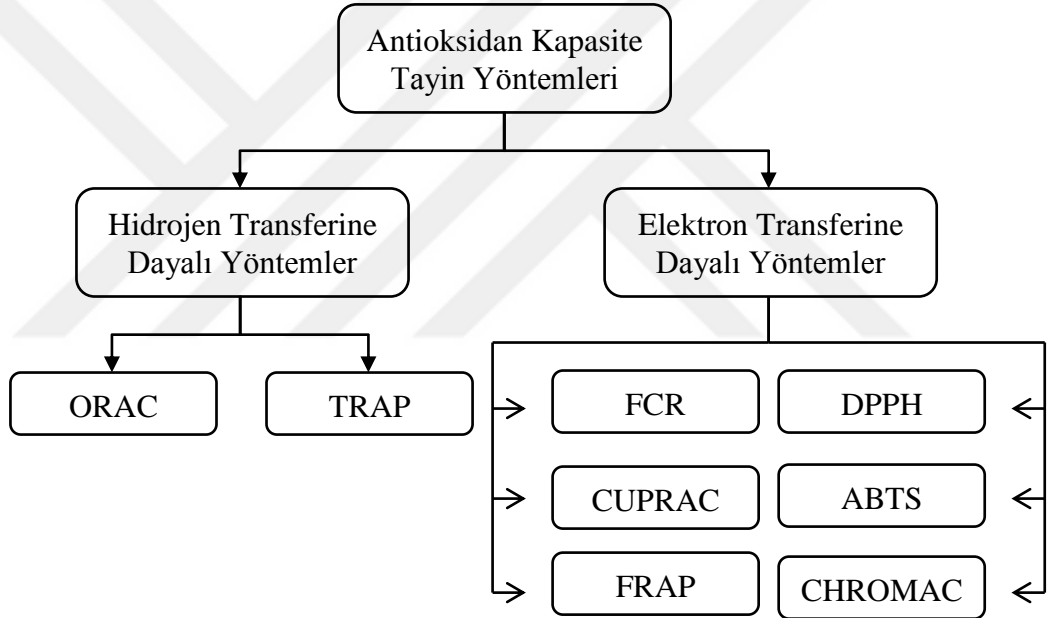
Anzer	Çözücü (Etanol) Ekstraksiyonu	RP-HPLC	Gallik asit, Kafeik asit, <i>p</i> -kumarik asit, Protokatekuik asit, Ferulik asit, <i>o</i> -kumarik asit, Epikateşin, Benzoik asit, Vanilik asit, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit, Siringik asit, Klorojenik asit, <i>trans</i> -sinamik asit, Kateşin, Rutin, 2,4-cis,trans-absisik asit,	Ulusoy ve Kolaylı 2013
Arı poleni	Çözücü (Metanol) Ekstraksiyonu	HPLC	Gallik asit, Vanilik asit, Siringik asit, <i>p</i> -kumarik asit, Ferulik asit, Kafeik asit, Kuersitrin, Kateşin, Epikateşin, α -kateşin, Kamferol, Apigenin, 3,4-dimetoksisinamik asit, Naringenin, Luteolin	Mohdaly ve ark. 2015
<i>E. plantagineum</i>	Çözücü (Metanol) Ekstraksiyonu	HPLC-DAD	Kamferol-3-O-(4"-rhamnosil)-neohesperidosid, Kamferol-3-O-sophorosid, Kamferol-3-O-neohesperidosid, Kamferol-3-O-neohesperidosid-7-O-rhamnosid, Kamferol-3-O-glikozit, Kamferol-3-O-rutinosid + Kamferol-3-O-(3"/4"-asetil)-neohesperidosid, Delfinidin-3-O-glikozit, Delfinidin-3-O-rutinosid, Petunidin-3-O-glikozit, Petunidin-3-O-rutinosid, Malvidin-3-O-rutinosid	Sousa ve ark. 2015

Çizelge 2.4. (Devam) Çeşitli coğrafi bölgelerdeki farklı arı poleni örneklerinin fenolik bileşik içerikleri

Karpuz tohumu, kolza, kamelya, gelincik, mısır, aslan kulağı, karabuğday, susam, bakla, gül	Sıvı-sıvı Ekstraksiyon Soxhlet Ekstraksiyonu Ultrasonik-destekli Ekstraksiyon (Etanol)	LC-MS/MS	Kamferol-3-O-β-D-glukosil-(2→1)-β-D-glikozit, Quercetin-3-O-β-D-glukosil-(2→1)-β-glikozit, Kamferol-3,4'-di-O-β-D-glikozit	Zhou ve ark. 2015
Arı poleni	Çözücü (Etanol) Ekstraksiyonu	HPLC-PDA	<i>p</i> -kumarik asit, Ferulik asit, Rutin, Mirisetin, <i>trans</i> -sinamik asit, Kuersetin, Kamferol	Almeida ve ark. 2017

2.8. Fenolik Bileşiklerin Spektroskopik Tayini

Fenolik bileşikler, kolayca okside olabilen bileşenlerin oksidasyonunu büyük ölçüde önleyen bileşenler olarak bilinmektedirler. Bu nedenle doğal fenolik bileşiklerce zengin olan gıda ürünlerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi günümüzde ilgi odağı olmuştur. Antioksidan kapasiteyi belirlemek için çok fazla yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemler elektron ve hidrojen atomu transferi olmak üzere Şekil 2.1’de belirtildiği gibi iki türe ayrılmaktadır (Albayrak ve ark. 2010, Şahin ve Demir 2013). Analizlerde gerçekleşen renk değişimleri antioksidan maddenin miktarına göre değişmektedir.



Şekil 2.1. Antioksidan kapasite tayin yöntemleri

2.9. DNA ve Oksidasyonu

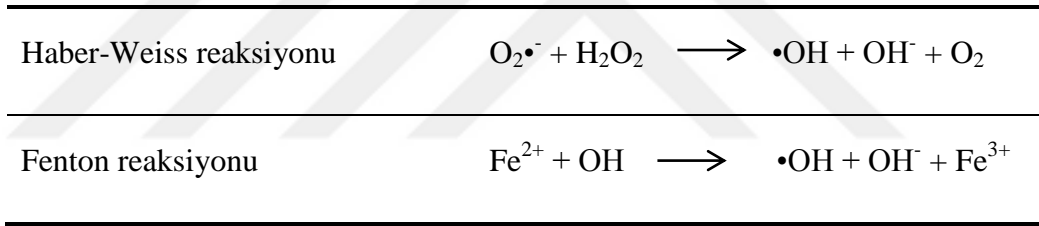
DNA, tüm organizmaların hücresel işlevselliği için önemli olan ve genetik bilgileri taşıyan bir biyomakromoleküldür. Pürin (adenin ve guanin) ve pirimidin (sitozin ve timin) bazları arasındaki hidrojen bağları ile çift zincirli sarmal bir yapıya sahiptir (Hari ve ark. 2012). DNA'nın yapısının çeşitli sebeplerle bozulması olayına denatürasyon

denir ve bu bozulma 260 nm dalga boyundaki absorbansın ölçülmesiyle belirlenmektedir (Akçay 2006).

Serbest radikaller; vücudun kendi metabolizması esnasında, UV ışını, sigara, stres, karbon monoksit, ozon, hava kirliliği, ilaç toksinleri gibi birçok etken tarafından oluşan, eşleşmemiş elektron içeren, kararsız ve reaktif olan bileşenlerdir. Bu reaktif olma özelliklerinden dolayı hücrelere, protein ve DNA'ya saldırarak hasar oluştururlar. DNA'nın yapısındaki pürin ve pirimidin bazlarına saldırması ile çeşitli DNA baz hasar ürünleri oluşur (Dizdaroglu 2012).

Serbest radikaller arasında biyomoleküllerle daha güçlü reaksiyona girmelerinden dolayı en toksik ve en reaktif özelliğe sahip olan hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu ile oluşmaktadır (Çizelge 2.5) (Karabulut ve Gülay 2016).

Çizelge 2.5. Hidroksil radikalının oluşumu



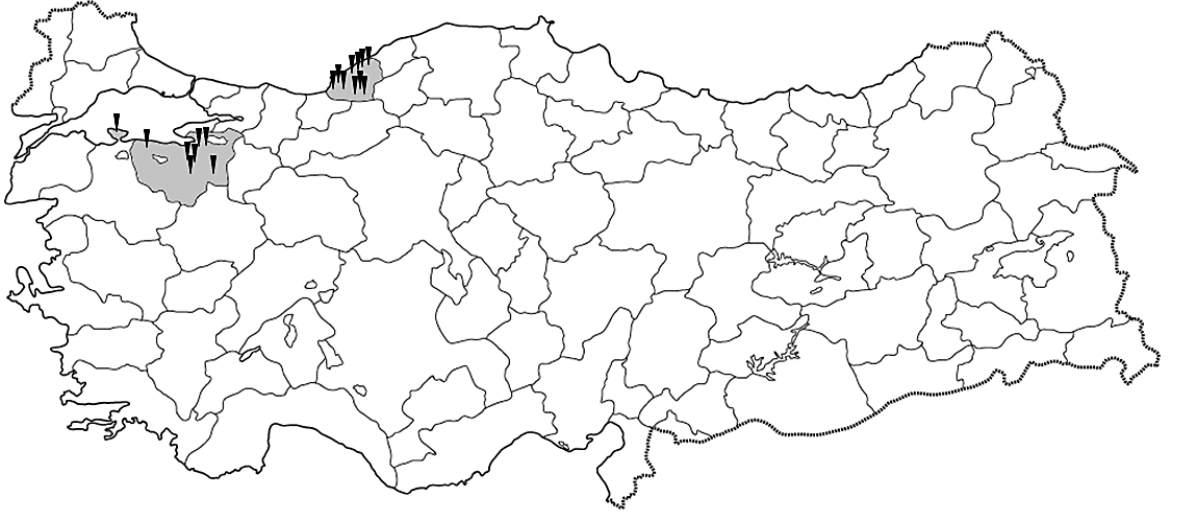
Biyolojik sistemlerde önemli bir role sahip olan demir, canlı hücrelerde serbest formda iken toksik etki göstermektedir. Bu toksik etki sonucu DNA, lipit, protein gibi yapılarda meydana gelebilecek olan hasarlar, serbest demirin fazlasını demirin toksik olmayan formlarına dönüştüren hücre savunma mekanizmaları yardımıyla önlenmektedir (Albertsen 2006). Ancak dış etkenlerle serbest radikal miktarının artmasıyla bu savunma mekanizmaları yetersiz kalır ve oksidatif stres denilen durum oluşur. Oksidatif stres sonucu DNA'da meydana gelen hasar, yaşlanma, kanser, mutasyon gibi durumlar oluşur (Sastre ve ark 2000).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tez kapsamında çalışılan kestane arı polenleri

Tez kapsamında 2016 yılında Marmara bölgesi Bursa/Uludağ/Cumalıkızık köyünden toplanan kestane arı poleni örneği ve 2017 yılında Karadeniz ve Marmara bölgelerinin farklı lokalitelerinden toplanan 17 kestane arı poleni örneği olmak üzere toplam 18 farklı örnek ile çalışılmıştır. Kestane arı poleni örnekleri Bursa (7 adet), Balıkesir (1 adet) ve Zonguldak (10 adet) illerinde yer alan kestane ormanlarında faaliyetlerini sürdüren arıcılardan temin edilmiştir. Arıcılar tarafından toplanan kestane poleni örneklerinin lokaliteleri Şekil 3.1’de gösterilmektedir. Örnekler analiz süresine kadar -24°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Kestane arı poleni örneklerinin lokaliteleri

3.1.2. Tez kapsamında kullanılan cihazlar

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan cihazların özellikleri ve kullanım amaçları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmalarda kullanılan cihazların özellikleri ve kullanım amaçları

Cihaz Adı	Özellikleri	Kullanım Amacı
UV-VIS Spektrofotometresi	Cary 50 Conc, Varian	Kestane arı polenlerinin fenolik madde ve antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve DNA oksidasyonuna etkisinin incelenmesi çalışmalarında kullanılmıştır.
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi-diod serili dedektör (HPLC-DAD)	1200 Series, Agilent Technologies	Kestane arı polenlerindeki fenolik madde ve karotenoidlerin kantitatif tayininde kullanılmıştır.
Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi /kütle spektrometresi (GC-MS/MS)	Trace 1300, Thermo Scientific	DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin tayininde kullanılmıştır.
Liyofilizatör	FreeZone 2,5 Plus, Labconco	Oksidatif baz hasar ürünlerinin belirlenmesinde örnek hazırlama aşamasında kullanılmıştır.
Çoklu manyetik karıştırıcı	MS-MP8, Wisd	Analizlerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	Are, Velp	Analizlerde kullanılacak çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Ultrasonik banyo	2,8 L, United	Kestane arı poleni örneklerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.
pH metre	HI 221, Hanna	Analizlerde kullanılacak tampon çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
Santrifüj	Z 206 A, Hermle	Kestane arı polenlerinin örnek hazırlama aşamasında kullanılmıştır.
Peristaltik pompa	Watson 323, Marlow	Kestane arı polenlerinin katı faz ekstraksiyonu aşamasında kullanılmıştır.
Etüv	DRY-Line, VWR	DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin tayininde türevlendirme amacıyla kullanılmıştır.
Vorteks karıştırıcı	VM-10, Wisd	Türevlendirme aşamasında örnek hazırlamada kullanılmıştır.
Analitik terazi	MS105DU, METTLER ($\pm 0,00001$ g hassasiyet)	Kestane arı polenlerinin ve analizlerde kullanılacak kimyasalların tartımında kullanılmıştır.
Saf su cihazı	Option Q DV25, Elga Purelab	Analizlerde kullanılan saf suyun temininde kullanılmıştır.

3.1.3. Tez kapsamında kullanılan kimyasallar

Analitik saflıktaki kimyasallar

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmalarda kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma	Katalog Numarası
(-)-epigallokateşin	Extrasynthese	0979 S
(-)-epigallokateşin gallat	Extrasynthese	0981 S
(-)-epikateşin	Extrasynthese	0977 S
(+)-kateşin	Extrasynthese	0976 S
α -karoten	Sigma-Aldrich	40395
β -karoten	Sigma-Aldrich	C4582
β -kriptoksantin	Extrasynthese	0317 S
1,5-difenilkarbazit	Sigma-Aldrich	259225
2-hidroksiadenin	TRC	I819000
2,4,6-tris (2-piridil)-s-triazin	Sigma-Aldrich	93285
2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin	Pubchem	127546
2,8-dihidroksiadenin	TRC	D45105
4,6-diamino-5-formamidopirimidin	Santa Cruz	217034
4,6-diamino-5-nitropirimidin	Sigma-Aldrich	S454605
5-formil urasil	IS Chemical Tech	1195080
5-hidroksi-5-metilhidantonin	TRC	H947500
5-hidroksihidantonin	TRC	H943000
5-hidroksimetil sitozin	TRC	H945870
5-hidroksimetil urasil	Sigma-Aldrich	852589
5-hidroksiurasil	Pubchem	73268
5-hidroksisitozin	Pubchem	3014752
5,6-dihidroksi metilurasil	Sigma-Aldrich	D7628
5,6-dihidrotimin	TRC	D449440
8-hidroksi-2'-deoksiguanozin	Sigma-Aldrich	H5653
8-hidroksiadenin	Pubchem	5355054
ABTS	Sigma-Aldrich	A1888

Çizelge 3.2. (Devam) Çalışmalarda kullanılan analitik saflıktaki kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma	Katalog Numarası
Alloksan	Titan Biotech	2244113
Amentoflavon	Hwi Analytik GmbH	1617-53-4
Amonyum heptamolibdat tetrahidrat	Merck	101180
Asetik asit	Merck	100063
Astaksantin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	CA10307000
Apigenin	Sigma-Aldrich	10798
Bakır (II) sülfat pentahidrat	Sigma-Aldrich	209198
Buzağı timüs DNA'sı	Sigma-Aldrich	D4522
D-(+) Glikoz	Sigma-Aldrich	47829
Demir (III) klorid	Merck	803945
Demir (II) sülfat heptahidrat	Merck	103965
Ellagik asit	Sigma-Aldrich	E2250
Etanol	Merck	100983
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma-Aldrich	F9252
Formik asit	Merck	100264
Fosforik asit	Merck	100563
Galangin	Extrasynthese	1114 S
Gallik asit	Sigma-Aldrich	27645
Genkvanin	Extrasynthese	1147
Hidrojen peroksit	Sigma-Aldrich	16911
Hidroklorik asit	Merck	100314
Hiperozid	HWI Analytik GMBH	482-36-0
İsorhamnetin	Sigma-Aldrich	17794
Kamferol	Sigma-Aldrich	K0133
Kafeik asit-fenetil ester	Sigma-Aldrich	C8221
Klorojenik asit	Sigma-Aldrich	C3878
Krisin	Sigma-Aldrich	95082
Kuersetin-3-β-D-glikozit	Sigma-Aldrich	17793
Kuersitrin	Hwi Analytik GmbH	117-39-5
L-triptofan	Sigma-Aldrich	T0254
Lutein	Extrasynthese	0306 S
Luteolin	Hwi Analytik GmbH	491-70-3

Çizelge 3.2. (Devam) Çalışmalarda kullanılan analitik saflıktaki kimyasallar

Kimyasal Adı	Firma	Katalog Numarası
Metanol	Merck	106007
Mirisetin	Sigma-Aldrich	70050
N,O-Bis(trimetilsilil)trifloroasetamid	Sigma-Aldrich	15222
Naringin	Sigma-Aldrich	71162
<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	Sigma-Aldrich	240141
Pinocembrin	Sigma-Aldrich	P5239
Piridin	Sigma-Aldrich	270970
Potasyum dikromat	Sigma-Aldrich	207802
Potasyum klorür	Sigma-Aldrich	746436
Potasyum peroksidisülfat	Merck	105091
Protokatekuik asit	Sigma-Aldrich	08992
Rosmarinik asit	Sigma-Aldrich	536954
Salisilik asit	Sigma-Aldrich	247588
Sodyum arsenat dibazik heptahidrat	Sigma-Aldrich	A6756
Sodyum asetat trihidrat	Sigma-Aldrich	S8625
Sodyum bikarbonat	Merck	106329
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck	141677
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	795429
Sodyum karbonat	Sigma-Aldrich	791768
Sodyum potasyum tartarat tetrahidrat	Sigma-Aldrich	217255
Sodyum sülfat	Merck	106649
Sülfürik asit	Merck	100731
<i>ter</i> -bütil metil eter	Merck	101845
<i>trans</i> -kalkon	Sigma-Aldrich	136123
Trietilamin	Merck	808352
Trimetilklorosilan	Merck	102333
Troloks	Sigma-Aldrich	238813
Vanilik asit	Merck	841025
Viteksin	Sigma-Aldrich	49513
Zeaksantin	Dr. Ehrenstorfer GmbH	CA17947500

3.1.4. Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler

Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler Çizelge 3.3 'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmalarda kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Firma	Katalog Numarası	Özellikleri
Bond Elut C18 kartuş	Agilent Technologies	14256023	5 g / 20 mL / 120 µm
Mikropipet	Eppendorf Research	Z683809	10 – 100 µL
Mikropipet	Eppendorf Research	Z683825	100 – 1000 µL
Mikropipet	Eppendorf Research	Z683833	500 – 5000 µL

3.1.5. Tez kapsamında kullanılan çözeltiler

İndirgenmiş şeker tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- A çözeltisi: 2,5 g susuz Na_2CO_3 , 2 g NaHCO_3 , 2,5 g $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ve 20 g susuz Na_2SO_4 saf su ile çözülerek toplam hacim 100 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.
- B çözeltisi: 15 g CuSO_4 ve 1 damla derişik H_2SO_4 (%85, $1,84 \text{ g/cm}^3$) saf su ile çözülerek toplam hacim 100 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Alkali bakır tartarat çözeltisi: 96 mL A çözeltisi ve 4 mL B çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.
- Arsenomolibdat reaktif çözeltisi: 45 mL saf suda çözülmüş 2,5 g $(\text{HH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2$, 2,5 mL derişik H_2SO_4 ($1,84 \text{ g/cm}^3$) ve 25 mL saf suda çözülmüş 0,3 g $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ karıştırılıp 37°C 'de 48 saat boyunca inkübe edilerek hazırlanmıştır.
- Glikoz çözeltisi: 10 mg $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ bir miktar saf su ile çözülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak 100 mg/L glikoz çözeltisi hazırlanmıştır.

Toplam fenolik madde tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- Lowry A çözeltisi: 0,1 M NaOH içinde %2'lik Na_2CO_3 çözülerek hazırlanmıştır.
- Lowry B çözeltisi: %1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ içinde %5'lik CuSO_4 'ın çözünmesiyle hazırlanmıştır.

- Lowry C çözeltisi: Lowry A ve Lowry B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.
- Folin-Ciocalteu çözeltisi: Folin-Ciocalteu reaktifinin 1:3 oranında saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Gallik asit çözeltisi: 0,1 g gallik asit az miktarda metanol ile çözülüp toplam hacim 100 mL'ye metanolla tamamlanarak hazırlanmıştır.

Antioksidan kapasite tayininde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

ABTS yöntemi:

- ABTS radikal çözeltisi: 7 mM ABTS çözeltisi içinde 2,45 mM $K_2S_2O_8$ su ile çözülerek 24 saat boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. 24 saat sonra ABTS radikal çözeltisi su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanmıştır.
- Troloks çözeltisi: 0,1 g troloks az miktarda metanol ile çözülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

FRAP yöntemi:

- Sodyum asetat çözeltisi (0,1 M): 1,36 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ saf su ile çözülerek toplam hacim 100 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Asetik asit çözeltisi (0,1 M): 0,6 mL derişik CH_3COOH (%99,5, 1,05 g/cm³) çözeltisinin saf su ile 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır.
- pH 3,6 asetat tamponu: 92,5 mL 0,1 M CH_3COOH ve 7,5 mL 0,1 M CH_3COONa çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.
- Hidroklorik asit çözeltisi (40 mM): 332 μ L derişik HCl (12,06 M)'in saf su ile 100 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır.
- TPTZ çözeltisi (10 mM): 0,3 g 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (TPTZ) 40 mM HCl içinde çözülerek toplam hacim 100 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.
- Demir (III) klorür çözeltisi (20 mM): 0,3 g $FeCl_3$ saf su ile çözülerek toplam hacim 100 mL olacak şekilde hazırlanmıştır.
- FRAP çözeltisi: pH 3,6 tamponu, TPTZ ve $FeCl_3$ klorür çözeltilerinin sırasıyla 10:1:1 oranlarında karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

- Troloks çözeltisi (1 mM): 25 mg troloks az miktarda metanol ile çözülüp 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

CHROMAC yöntemi:

- pH 2,8 fosfat tamponu: 6,24 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ az miktarda su ile çözülerek %85'lik H_3PO_4 ($1,685 \text{ g/cm}^3$) (0,68 mL) ile asitlendirilir ve toplam hacim su ile 1 L'ye tamamlanır.
- Potasyum klorür çözeltisi (0,2 M): 0,3725 g KCl tartılarak saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- Hidroklorik asit (0,2 M): 41,45 mL derişik HCl (12,06 M) saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak ara stok 10 M HCl hazırlanmıştır. Hazırlanan ara stoktan 0,5 mL alınarak saf su ile 25 mL'ye tamamlanarak 0,2 M HCl çözeltisi hazırlanmıştır.
- pH 1,2 tamponu: 25 mL 0,2 M KCl ve 42,5 mL 0,2 M HCl karıştırılıp saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- Potasyum dikromat çözeltisi: 5 mg $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ toplam hacim 100 mL olacak şekilde pH 2,8 tamponu ile çözülerek hazırlanmıştır.
- 1,5-difenilkarbazit çözeltisi ($3,4 \times 10^{-4}$ M): 0,08 mg 1,5-difenilkarbazit toplam hacim 100 mL olacak şekilde pH 2,8 tamponu ile çözülerek hazırlanmıştır.
- Troloks çözeltisi: 0,1 g troloks az miktarda metanol ile çözülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

DNA oksidasyonu çalışmalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanması

- Buzağı timüs DNA çözeltisi (0,5 mg/mL): 5 mg buzağı timüs DNA'sı 10 mL ultra saf su ile çözülerek hazırlandı.
- H_2O_2 çözeltisi (10 mM): 9,79 M H_2O_2 çözeltisinden 205 μL alınıp saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 200 mM ara stok hazırlanmıştır. 10 mM H_2O_2 çözeltisi, 200 mM H_2O_2 çözeltisinden 2,5 mL alınıp saf su ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
- Fe^{2+} çözeltisi (10 mM): 0,278 g $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tartılarak bir miktar saf suda çözülüp toplam hacim 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Kromatografik analizler için kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

- Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik bileşiklerin kantitatif tayini için standart fenolik bileşikler kullanılarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir standart bileşik metanol ile çözülerek 0,20-10 mg/L derişim aralığında hazırlanmıştır.
- Kestane arı poleni örneklerindeki karotenoidlerin kantitatif tayini için standart karotenoid bileşikler kullanılarak kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir standart bileşik diklorometan ile çözülerek 0,25-10 mg/L derişim aralığında hazırlanmıştır (Yüksel 2018).
- Kestane arı poleni örneklerinin oksidatif stres sonucu oluşan DNA oksidatif hasar ürünleri üzerine etkisinin incelenmesi için DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir DNA oksidatif baz hasar ürününden 0,0050 g tartılarak piridin ile 25 mL'ye tamamlanmıştır. 200 mg/L derişiminde hazırlanan standartlar piridin ile seyreltilerek kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır (Aybastier 2016).

3.2. Yöntem

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar 4 ana başlık altında toplanabilir. Bunlar;

- Örneklerin toplanması
- Örnek hazırlama işlemleri
- Spektroskopik yöntemler
- Kromatografik yöntemler

3.2.1. Kestane arı poleni örneklerinin toplanması

Ülkemizde doğal kestane ormanları Güney Marmara ve Batı Karadeniz bölgelerinde yer almaktadır. Kestane arı poleni örnekleri Zonguldak, Bursa ve Balıkesir illerinde yer alan kestane ormanlarında faaliyetlerini sürdüren arıcılar tarafından temin edilmiştir. Örneklerin temini Uludağ Üniversitesi, Süt ve Ürünleri Teknoloji Programı öğretim görevlisi Dr. M. Ertan Güneş tarafından sağlanmıştır. Kestane arı poleni örnekleri analiz

süresi boyunca -24°C’de dondurucuda muhafaza edilmiştir. Toplanan kestane arı poleni örneklerinin lokaliteleri Çizelge 3.4’te verilmektedir.

Çizelge 3.4. Kestane arı poleni örneklerinin lokaliteleri

Bölge	Yıl	İl	Lokalite	Sembol
Marmara	2016	Bursa	Uludağ / Cumalıkızık köyü	M0
			Karacabey Boğazı	M1
	Orhangazi / Gürle köyü		M2	
	Orhangazi		M3	
	2017		Uludağ / Cumalıkızık köyü	M4
			Uludağ / Cumalıkızık köyü	M5
			İnegöl	M6
Balıkesir		Erdek / Kapıdağ Yarımadası	M7	
Karadeniz	2017	Zonguldak	Kilimli / Muslu köyü	K1
			Kilimli / Muslu köyü	K2
			Kilimli / Göbü köyü	K3
			Kilimli / Türkali köyü	K4
			Kilimli / Çatalağzı köyü	K5
			Kilimli / Çatalağzı köyü	K6
			Kilimli / Çatalağzı köyü	K7
			Kilimli / Merkez	K8
			Kilimli / Merkez	K9
			Kilimli / Merkez	K10

3.2.2. Kestane arı poleni örneklerinin palinolojik analizleri

Örneklerin melissopalinojik analizleri için 10 g arı poleni kullanıldı. Louveaux ve ark. (1978)’nin yöntemine göre yapılan analizde polen örnekleri bazik fuksin ile renklendirilmiş gliserin-jelatin ile boyanmış ve ışık mikroskopunda analiz edilmiştir.

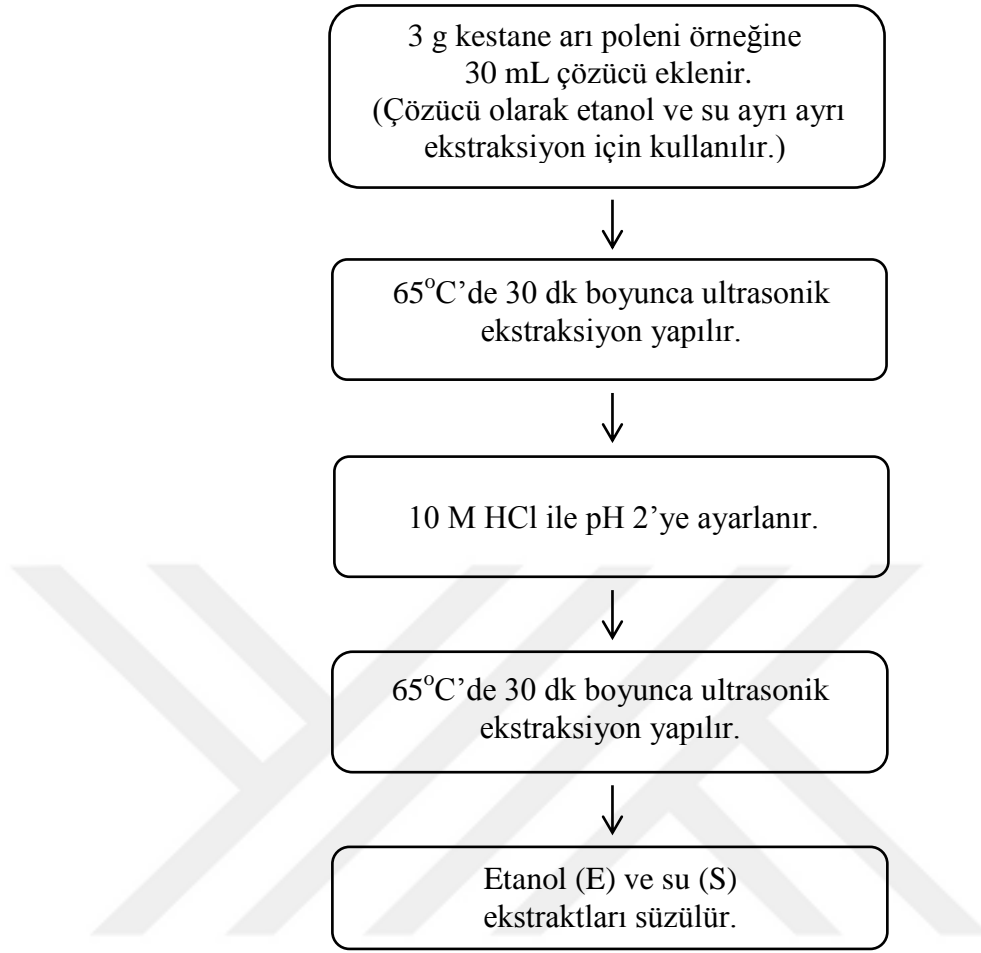
Polen tanelerinin sayısı, lamelin (22x22 mm) santimetre karesi başına tane olarak ifade edilmiştir. Farklı yazarlar tarafından farklı yüzdelik değerler elde edilmesine rağmen, bir polen örneğinin tek-çiçekli olarak kabul edilebilmesi için az %45 oranında o çiçek türünün içermesi gerekir (Louveaux ve ark. 1978, Persano Oddo ve Piro 2004). Tez kapsamında çalışılan arı poleni örneklerinin palinolojik analiz sonuçları %45'in üzerinde bulunarak örneklerin kestane arı poleni oldukları tespit edilmiştir.

3.2.3. Örnek hazırlama işlemleri

Kestane arı poleni örneklerinin hazırlanmasında ultrasonik ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon teknikleri kullanılmıştır.

Ultrasonik ekstraksiyon ile örnek hazırlama işlemleri

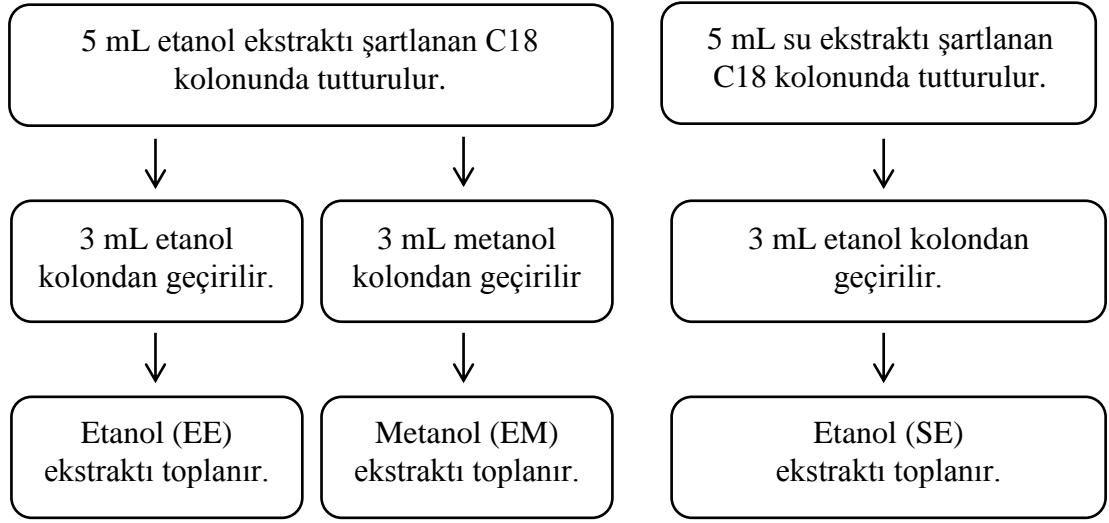
Su ve etanol çözücüleri kullanılarak ultrasonik ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon balonlarına tartılan 3 g kestane arı poleni örneklerine ayrı ayrı 30 mL etanol ve 30 mL su eklenerek balonlar ultrasonik banyoya yerleştirilmiş ve 65°C'de 30 dk boyunca ultrasonik ekstraksiyon yapılmıştır. Örneklerin pH'ları 10 M HCl kullanılarak 2'ye ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan örnekler ultrasonik banyoya tekrar yerleştirilerek ikinci kez 65°C'de 30 dk boyunca ultrasonik ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında örnekler süzülerek -24°C'de muhafaza edilmiştir. Kestane arı poleni örnekleri için gerçekleştirilen ultrasonik ekstraksiyon akım şeması Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Kestane arı poleni örneklerinin ultrasonik ekstraksiyon akım şeması

Katı-faz ekstraksiyonu ile örnek hazırlama işlemleri

Hazırlanan etanol ve su ekstraktlarının metanol ve etanol çözücülerini kullanılarak katı-faz ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Katı-faz ekstraksiyonu için C18 kolonu kullanılarak üç farklı ekstrakt elde edilmiştir. C18 kolonu 10 mL saf su ve 5 mL 10 M HCl ile şartlandırılmıştır. Şartlandırılan kolondan 5 mL etanol ekstraktı geçirilerek fenolik bileşikler kolonda tutturulmuştur. Tutturulan fenolik bileşikler kolondan geçirilen 3 mL metanol/etanol ile ayrı ayrı toplanarak metanol ve etanol ekstraktları elde edilmiştir. Aynı şekilde şartlandırılan kolondan 5 mL su ekstraktı geçirilerek kolonda tutturulan fenolik bileşikler 3 mL etanol ile toplanarak etanol ekstraktı elde edilmiştir. Kestane arı poleni örnekleri için gerçekleştirilen katı-faz ekstraksiyonu akım şeması Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Kestane arı poleni örneklerinin katı-faz ekstraksiyon akım şeması

3.2.4. Spektroskopik yöntemler

Nelson-Somogyi yöntemiyle indirgen şeker tayini

Şekil 3.2.'de gösterildiği gibi elde edilen etanol ve su ekstraktları kullanılmıştır. Ancak indirgen şeker tayini için her iki ekstrakt ön işleme tabi tutulmuştur.

- Etanol ekstraktı (E1): 2 mL etanol ekstraktı azot gazı ile uçurulduktan sonra kalıntı 3 mL suda çözülerek kullanılmıştır.
- Su ekstraktı (E2): 0,1 mL su ekstraktı saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak 100 kat seyreltilmiş halde kullanılmıştır.

Kestane arı poleni örneklerindeki indirgen şeker tayinleri Nelson-Somogyi yöntemi ile yapılmıştır (Nelson 1944, Somogyi 1952). Deney tüplerine alınan 100 µL kestane arı poleni ekstraktları saf su ile 2 mL'ye tamamlanmıştır. Her tüpe 1 mL alkali bakır tartarat çözeltisi eklenerek 10 dk kaynayan suda bekletilmiştir. Ardından tüm deney tüpleri buzlu suda soğutulurak 1 mL arsenomolibdat çözeltisi ve 6 mL saf su eklenmiştir. 10 dk bekletilen örneklerin 620 nm'de UV-Vis Spektrofotometresinde ölçümleri alınmıştır.

Örneklerdeki indirgen şeker miktarını belirleyebilmek için standart olarak glikoz çözeltisi kullanılmıştır. 1-2-3-4-5-7-10 mg/L glikoz içerecek şekilde hazırlanan

örneklere Nelson-Somogyi yöntemi uygulanmıştır. Standart çözeltinin her bir derişimine karşılık absorbans değeri grafiğe geçirilerek kalibrasyon denklemi belirlenmiştir (Çizelge 3.5). Elde edilen kalibrasyon denklemi kullanılarak kestane arı poleni örneklerindeki indirgen şeker miktarı mg/100 g kestane arı poleni olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. İndirgen şeker tayini kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	Regresyon katsayısı (R ²)
Nelson-Somogyi	1-10	$y = 0,1039x + 0,0580$	0,9997

Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik madde tayini

Kestane arı polenlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde tayini fenolik bileşiklerden molibdenyuma elektron transferine dayanan Folin-Ciocalteu yöntemi ile yapılmıştır (Singleton ve ark. 1999, Şahin ve ark. 2015). Analiz tüplerine alınan 100 µL kestane arı poleni ekstraktı üzerine 1,9 mL saf su ve 2,5 mL Lowry C çözeltisi eklendikten sonra 0,25 mL seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek tüpler karıştırılmıştır. 30 dk boyunca karanlık ortamda bekletilen analiz tüplerinin 750 nm'de ölçümleri alınmıştır. Kalibrasyon grafiği için artan derişimlerde hazırlanan gallik asit çözeltisi standart madde olarak kullanılmıştır. Gallik asit derişimine karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilerek en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Çizelge 3.6). Elde edilen doğru denklemi kullanılarak kestane arı poleni örneklerindeki toplam fenolik madde içeriği mg GAE/g örnek olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. Toplam fenol tayini kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	Regresyon katsayısı (R ²)
Folin-Ciocalteu	1-60	$y = 0,0266x - 0,0237$	0,9990

ABTS yöntemiyle antioksidan kapasite tayini

Kestane arı polenlerinden elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite tayini ABTS radikal katyonunun antioksidanlar tarafından inhibisyonuna dayanan ABTS yöntemi ile yapılmıştır (Şahin ve ark. 2012, Re ve ark. 1999). Kalibrasyon grafiği için artan derişimlerde hazırlanan troloks çözeltisi standart madde olarak kullanılmıştır. Analiz tüplerine alınan x mL örnek/standart üzerine (4-x) mL etanol eklenerek karıştırılmıştır. Her bir analiz tüpüne 1 mL ABTS radikal çözeltisi eklendikten 6 dk sonra örnek/standartların 734 nm’de absorbansları ölçülmüştür ($A_{\text{örnek}}$). ($A_{\text{kör}}$: ABTS radikal katyonunun inhibisyona uğramadığı (örnek/standart içermez) haldeki absorbans değeridir.) Ölçümler sonucunda örnek ve standartların %inhibisyon değerleri belirlenmiştir (Eşitlik 3.1).

$$\% \text{İnhibisyon} = \frac{A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kör}}} \times 100 \quad (3.1)$$

Troloks derişimine karşı %inhibisyon değerleri grafiğe geçirilerek en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Çizelge 3.7). Elde edilen doğru denklemi kullanılarak kestane arı poleni örneklerinin antioksidan kapasite değeri mg TE/g örnek olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.7. ABTS yöntemi kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	Regresyon katsayısı (R^2)
ABTS	0,1-1,0	$y = 6,1325x + 1,3406$	0,9990

FRAP yöntemiyle antioksidan kapasite tayini

Kestane arı polenlerinden elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite tayini Fe^{3+} -TPTZ (ferrictripiridiltriazin) kompleksinin asidik ortamda antioksidanların varlığıyla Fe^{2+} ’ye indirgenmesine dayanan FRAP yöntemiyle yapılmıştır (Benzine ve Strain 1996). Örneklerdeki antioksidan kapasite değerinin belirlenebilmesi için standart madde olarak artan derişimlerde troloks çözeltisi hazırlanmıştır. Analiz tüplerine x mL

(<0,25 mL) örnek/standart ve (3-x) mL FRAP reaktifi eklenerek 30 dk boyunca karanlık ortamda bekletildikten sonra örnek/standartların 593 nm’de absorbanları okunmuştur. Absorbansa karşılık troloks derişimi grafiğe geçirilerek en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi belirenmiştir (Çizelge 3.8). Elde edilen doğru denklemi kullanılarak kestane arı poleni örneklerinin antioksidan kapasite değerleri mM TE/g örnek cinsinden belirlenmiştir.

Çizelge 3.8. FRAP yöntemi kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	Regresyon katsayısı (R ²)
FRAP	1-20	y = 0,1715x + 0,0957	0,9997

CHROMAC yöntemiyle antioksidan kapasite tayini

Kestane arı poleni ekstraktlarının antioksidan kapasitesi ortama eklenen aşırı Cr⁶⁺’nın antioksidanlar tarafından Cr³⁺’e indirgenmesiyle arta kalan Cr⁶⁺’nın 1,5-difenilkarbazit ile kompleks oluşturmasına dayanan CHROMAC yöntemi ile yapılmıştır (Şahin ve Demir 2013, Karkar ve ark. 2017). Örneklerdeki antioksidan kapasite değerinin belirlenebilmesi için standart madde olarak artan derişimlerde troloks çözeltisi hazırlanmıştır. Analiz tüplerine x mL (<0,5 mL) örnek/standart, (0,5-x) mL saf su, 3,5 mL pH 2,8 fosfat tamponu ve 0,5 mL potasyum dikromat çözeltisi eklenerek karıştırılmıştır. 1 dk sonra tüplere 0,5 mL 1,5-difenilkarbazit eklenerek örnekler 50 dk karanlık ortamda bekletilir. Reaksiyon sonucunda oluşan kompleksi belirleyebilmek için standart/örneklerin 540 nm’de ölçümleri alınmıştır (A_{Geriye kalan}).

CHROMAC analizinde kör numunesini hazırlayabilmek için pH 1,2 tamponu kullanılmıştır. Analiz tüpüne 0,5 mL saf su, 3,5 mL pH 1,2 tamponu ve 0,5 mL potasyum dikromat çözeltisi eklendikten 1 dk sonra 0,5 mL 1,5-difenilkarbazit eklenerek 50 dk boyunca karanlık ortamda bekletilir. Oluşan kompleksin 540 nm’de ölçümleri alınmıştır (A_{Kör}).

Buna göre örneklerdeki fenolik maddeler için absorbands değeri Eşitlik 3.2’de gösterildiği gibi hesaplanır:

$$A_{\text{Örnek}} = A_{\text{Kör}} - A_{\text{Geriye kalan}} \quad (3.2)$$

$A_{\text{Kör}}$: Antioksidan içermeyen ortamda bulunan aşırı Cr^{6+} ‘nın yükseltgenme-indirgenme tepkimesi sonucu 1,5-difenilkarbazit ile oluşturduğu kompleksin absorbands değeri,

$A_{\text{Geriye kalan}}$: Aşırı Cr^{6+} ‘nın fenolik madde ile yükseltgenme-indirgenme tepkimesi sonucu geriye kalan Cr^{6+} ve 1,5-difenilkarbazitin oluşturduğu kompleksin absorbands değeridir.

Troloks derişimine karşı $A_{\text{Örnek}}$ değerleri grafiğe geçirilerek en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemi hesaplanmıştır (Çizelge 3.9). Elde edilen doğru denklemi kullanılarak kestane arı poleni örneklerinin antioksidan kapasite değeri mg TE/g örnek olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.9. CHROMAC yöntemi kalibrasyon verileri

Yöntem	Derişim aralığı (mg/L)	Doğru denklemi	Regresyon katsayısı (R^2)
CHROMAC	10-60	$y = 0,0045x + 0,0844$	0,9997

Buzağı timüs DNA’sının hazırlanması

Buzağı timüs DNA çözeltisi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde ultra saf su ile hazırlanmıştır. 24 saat sonra saf su içerisinde tamamen çözünen DNA’nın 260 ve 280 nm’de absorbandsları ölçülmüştür. DNA’nın saflık derecesini belirleyebilmek için A_{260}/A_{280} oranlanmıştır. DNA’nın miktarı Eşitlik 3.3’teki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\mu\text{g DNA} = A_{260} \times 50 \quad (3.3)$$

Buzağı timüs DNA'sı ile yapılan spektroskopik çalışmalar

Bu çalışmada kullanılacak olan kestane arı poleni örneği;

- Şekil 3.2'de belirtildiği şekilde hazırlanan etanol ekstraktının 3 mL'sinin azot gazı ile uçurularak geriye kalan kalıntının 3 mL saf su ile çözülmesiyle hazırlanmıştır.

Kestane arı polenin DNA oksidasyonuna etkisinin spektroskopik olarak incelenebilmesi için;

- Öncelikle DNA'nın Fenton (Fe^{2+} ve H_2O_2) reaksiyonu ile oksidasyona uğratıldıktan sonraki durumu incelenmiştir.
- Daha sonra ortamdaki kestane arı poleni ekstraktının varlığında DNA'nın oksidasyon sonrası durumu incelenmiştir.

Sonuç olarak Çizelge 3.10'da verilen, sadece DNA; sadece kestane arı poleni; DNA + Fe^{2+} + H_2O_2 ; kestane arı poleni + Fe^{2+} + H_2O_2 ; DNA + kestane arı poleni + Fe^{2+} + H_2O_2 içeren örnek karışımları hazırlanmıştır.

Çizelge 3.10. Fenton reaksiyonu için hazırlanan örnek karışımları

Örnek Karışımı	DNA (μL)	Kestane Arı Poleni (μL)	Fe^{2+} (μL)	H_2O_2 (μL)	Ultra Saf Su (μL)
1	200	-	-	-	4800
2	200	-	75	150	4575
3	-	3000	-	-	2000
4	-	3000	75	150	1775
5	200	3000	75	150	1575

Çizelge 3.10'da verilen örnek karışımlarının 1 saat boyunca 10 dakikada bir 200-400 nm aralığında spektrum taramaları alınmıştır. 1-numaralı örnek karışımının derişimi ve 260 nm'deki (DNA'nın maksimum absorpsiyon yaptığı dalga boyu) absorbans değeri Eşitlik 3.4'te yerine koyularak DNA'nın molar sönüm katsayısı (ϵ) hesaplanmıştır. Belirlenen molar sönüm katsayısı kullanılarak 2 ve 5 numaralı örnek karışımlarının 260 nm'deki derişimleri hesaplanmıştır. Her iki durum içinde DNA'nın oksidatif hasara

uğrama yüzdesi belirlenerek kestane arı polenindeki fenolik bileşiklerin DNA hasarını önleme etkisi incelenmiştir.

$$A = \epsilon bc \quad (3.4)$$

3.2.5. Kromatografik yöntemler

Kestane arı polenlerinde bulunan fenolik maddelerin tayini

Kestane arı poleni ekstraktlarındaki fenolik maddelerin analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi-fotodiyot serili dedektör cihazı (HPLC-DAD) kullanılmıştır. Metanol ve %1'lik sulu formik asitten oluşan gradient programlı hareketli faz sistemi kullanılmıştır. C18 (XBridge, 3,5 µm, 4,6 x 250 mm) kolonu, 0,5 mL/dk akış hızı ve 10 µL enjeksiyon hacmi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin HPLC tayinlerinde, protokatekuik asit, (-)-epigallokateşin, *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve krisin için 260 nm; (-)-epigallokateşin gallat, epikateşin, (+)-kateşin, naringin, L-triptofan ve pinocembrin için 280 nm; rosmarinik asit, amentoflavon, klorojenik asit, salisilik asit, kafeik asit fenetil esteri ve *trans*-kalkon için 320 nm; hiperosid, kuersitrin, luteolin, apigenin, galangin, viteksin, kuersetin-3-β-D-glikozit, ellagik asit, mirisetin, kamferol, isorhamnetin ve genkvanin için 360 nm'de çalışılmıştır. Fenolik bileşiklerin tayini için HPLC-DAD çalışma koşulları Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Fenolik bileşiklerin tayini için HPLC-DAD gradient hareketli faz programı

Süre (dk)	Hareketli faz bileşimi	
	%1'lik formik asit	Metanol
0	%95	%5
10	%85	%15
15	%70	%30
20	%60	%40
30	%55	%45
50	%40	%60
52	%20	%80
60	%20	%80
70	%95	%5

Standart fenolik bileşiklerin farklı derişimlerdeki çözeltileri ve kestane arı poleni örnekleri HPLC-DAD cihazı ile analiz edilmiştir. Her bir standardın derişimine karşılık pik alanı grafikleri çizilerek, en küçük kareler yöntemiyle doğru denklemleri hesaplanmıştır. Örneklerin pik alanı değerleri doğru denklemlerinde yerine konularak kestane arı poleninde bulunan fenolik maddeler mg/kg örnek cinsinden hesaplanmıştır.

Kestane arı polenlerinde bulunan karotenoidlerin tayini

Kestane arı poleni ekstraktlarındaki karotenoidlerin analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi-fotodiyot serili dedektör cihazı (HPLC-DAD) kullanılmıştır. %95 metanol-%5 H₂O (H₂O: %0,05 trimetilamin içermektedir) ve tert-bütül metil eter çözücüleri ile gradient programlı hareketli faz sistemi kullanılmıştır. YMC Karotenoid C30 (250x4.6 mm, 5µm, YMC Co., Ltd) kolonu, 1,0 mL/dk akış hızı ve 20 µL enjeksiyon hacmi ile analizler gerçekleştirilmiştir. Karotenoidlerin HPLC tayini için 450 nm'de çalışılmıştır. Karotenoidlerin tayini için HPLC-DAD çalışma koşulları Çizelge 3.12'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Karotenoidlerin tayini için HPLC-DAD gradient hareketli faz programı

Süre (dk)	Hareketli faz bileşimi	
	%95 metanol	ter-bütül metil eter
0	95	5
15	80	20
20	70	30
30	60	40
40	25	75
45	95	5

Standart karotenoidlerin farklı derişimlerdeki çözeltileri ve kestane arı poleni örnekleri HPLC-DAD cihazı ile analiz edilmiştir. Örneklerin pik alanı değerleri kalibrasyon denklemlerinde yerine konularak kestane arı poleninde bulunan karotenoidler mg/kg örnek cinsinden belirlenmiştir.

Buzağı timüs DNA'sı ile yapılan kromatografik çalışmalar

DNA oksidatif hasar ürünlerinin analizi için gaz kromatografisi kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (GC-MS/MS) cihazı kullanılmıştır. GC-MS/MS ile DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin ve örneklerin analizi için DB-5MS (Agilent 128-5512) kapiler kolonu (12 m, 0,20 mm, 0,33 µm), seçilmiş reaksiyon görüntüleme (selected reaction monitoring, SRM) tekniği kullanılmıştır. Her bir madde için alıkonma zamanı, 70 eV ile yapılan 1. iyonlaşma sonrası taranacak kütleler, 2. iyonlaşma için uygulanacak en uygun enerji ve 2. iyonlaşma sonrası taranacak kütleler belirlenmiştir. GC-MS/MS cihazı için çalışma koşulları ve sıcaklık programı Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14'te verilmiştir.

Çizelge 3.13. GC-MS/MS cihazı çalışma koşulları

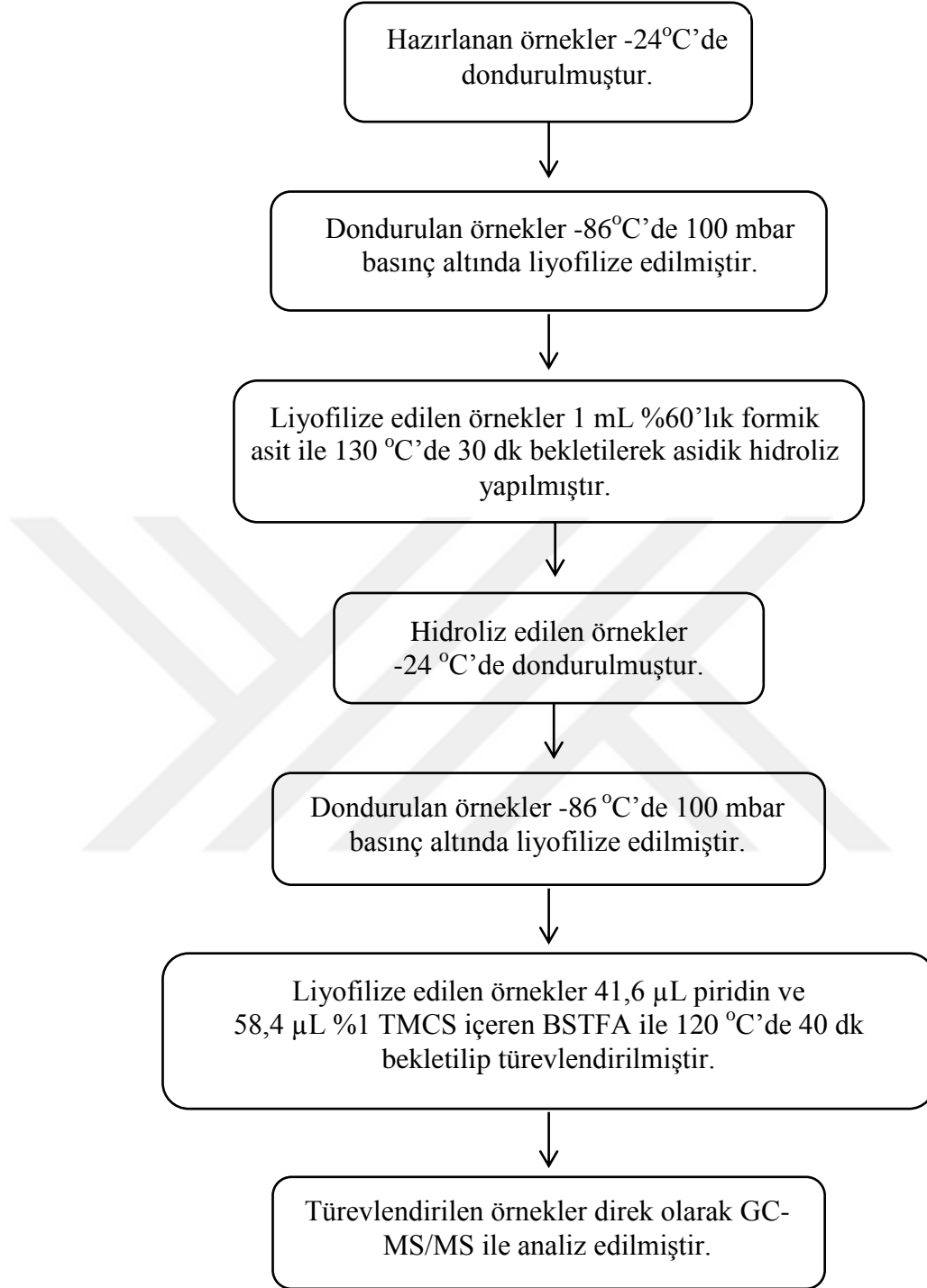
Enjeksiyon hacmi	2 µL
Enjeksiyon modu	Split
Split oranı	5
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C
Ara yüzey sıcaklığı	280°C
İyon kaynağı sıcaklığı	250°C
Hareketli faz akış hızı	1 mL/dk
Tarama modu	SRM (SIM/SIM)
GC program süresi	17 dk

Çizelge 3.14. GC-MS/MS cihazı için sıcaklık programı

Oran (°C/dk)	Sıcaklık (°C)	Bekleme süresi (dk)
-	130	2
8	230	0
20	280	0

Kestane arı poleni örneklerinin, DNA’da oksidatif stres sonrası oluşan hasar ürünlerine olan etkisini incelemek için “M0” polen örneği kullanılmıştır. Öncelikle polen örneği, Şekil 3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan etanol ekstraktının 3 mL’sinin azot gazı ile uçurulup kalıntınının 3 mL saf suda çözülmesiyle analize uygun hale getirilmiştir. Daha sonra aşağıda belirtilen şekilde (ultra saf su kullanılarak) hazırlanan örnek karışımları Şekil 3.4’te belirtilen aşamalardan geçirilerek analiz edilmiştir.

- DNA (20 µg/mL) örneği
- Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2$) uygulanmış DNA (20 µg/mL) örneği
- 3000 µL arı poleni içerecek şekilde Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2$) uygulanmış DNA (20 µg/mL) örneği



Şekil 3.4. GC-MS/MS analizi için örnek hazırlama aşamaları

4. BULGULAR

Bu çalışmada elde edilen bulgular iki ana başlık altında toplanabilir.

- Spektroskopik yöntemler
- Kromatografik yöntemler

4.1. Spektroskopik Yöntemler

4.1.1. İndirgen şeker tayini

2016 yılında Marmara bölgesi Bursa/Uludağ/Cumalıkızık köyünden temin edilen kestane arı poleni örneğine (M0) indirgen şeker analizi yapılmıştır. Şekil 3.2’de belirtildiği şekilde etanol ve su çözücülerıyla hazırlanan ekstraktlardaki indirgen şeker miktarı mg/100 g örnek olarak Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Kestane arı poleni örneğinin indirgen şeker sonuçları

Ekstrakt türü	İndirgen şeker miktarı (mg/100 g örnek)
E	2,66 ± 0,12
S	53,01 ± 0,05

Şekerin sudaki çözünürlüğünün fazla olmasından dolayı, su ekstraktındaki indirgen şeker miktarının etanol ekstraktına oranla daha fazla olduğu görülmektedir.

4.1.2. Toplam fenolik madde tayini

Kestane arı poleni (M0) örneğinin Şekil 3.2 ve Şekil 3.3’te belirtildiği şekilde hazırlanan ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı Çizelge 4.2’de verilmektedir.

Çizelge 4.2. M0 kestane arı poleni ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı

Ekstrakt türü	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g örnek)
E	43,48 ± 0,77
EM	13,91 ± 0,54
EE	14,77 ± 0,61
S	28,45 ± 0,76
SE	4,12 ± 0,09

Şekil 3.2’de belirtildiği şekilde ultrasonik destekli ekstraksiyon kullanılarak hazırlanan etanol ekstraktının (E) toplam fenolik madde içeriği diğer ekstraktlara oranla daha fazla bulunmuştur (Karkar ve ark. 2018). Bu nedenle kestane arı polenlerinin toplam fenolik madde miktarları etanol ekstraktları kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Kestane arı poleni örneklerinin toplam fenolik madde miktarları

Kestane poleni	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g örnek)
M1	38,23 ± 0,69
M2	28,33 ± 0,68
M3	32,18 ± 0,25
M4	38,16 ± 0,98
M5	32,18 ± 0,25
M6	27,82 ± 0,83
M7	39,50 ± 0,45
K1	37,03 ± 1,06
K2	38,82 ± 0,01
K3	35,02 ± 0,00
K4	19,19 ± 0,25
K5	16,19 ± 1,17
K6	21,85 ± 1,73
K7	28,50 ± 0,42
K8	33,48 ± 0,34
K9	33,98 ± 0,88
K10	28,89 ± 0,49

4.1.3. Antioksidan kapasite tayini

Kestane arı poleni (M0) örneğinin Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te belirtildiği şekilde hazırlanan ekstraktlarının antioksidan kapasite sonuçları Çizelge 4.4'te verilmektedir.

Çizelge 4.4. M0 kestane arı poleni ekstraktlarının antioksidan kapasite sonuçları

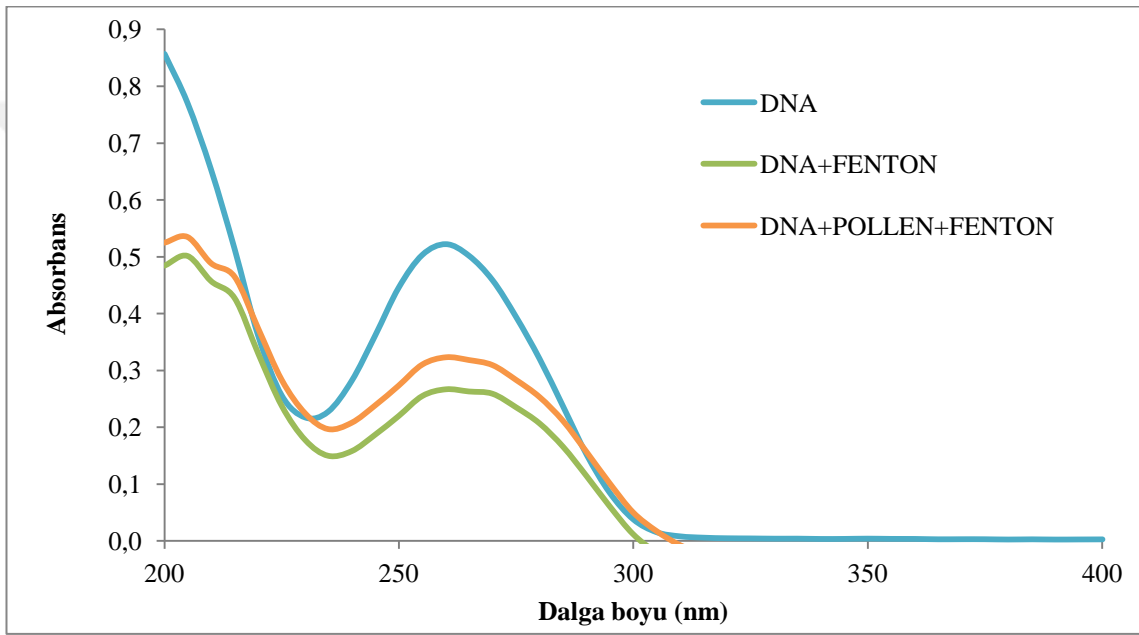
Ekstrakt türü	Antioksidan kapasite miktarı	
	FRAP (mM TE/g örnek)	CHROMAC (mg TE/g örnek)
E	20,24 ± 1,15	34,33 ± 0,02
EM	5,58 ± 0,11	4,69 ± 0,06
EE	5,82 ± 0,10	5,22 ± 0,07
S	14,36 ± 0,79	19,34 ± 0,04
SE	3,15 ± 0,04	3,70 ± 0,05

Şekil 3.2’de belirtildiği şekilde ultrasonik destekli ekstraksiyon kullanılarak hazırlanan etanol ekstraktının (E) antioksidan kapasite miktarları diğer ekstraktlara oranla daha fazla bulunmuştur (Karkar ve ark. 2018). Bu nedenle kestane arı polenlerinin antioksidan kapasite miktarları etanol ekstraktları kullanılarak belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Kestane arı poleni örneklerinin antioksidan kapasite miktarları

Ekstrakt türü	Antioksidan kapasite miktarı		
	ABTS (mg TE/g örnek)	FRAP (mM TE/g örnek)	CHROMAC (mg TE/g örnek)
M1	31,00 ± 0,82	4,32 ± 0,02	47,34 ± 1,74
M2	17,58 ± 0,14	2,80 ± 0,07	67,85 ± 0,42
M3	22,65 ± 0,05	3,06 ± 0,11	73,09 ± 1,07
M4	38,56 ± 0,32	3,46 ± 0,01	65,50 ± 0,46
M5	38,47 ± 0,05	3,42 ± 0,02	67,95 ± 3,92
M6	23,39 ± 0,52	3,77 ± 0,05	60,83 ± 0,62
M7	42,58 ± 0,28	3,44 ± 0,01	89,63 ± 0,59
K1	32,72 ± 0,58	4,51 ± 0,02	88,33 ± 0,94
K2	31,89 ± 0,61	4,75 ± 0,02	45,48 ± 0,27
K3	30,79 ± 0,99	4,29 ± 0,03	78,39 ± 1,44
K4	13,85 ± 0,03	1,78 ± 0,00	62,45 ± 1,19
K5	17,08 ± 0,00	1,53 ± 0,06	60,51 ± 0,48
K6	19,14 ± 0,02	2,53 ± 0,14	54,62 ± 0,23
K7	22,36 ± 0,62	3,45 ± 0,01	63,85 ± 0,03
K8	30,35 ± 0,82	3,61 ± 0,00	110,47 ± 2,41
K9	31,42 ± 0,30	3,51 ± 0,02	115,58 ± 0,96
K10	24,94 ± 0,92	4,02 ± 0,01	98,44 ± 0,94

Şekil 4.2’de verilen grafikte kestane arı polenin oksidasyona uğrayan DNA’da oluşan hasarı önlediği görülmektedir. 20,0 µg/mL derişimindeki saf DNA miktarı Fenton reaksiyonu ile oksidatif hasara uğradıktan sonra 10,2 µg/mL’ye düşmüştür. Ancak kestane arı poleni varlığında oksidatif hasara uğraması sonucu DNA miktarının 12.4 µg/mL’ye düştüğü tespit edilmiştir. Normal şartlarda %49 oranında oksidatif hasara uğrayan DNA, kestane arı poleni varlığında %38 oranında oksidatif hasara uğramıştır. Yani kestane arı poleni örneğindeki fenolik bileşikler DNA’nın oksidatif hasara uğramasını %11 oranında önlemiştir (Karkar ve ark. 2018).



Şekil 4.2. DNA'nın kestane arı poleni varlığında oksidatif strese karşı durumu

4.2. Kromatografik Yöntemler

4.2.1. Fenolik bileşiklerin analizi için validasyon parametrelerinin belirlenmesi

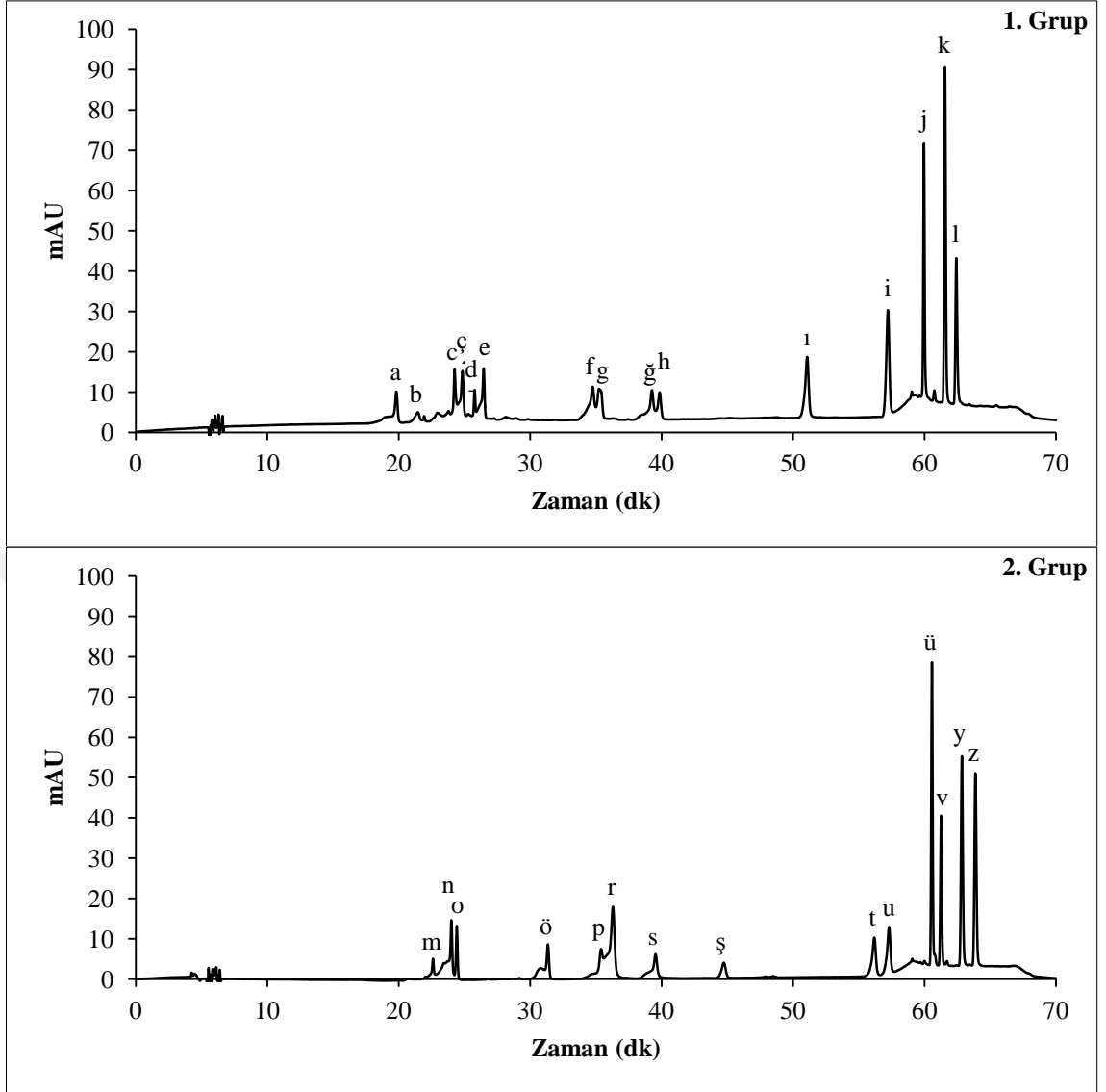
Kestane arı poleni örneklerinin fenolik madde içeriğinin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilmesi için standart fenolik bileşiklerin HPLC-DAD cihazı ile Çizelge 3.11’de belirtilen çözücü programı kullanılarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan fenolik bileşiklerin UV spektrumları ve alıkonma zamanları belirlenmiştir. Çizelge 4.6’da kullanılan standart fenolik maddelerin alıkonma zamanları ve kromatogramlarda kullanılacak olan alfabetik sıralaması verilmiştir. Standart fenolik

bileşiklerin alıkonma zamanlarının çakışmaması için iki farklı grup oluşturularak analizlenmiş ve 4 mg/L derişimindeki kromatogramları Şekil 4.3'te verilmiştir. Daha sonra fenolik bileşiklerin 0,2–10 mg/L derişim aralığında kromatografik analizleri gerçekleştirilip derişime karşılık kromatogramlardan elde edilen pik alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Her bir standart için belirlenen doğru denklemi ve regresyon katsayıları (R^2) Çizelge 4.7'de verilmiştir. Tüm standartlar için LOD (3s/m) ve LOQ (10s/m) değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca fenolik bileşiklerin kromatografik ayrılmasının tamamen gerçekleşip, saf piklerin elde edildiğini belirlemek amacıyla standartların peak purity değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Kestane arı poleni örneklerinin ekstraksiyon verimini hesaplayabilmek için fenolik bileşikler için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bunun için; 1 mg/L derişiminde hazırlanan standart fenolik bileşikler kromatografik olarak incelenerek pik alanları belirlenmiştir. Her bir standardın doğru denklemi kullanılarak belirlenen pik alanlarından asıl derişimleri hesaplanmıştır. Aynı zamanda her 1 mg/L derişiminde hazırlanan standart fenolik bileşikler kestane arı poleni örnekleri ile aynı koşullarda ekstrakte edilerek kromatografik olarak incelenmiş ve pik alanları belirlenmiştir. Her bir standardın doğru denklemi kullanılarak belirlenen pik alanlarından ekstraksiyon sonrası derişimleri hesaplanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda her bir standart fenolik bileşiğin ekstraksiyon sonrası % verim değerleri belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6. Standart fenolik maddelerin alıkonma zamanları ve kodlaması

Fenolik Bileşik	Alıkonma zamanı (dk)	Kodlama
protokatekuik asit	19.956	a
epigallokateşin	21.938	b
epigallokateşin gallat	24.265	c
<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	24.993	ç
epikateşin	25.883	d
vanilik asit	26.696	e
hiperosid	34.219	f
naringin	35.526	g
rosmarinik asit	39.308	ğ
kuersitrin	39.970	h
luteolin	51.251	ı
apigenin	57.112	i
amentoflavon	59.944	j
krisin	61.674	k
galangin	62.486	l
kateşin	22.625	m
klorojenik asit	24.040	n
L-triptofan	24.555	o
viteksin	31.556	ö
kuersetin-3-β-D-glikozit	35.142	p
ellagik asit	36.155	r
mirisetin	39.658	s
salisilik asit	44.687	ş
kamferol	56.118	t
isorhamnetin	57.186	u
pinocembrin	60.597	ü
kafeik asit fenetil esteri	61.319	v
genkvanin	62.853	y
<i>trans</i> -kalkon	63.918	z



Şekil 4.3. Standart fenolik bileşiklerin 280 nm'deki kromatogramları (a:protokatekuik asit, b:epigallokateşin, c:epigallokateşin gallat, ç:p-hidroksibenzoik asit, d:epikateşin, e:vanilik asit, f:hiperosid, g:naringin, ğ:rosmarinik asit, h:kuersitrin, ı:luteolin, i:apigenin, j:amentoflavon, k:krisin, l:galangin, m:kateşin, n:klorojenik asit, o:L-triptofan, ö:viteksin, p:kuersetin-3-β-D-glikozit, r:ellagik asit, s:mirisetin, ş:salisilik asit, t:kamferol, u:isorhamnetin, ü:pinocembrin, v:kafeik asit fenetil ester, y:genkvanin, z:trans-kalkon)

Çizelge 4.7. Standart fenolik bileşiklerin validasyon parametreleri

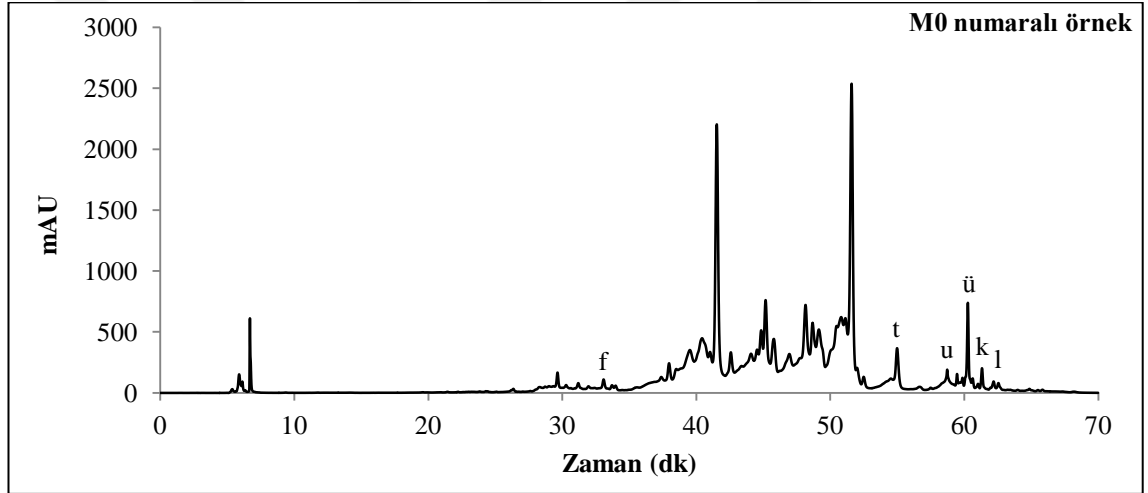
Fenolik Bileşik	Doğru Denklemi	R²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Peak purity (%)	Geri Kazanım (%)
Protokatekuik asit	$y = 52,5146x - 0,3731$	0,9990	0,01	0,02	100	92,28 ± 2,63
Epigallokateşin	$y = 2,7158x + 5,0915$	0,9966	0,66	2,20	100	105,34 ± 2,52
<i>p</i> -hidroksibenzoik asit	$y = 212,1504x - 29,1589$	0,9993	0,02	0,06	100	76,30 ± 3,24
Vanilik asit	$y = 129,2840x - 33,8123$	0,9973	0,02	0,06	100	81,13 ± 1,62
Krisin	$y = 236,7684x + 3,4142$	0,9996	0,01	0,02	100	102,41 ± 4,01
Kateşin	$y = 20,7172x - 0,3917$	0,9998	0,04	0,13	100	81,84 ± 0,77
Epigallokateşin gallat	$y = 33,8247x - 10,6869$	0,9959	0,02	0,07	98	83,33 ± 0,40
L-triptofan	$y = 29,6191x + 0,4569$	0,9997	0,02	0,05	99	72,00 ± 1,12
Epikateşin	$y = 18,1091x - 2,0975$	0,9963	0,01	0,03	100	91,80 ± 1,59
Naringin	$y = 69,6990x - 36,8440$	0,9905	0,01	0,03	99	88,85 ± 0,11
Pinocembrin	$y = 151,2686x - 3,8115$	0,9999	0,02	0,06	100	80,10 ± 2,92
Klorojenik asit	$y = 52,0073x - 7,9491$	0,9993	0,01	0,04	99	75,24 ± 2,00
Rosmarinik asit	$y = 51,2436x - 5,6164$	0,9996	0,01	0,02	100	82,43 ± 1,52
Salisilik asit	$y = 28,6791x - 1,4160$	0,9991	0,02	0,07	100	87,98 ± 0,24
Amentoflavon	$y = 144,6839x - 14,7692$	0,9992	0,01	0,02	100	99,91 ± 2,43

Çizelge 4.7. (Devam) Standart fenolik bileşiklerin validasyon parametreleri

Fenolik Bileşik	Doğru Denklemi	R²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Peak purity (%)	Geri Kazanım (%)
Kafeik asit-fenetil esteri	$y = 148,3947x - 5,8774$	0,9985	0,01	0,04	99	70,76 ± 3,63
<i>trans</i> -kalkon	$y = 212,7187x - 6,1592$	0,9998	0,01	0,02	100	78,63 ± 2,61
Viteksin	$y = 27,9491x - 1,1822$	0,9976	0,01	0,03	98	88,62 ± 0,11
Hiperosid	$y = 77,8172x - 23,9091$	0,9984	0,01	0,05	99	70,12 ± 2,24
Kuarsetin-3-β-D-glikozit	$y = 51,9346x - 14,3341$	0,9980	0,01	0,03	100	95,67 ± 0,82
Ellagik asit	$y = 51,4244x - 14,8506$	0,9963	0,02	0,05	100	97,22 ± 3,73
Mirisetin	$y = 135,7644x - 47,5975$	0,9985	0,01	0,02	100	99,32 ± 0,17
Kuarsitrin	$y = 58,8957x - 14,2057$	0,9973	0,01	0,02	100	85,73 ± 2,30
Luteolin	$y = 174,4071x - 29,2560$	0,9991	0,07	0,24	99	89,43 ± 1,11
Kamferol	$y = 135,3056x - 20,4210$	0,9985	0,02	0,05	100	85,06 ± 0,60
Apigenin	$y = 138,6645x - 14,2679$	0,9999	0,05	0,18	99	73,01 ± 3,84
Isorhamnetin	$y = 159,3570x - 27,9280$	0,9992	0,01	0,04	100	84,83 ± 1,52
Galangin	$y = 114,7031x - 4,0577$	0,9991	0,01	0,03	99	88,04 ± 1,57
Genkvanin	$y = 158,5893x - 10,4198$	0,9981	0,01	0,02	100	74,91 ± 3,05

4.2.2. Kestane arı poleni örneklerinde bulunan fenolik maddelerin tayini

Şekil 3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan M0 numaralı kestane arı poleni etanol ekstraktı kromatografik olarak Çizelge 3.11’de belirtilen HPLC-DAD çözücü programı kullanılarak analiz edilmiştir. Kestane arı poleni örneğinin HPLC-DAD kromatogramı Şekil 4.4’te verilmiştir. Elde edilen kromatogramdaki piklerin UV spektrumları ve alıkonma zamanları standartlarla karşılaştırılarak örnekteki fenolik bileşik içeriği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Daha sonra tespit edilen bu fenolik bileşiklerin pik alanları her bir standart için belirlenen kalibrasyon grafiğinde yerine koyularak örnekteki miktarları ekstraksiyon verimleri dikkate alınarak mg/kg örnek olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.8).



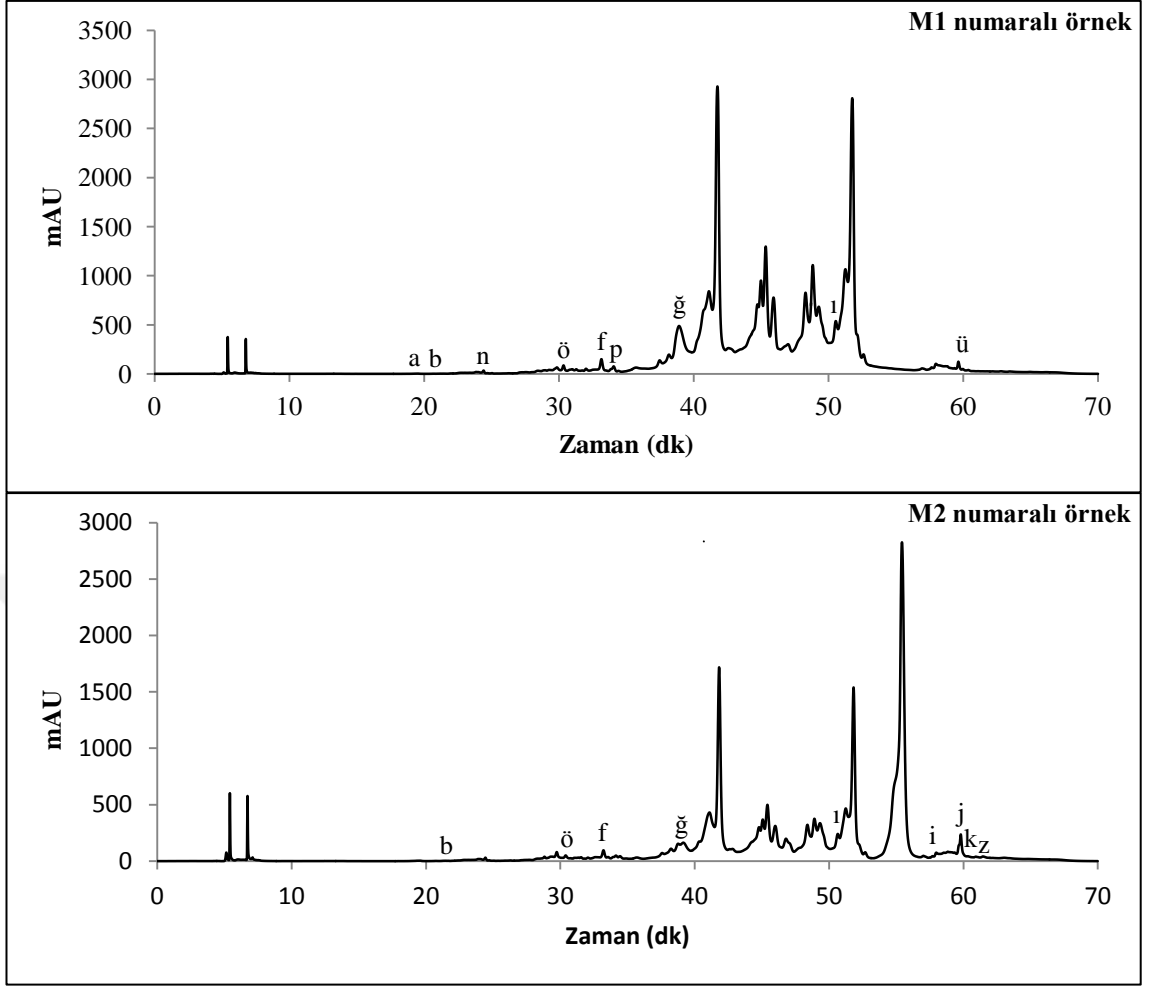
Şekil 4.4. M0 numaralı kestane arı poleni etanol ekstraktının HPLC-DAD kromatogramı (a:protokatekuik asit, b:epigallokateşin, c:epigallokateşin gallat, ç:p-hidroksibenzoik asit, d:epikateşin, e:vanilik asit, f:hiperosid, g:naringin, ğ:rosmarinik asit, h:kuersitrin, ı:luteolin, i:apigenin, j:amentoflavon, k:krisin, l:galangin, m:kateşin, n:klorojenik asit, o:L-triptofan, ö:viteksin, p:kuersetin-3-β-D-glikozit, r:ellagik asit, s:mirisetin, ş:salisilik asit, t:kamferol, u:isorhamnetin, ü:pinocembrin, v:kafeik asit fenetil ester, y:genkvanin, z: *trans*-kalkon.)

Çizelge 4.8. M0 numaralı kestane arı polenindeki fenolik madde miktarları (mg/kg)

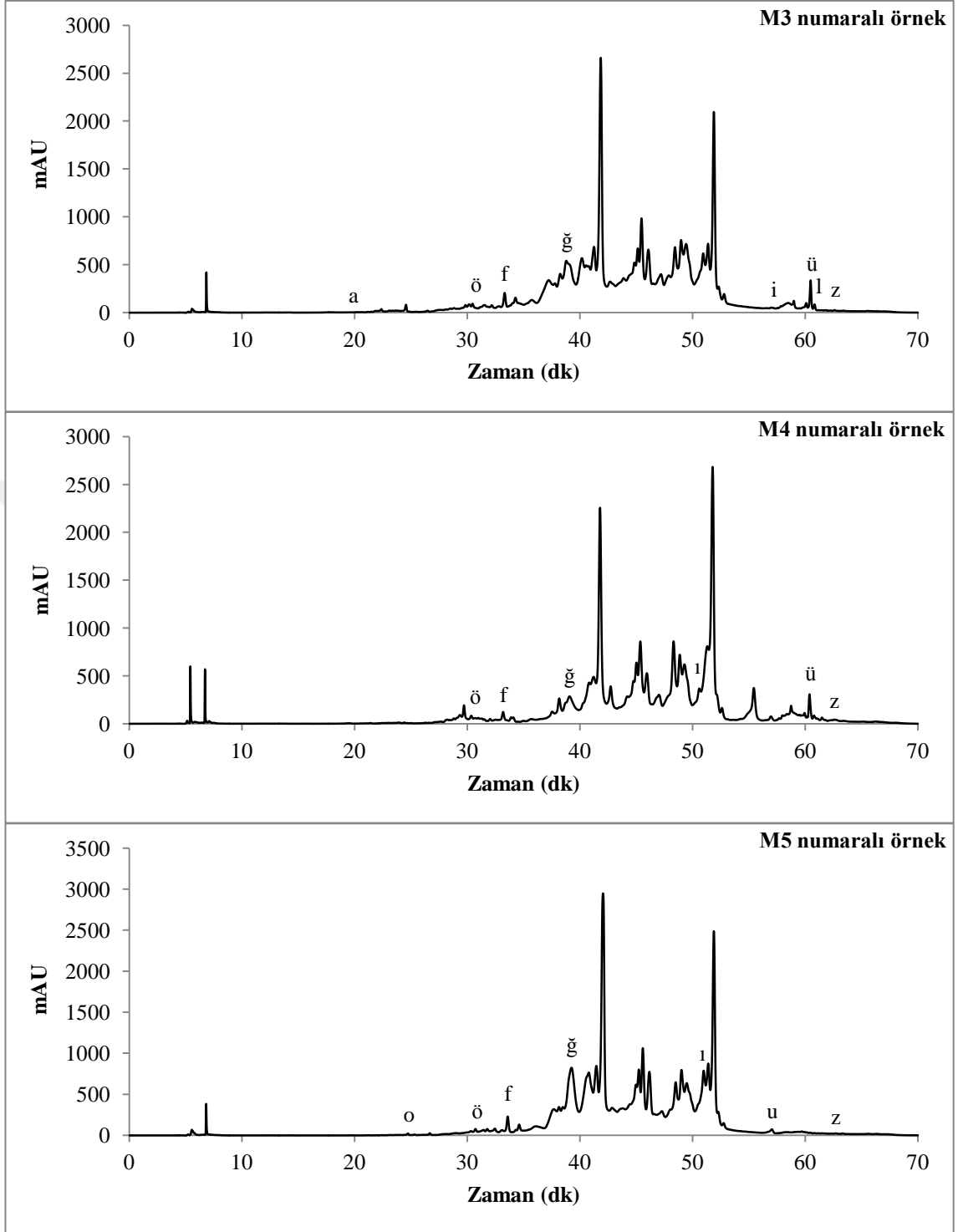
Örnek	HİP	KAM	KRS	GAL	İSOR	PİN
M0	171,94±0,82	606,32±14,63	324,00±2,94	139,08±2,63	73,15±0,97	1556,00±11,14

Ortalama ± standart sapma, HİP: hiperosid, KAM: kamferol, KRS: krisin, GAL: galangin, İSOR: isorhamnetin, PİN: pinocembrin.

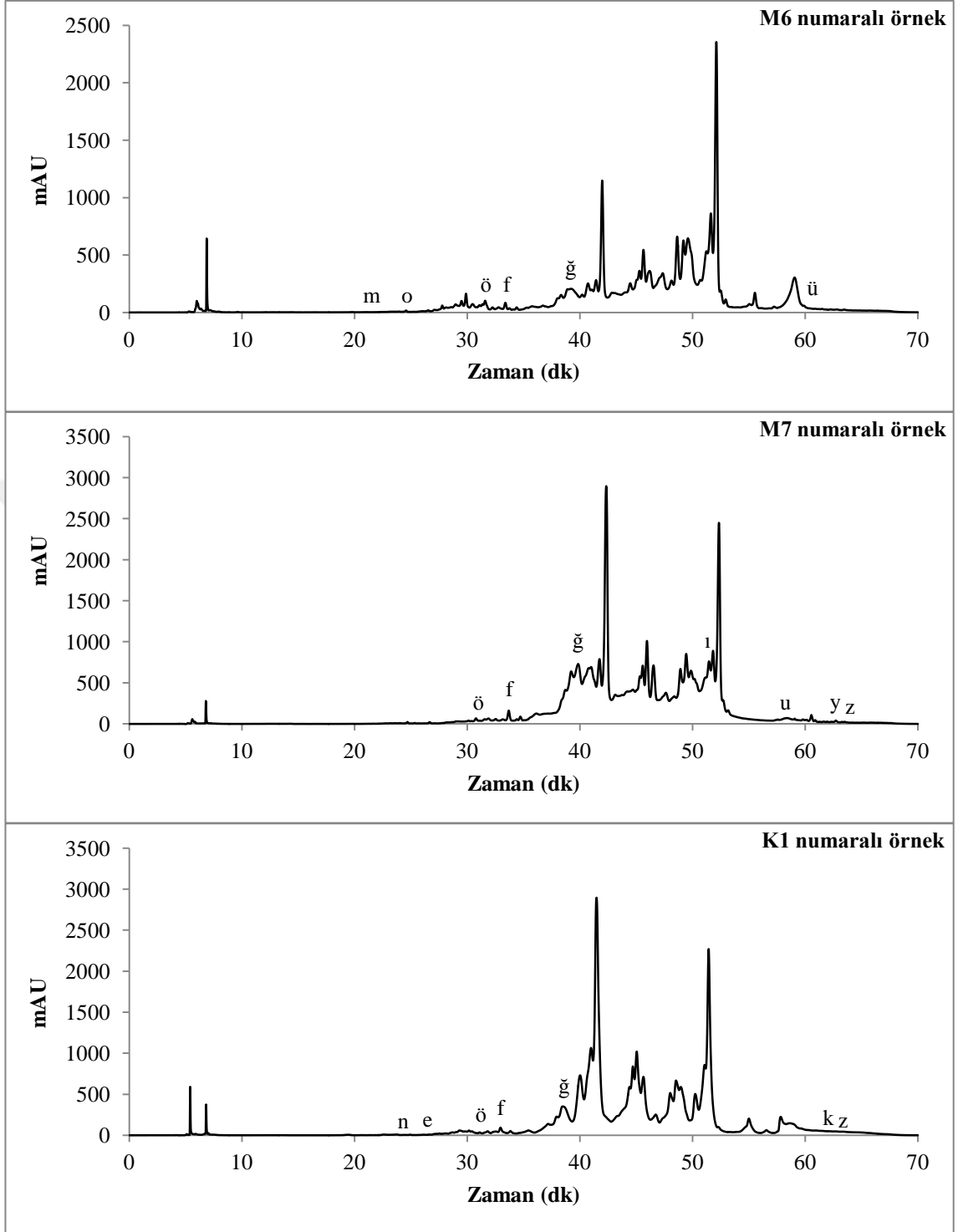
M0 numaralı kestane arı poleni örneği ile yapılan ön deneme çalışmaları sonrası tez kapsamında 2017 yılında toplanan tüm kestane arı poleni örnekleri Şekil 3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Kestane arı poleni etanol ekstraktları kromatografik olarak Çizelge 3.11’de belirtilen HPLC-DAD çözücü programı kullanılarak analiz edilmiştir. Kestane arı poleni örneklerinin HPLC-DAD kromatogramları Şekil 4.5’te verilmiştir. Elde edilen kromatogramlardaki piklerin UV spektrumları ve alıkonma zamanları standartlarla karşılaştırılarak örneklerdeki fenolik bileşik içeriği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Daha sonra tespit edilen bu fenolik bileşiklerin pik alanları her bir standart için belirlenen kalibrasyon grafiğinde yerine koyularak örneklerdeki miktarları tayin edilmiştir. Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik bileşiklerin miktarları ekstraksiyon verimleri dikkate alınarak mg/kg örnek olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.9).



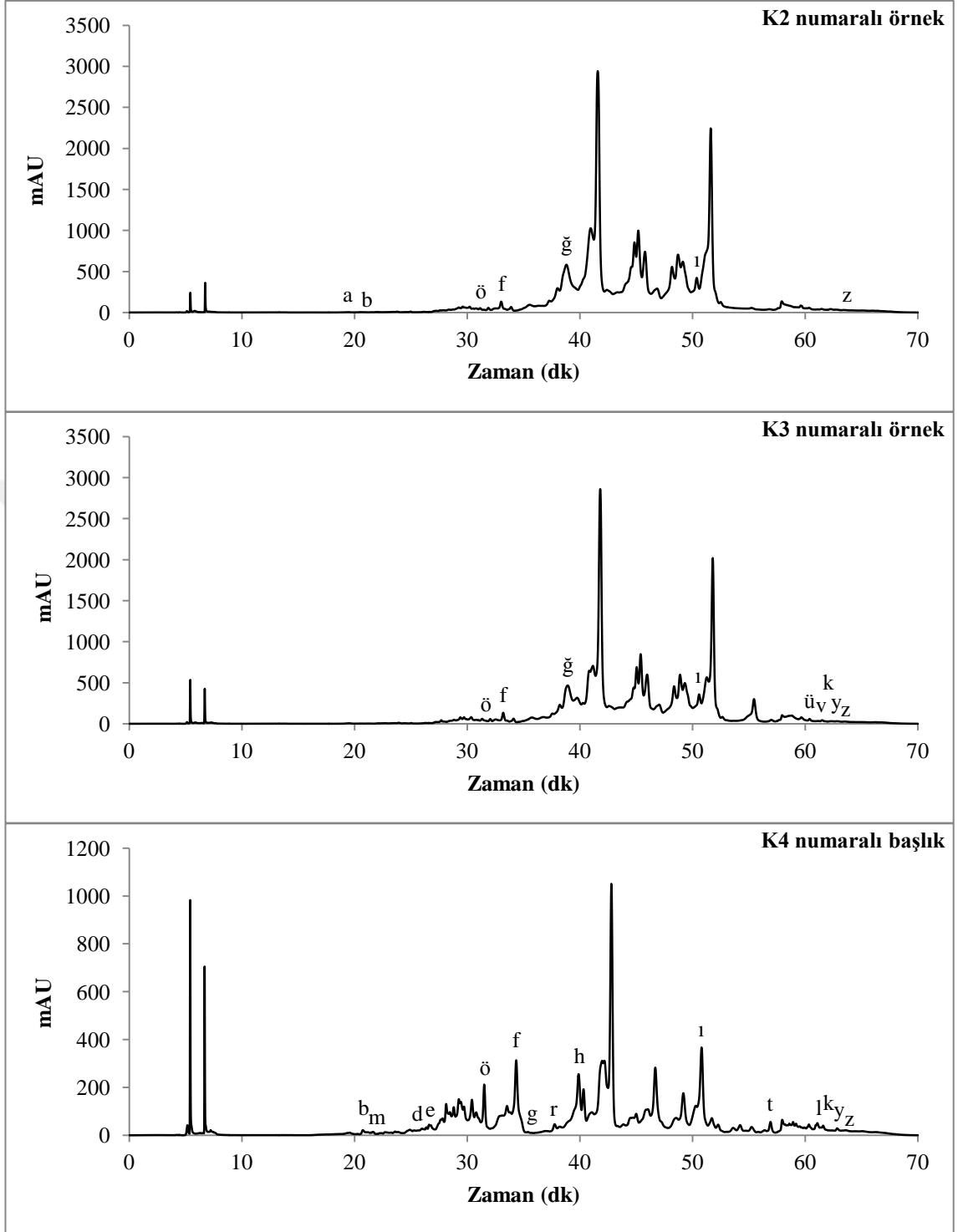
Şekil 4.5. Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD kromatogramları (a:protokatekuik asit, b:epigallokateşin, c:epigallokateşin gallat, ç:*p*-hidroksibenzoik asit, d:epikateşin, e:vanilik asit, f:hiperosid, g:naringin, ğ:rosmarinik asit, h:kuersitrin, ı:luteolin, i:apigenin, j:amentoflavon, k:krisin, l:galangin, m:kateşin, n:klorojenik asit, o:L-triptofan, ö:viteksin, p:kuersetin-3- β -D-glikozit, r:ellagik asit, s:mirisetin, ş:salisilik asit, t:kamferol, u:isorhamnetin, ü:pinocembrin, v:kafeik asit fenetil ester, y:genkvanin, z: *trans*-kalkon.)



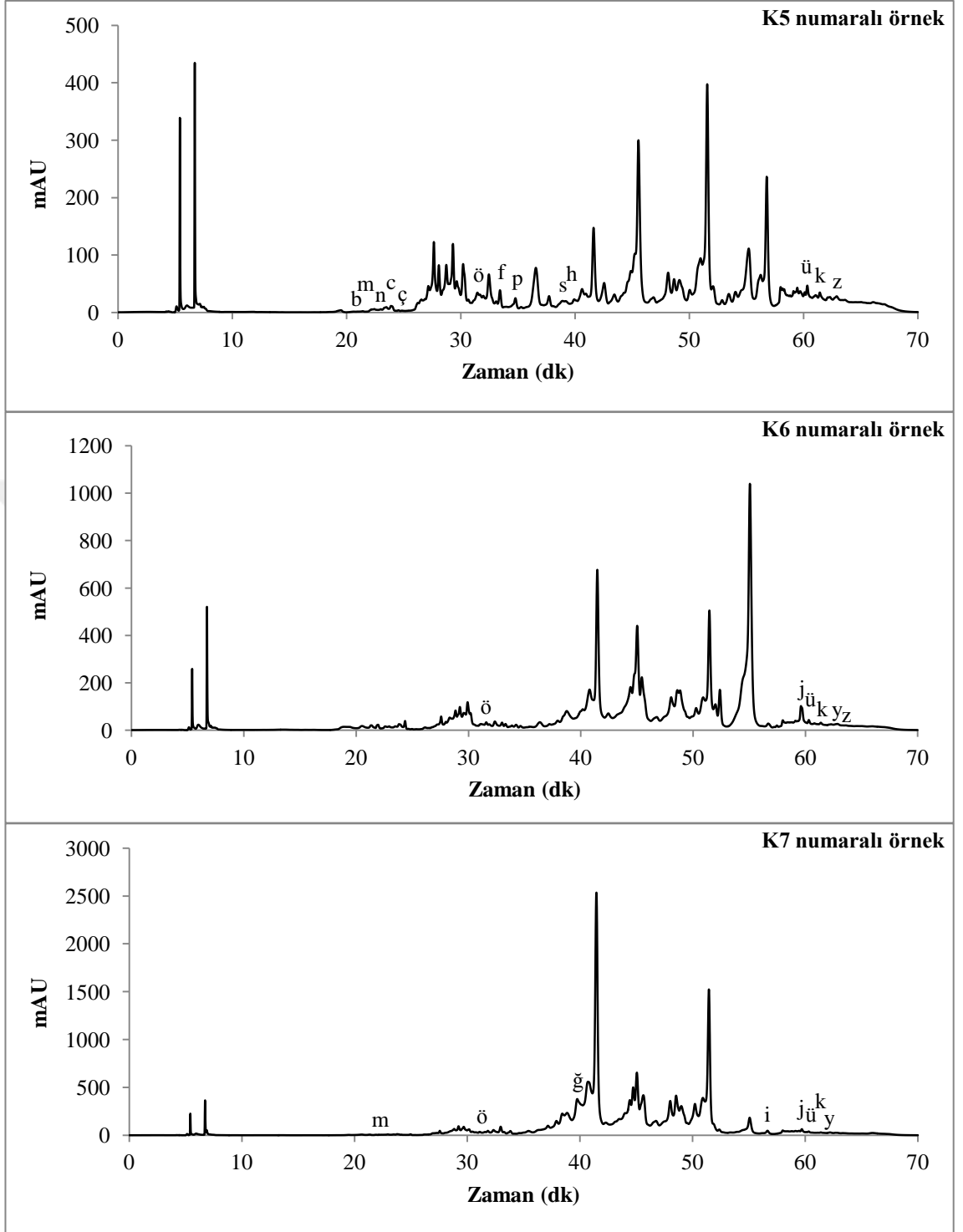
Şekil 4.5. (Devam) Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD kromatogramları (a:protokatekuik asit, b:epigallokateşin, c:epigallokateşin gallat, ç:p-hidroksibenzoik asit, d:epikateşin, e:vanilik asit, f:hiperosid, g:naringin, ğ:rosmarinik asit, h:kuersitrin, ı:luteolin, i:apigenin, j:amentoflavon, k:krisin, l:galangin, m:kateşin, n:klorojenik asit, o:L-triptofan, ö:viteksin, p:kuersetin-3-β-D-glikozit, r:ellagik asit, s:mirisetin, ş:salisilik asit, t:kamferol, u:isorhamnetin, ü:pinocembrin, v:kafeik asit fenetil esteri, y:genkvanin, z: *trans*-kalkon.)



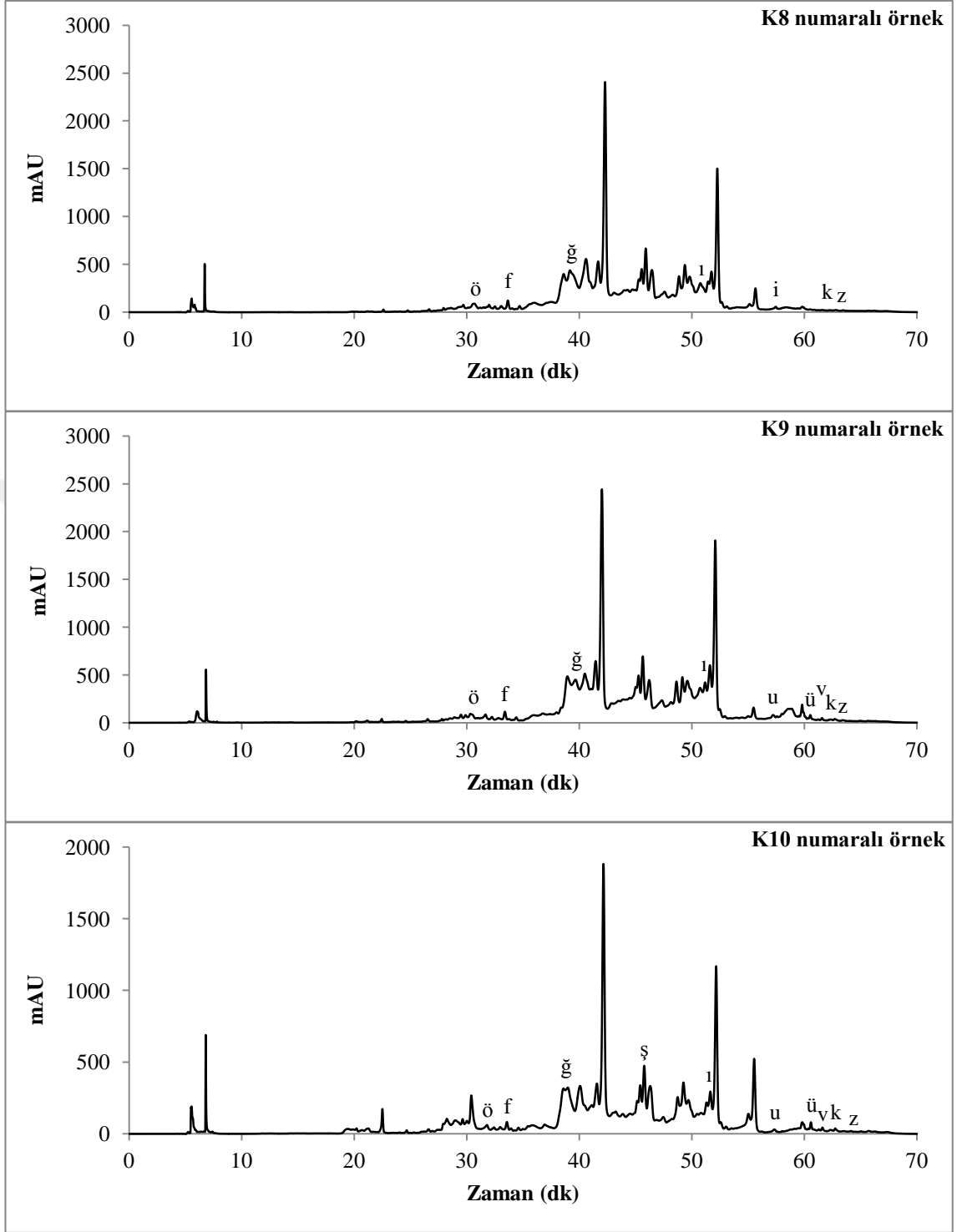
Şekil 4.5. (Devam) Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD kromatogramları (a:protokatekuik asit, b:epigallokateşin, c:epigallokateşin gallat, ç:p-hidroksibenzoik asit, d:epikateşin, e:vanilik asit, f:hiperosid, g:naringin, ğ:rosmarinik asit, h:kuersitrin, ı:luteolin, i:apigenin, j:amentoflavon, k:krisin, l:galangin, m:kateşin, n:klorojenik asit, o:L-triptofan, ö:viteksin, p:kuersetin-3-β-D-glikozit, r:ellagik asit, s:mirisetin, ş:salisilik asit, t:kamferol, u:isorhamnetin, ü:pinocembrin, v:kafeik asit fenetil esteri, y:genkvanin, z: *trans*-kalkon.)



Şekil 4.5. (Devam) Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD kromatogramları (a:protokatekuik asit, b:epigallokateşin, c:epigallokateşin gallat, ç:p-hidroksibenzoik asit, d:epikateşin, e:vanilik asit, f:hiperosid, g:naringin, ğ:rosmarinik asit, h:kuersitrin, ı:luteolin, i:apigenin, j:amentoflavon, k:krisin, l:galangin, m:kateşin, n:klorojenik asit, o:L-triptofan, ö:viteksin, p:kuersetin-3-β-D-glikozit, r:ellagik asit, s:mirisetin, ş:salisilik asit, t:kamferol, u:isorhamnetin, ü:pinocembrin, v:kafeik asit fenetil esteri, y:genkvanin, z: *trans*-kalkon.)



Şekil 4.5. (Devam) Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD kromatogramları (a:protokatekuik asit, b:epigallokateşin, c:epigallokateşin gallat, ç:p-hidroksibenzoik asit, d:epikateşin, e:vanilik asit, f:hiperosid, g:naringin, ğ:rosmarinik asit, h:kuersitrin, ı:luteolin, i:apigenin, j:amentoflavon, k:krisin, l:galangin, m:kateşin, n:klorojenik asit, o:L-triptofan, ö:viteksin, p:kuersetin-3-β-D-glikozit, r:ellagik asit, s:mirisetin, ş:salisilik asit, t:kamferol, u:isorhamnetin, ü:pinocembrin, v:kafeik asit fenetil esteri, y:genkvanin, z: *trans*-kalkon.)



Şekil 4.5. (Devam) Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD kromatogramları (a:protokatekuik asit, b:epigallokateşin, c:epigallokateşin gallat, ç:p-hidroksibenzoik asit, d:epikateşin, e:vanilik asit, f:hiperosid, g:naringin, ğ:rosmarinik asit, h:kuersitrin, ı:luteolin, i:apigenin, j:amentoflavon, k:krisin, l:galangin, m:kateşin, n:klorojenik asit, o:L-triptofan, ö:viteksin, p:kuersetin-3-β-D-glikozit, r:ellagik asit, s:mirisetin, ş:salisilik asit, t:kamferol, u:isorhamnetin, ü:pinocembrin, v:kafeik asit fenetil esteri, y:genkvanin, z: *trans*-kalkon.)

Çizelge 4.9. Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik madde miktarları (mg/kg örnek)

Örnek	ROS	VİT	LU	HİP	PİN	SA	AME
M1	7161,44 ± 45,43	662,85 ± 14,96	872,52 ± 6,70	370,22 ± 4,41	60,01 ± 1,42	x	x
M2	2042,16 ± 111,29	354,05 ± 3,17	287,66 ± 1,46	231,53 ± 0,74	x	x	301,44 ± 14,69
M3	5135,24 ± 181,43	512,62 ± 3,54	x	288,33 ± 7,98	385,07 ± 13,90	x	x
M4	9328,10 ± 396,82	705,53 ± 8,34	780,91 ± 20,22	583,81 ± 18,69	232,11 ± 6,02	x	x
M5	13495,19 ± 335,27	1481,81 ± 36,34	906,53 ± 12,48	574,71 ± 14,64	x	x	x
M6	4528,11 ± 146,83	487,93 ± 0,26	x	231,74 ± 6,01	60,09 ± 0,32	x	x
M7	6844,70 ± 193,97	734,88 ± 45,62	837,63 ± 13,19	456,55 ± 10,60	x	x	x
K1	11581,52 ± 173,65	824,57 ± 34,52	x	274,51 ± 4,11	x	x	x
K2	11519,32 ± 118,35	691,76 ± 29,18	806,47 ± 25,38	353,93 ± 9,89	x	x	x
K3	5991,37 ± 9,17	1218,60 ± 4,68	742,31 ± 21,81	280,12 ± 4,69	87,41 ± 5,57	x	x
K4	x	1719,96 ± 34,83	576,03 ± 9,87	1126,03 ± 19,17	x	x	x
K5	x	1115,02 ± 72,43	x	178,15 ± 10,21	66,19 ± 0,28	x	x
K6	x	382,58 ± 8,79	x	x	71,67 ± 1,46	x	166,88 ± 1,12
K7	3400,32 ± 179,40	577,16 ± 1,80	x	x	162,05 ± 15,69	x	42,75 ± 1,56
K8	7618,89 ± 306,50	675,73 ± 49,22	449,91 ± 9,75	330,61 ± 8,01	x	x	x
K9	8048,24 ± 145,35	1364,63 ± 51,44	412,25 ± 14,22	275,35 ± 8,95	138,22 ± 4,07	x	x
K10	4344,46 ± 166,15	1332,05 ± 11,13	291,94 ± 4,88	283,02 ± 14,49	118,90 ± 6,65	2095,03 ± 6,70	x

Ortalama ± standart sapma, x: tespit edilemedi, ROS: rosmarinik asit, VİT: viteksin, LU: luteolin, HİP: hiperosid, PİN: pinocembrin, SA: salisilik asit, AME: amentoflavon.

Çizelge 4.9. (Devam) Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik madde miktarları (mg/kg örnek)

Örnek	EA	PHBA	KAM	MİR	KAFE	VA	GENK	KRS
M1	x	x	x	x	x	x	x	x
M2	x	x	x	x	x	x	x	26,17 ± 0,79
M3	x	x	x	x	x	x	x	x
M4	x	x	x	x	x	x	x	x
M5	x	x	x	x	x	x	x	x
M6	x	x	x	x	x	x	x	x
M7	x	x	x	x	x	x	47,72 ± 2,06	x
K1	x	x	x	x	x	50,12 ± 3,31	x	18,47 ± 0,23
K2	x	x	x	x	x	x	x	x
K3	x	x	x	x	43,14 ± 0,92	x	18,40 ± 0,52	33,74 ± 0,05
K4	35,83 ± 0,62	x	23,77 ± 0,58	x	x	72,67 ± 0,18	20,36 ± 0,46	24,21 ± 0,44
K5	x	4,82 ± 0,20	x	80,70 ± 5,66	x	x	x	34,17 ± 0,78
K6	x	x	x	x	x	x	21,82 ± 0,85	34,38 ± 1,06
K7	x	x	x	x	x	x	32,95 ± 2,15	44,88 ± 2,35
K8	x	x	x	x	x	x	x	20,00 ± 0,38
K9	x	x	x	x	42,95 ± 0,20	x	x	37,45 ± 0,22
K10	x	x	x	x	24,11 ± 1,33	x	x	33,84 ± 0,12

Ortalama ± standart sapma, x: tespit edilemedi, EA: ellagik asit, PHBA: *p*-hidroksi benzoik asit, KAM: kamferol, MİR: mirisetin, KAFE: kafeik asit-fenetil esteri, VA: vanilik asit, GENK: genkvanin, KRS: krisin.

Çizelge 4.9. (Devam) Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik madde miktarları (mg/kg örnek)

Örnek	LTR	TKAL	KU	API	KUG	İSOR	GAL
M1	x	x	x	x	540,86 ± 52,67	x	x
M2	x	49,36 ± 2,18	x	6239,95 ± 9,59	x	x	x
M3	x	60,96 ± 0,80	x	759,72 ± 10,11	x	x	69,42 ± 6,19
M4	x	29,42 ± 0,52	x	x	x	x	x
M5	201,14 ± 0,21	7,51 ± 0,27	x	x	x	235,44 ± 17,64	x
M6	126,13 ± 2,49	x	x	x	x	x	x
M7	x	27,51 ± 0,29	x	x	x	45,96 ± 1,65	x
K1	x	33,54 ± 3,94	x	x	x	x	x
K2	x	28,70 ± 0,31	x	x	x	x	x
K3	x	38,28 ± 0,27	x	x	x	x	x
K4	x	14,50 ± 0,84	950,57 ± 11,80	x	x	x	17,32 ± 0,90
K5	x	36,25 ± 0,31	199,36 ± 3,86	x	44,42 ± 2,02	x	x
K6	x	15,13 ± 0,62	x	x	x	x	x
K7	x	x	x	322,77 ± 6,52	x	x	x
K8	x	58,24 ± 0,20	x	303,87 ± 8,63	x	x	x
K9	x	52,53 ± 0,28	x	x	x	163,42 ± 6,16	x
K10	x	35,12 ± 0,59	x	x	x	117,30 ± 7,39	x

Ortalama ± standart sapma, x: tespit edilemedi, LTR: L-triptofan, TKAL: *trans*-kalkon, KU: kuersitrin, API: apigenin, KUG: kuersetin-3-β-D-glikozit, İSOR: isorhamnetin, GAL: galangin.

Çizelge 4.9. (Devam) Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik madde miktarları (mg/kg örnek)

Örnek	KLO	NA	PKA	KAT	EKAT	EGK	EGKG
M1	171,22 ± 0,52	x	6,17 ± 0,04	x	x	165,89 ± 0,25	x
M2	x	x	x	x	x	49,84 ± 0,25	x
M3	x	x	12,99 ± 0,18	x	x	x	x
M4	x	x	x	x	x	x	x
M5	x	x	x	x	x	x	x
M6	x	x	x	19,37 ± 0,38	x	x	x
M7	x	x	x	x	x	x	x
K1	104,36 ± 3,83	x	x	x	x	x	x
K2	x	x	6,51 ± 0,41	x	x	155,40 ± 1,23	x
K3	x	x	x	x	x	x	x
K4	x	181,47 ± 8,41	x	145,26 ± 8,59	260,04 ± 16,67	300,64 ± 1,98	x
K5	8,39 ± 0,07	x	x	145,53 ± 2,63	x	331,58 ± 2,22	72,74 ± 1,73
K6	x	x	x	x	x	x	x
K7	x	x	x	205,74 ± 2,04	x	x	x
K8	x	x	x	x	x	x	x
K9	x	x	x	x	x	x	x
K10	x	x	x	x	x	x	x

Ortalama ± standart sapma, x: tespit edilemedi, KLO: klorojenik asit, NA: naringin, PKA: protokatekuik asit, KAT: kateşin, EKAT: epikateşin, EGK: epigallokateşin, EGKG: epigallokateşin gallat.

4.2.3. Kestane arı poleni örneklerinde bulunan karotenoidlerin tayini

Kestane arı poleni örneklerinin karotenoid içeriğinin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenebilmesi için standart karotenoidlerin kromatografik analizleri Çizelge 3.12’de belirtilen HPLC-DAD çözücü programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan karotenoidlerin UV spektrumları ve alıkonma zamanları belirlenmiştir. Çizelge 4.10’da kullanılan standart karotenoid bileşiklerinin alıkonma zamanları ve kromatogramlarda kullanılacak olan kodlamaları verilmiştir. Standart karotenoid bileşiklerinin 0,25–10 mg/L derişim aralığında çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri ve regresyon katsayıları (R^2) Çizelge 4.11’de verilmiştir.

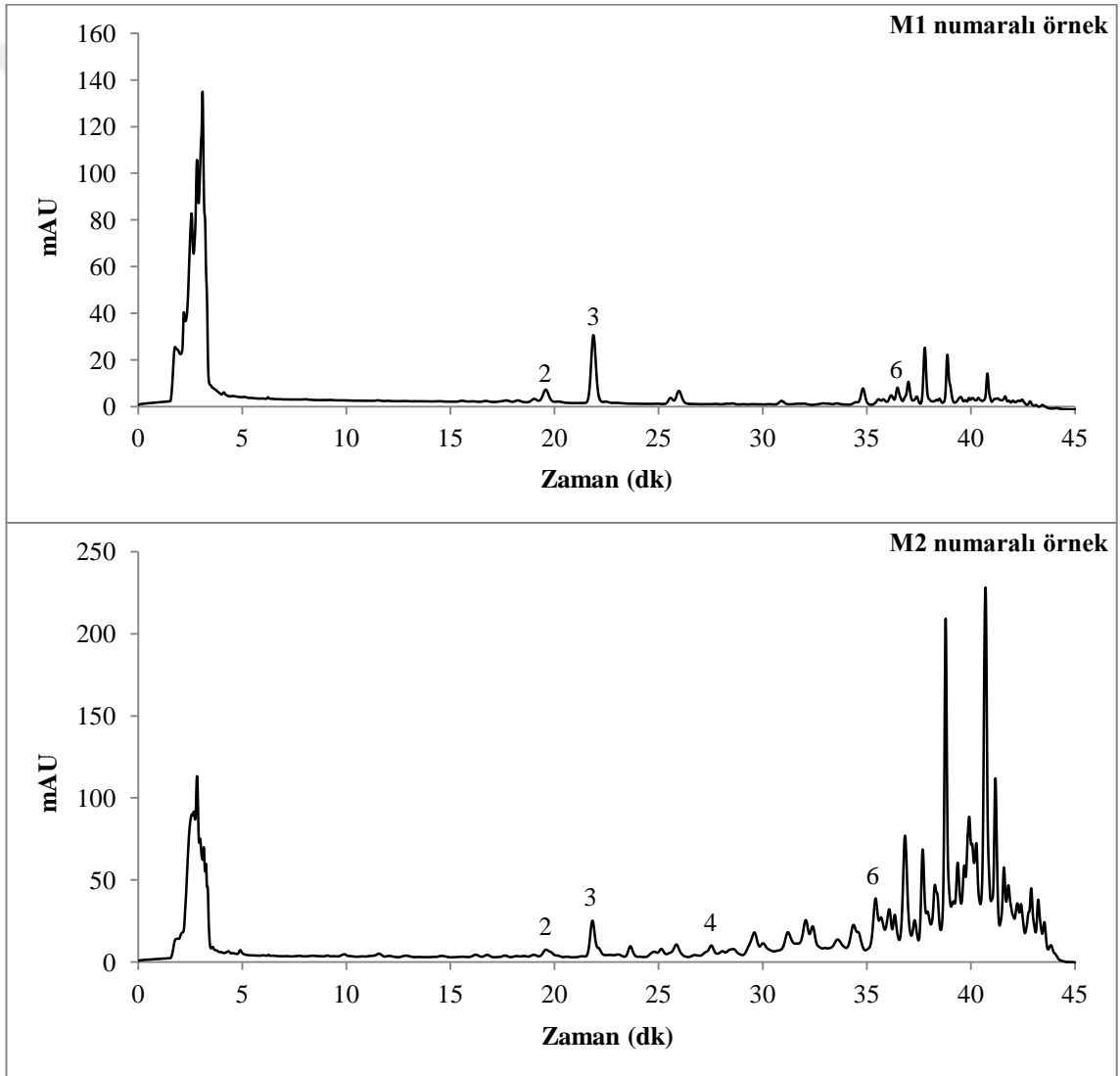
Çizelge 4.10. Standart karotenoid bileşiklerinin alıkonma zamanları ve kodlanması

Karotenoid	Alıkonma Zamanı (dk)	Kodlama
Astaksantin	17.3	1
Lutein	19.7	2
Zeaksantin	21.8	3
β -kriptoksantin	28.5	4
β -karoten	33.4	5
α -karoten	35.9	6

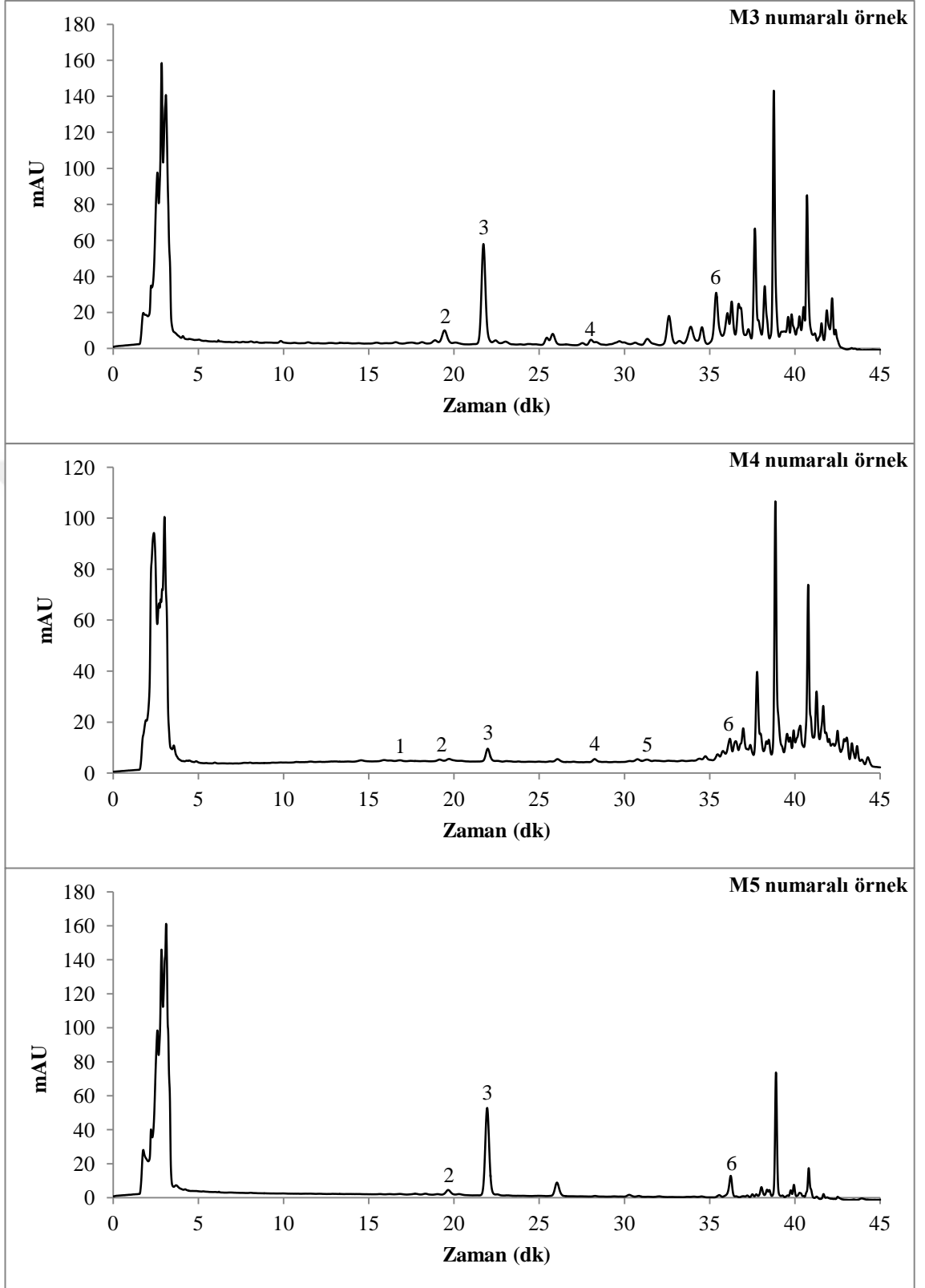
Çizelge 4.11. Standart karotenoidlerin validasyon parametreleri

Karotenoid	Doğru Denklemi	R^2	Derişim aralığı (mg/L)
Astaksantin	$y=153,6x - 86,3$	0,995	0,25-10
Lutein	$y=71,2x - 1,9$	0,998	0,25-10
Zeaksantin	$y=265,7x - 23,0$	0,998	0,25-10
β -kriptoksantin	$y=57,7x - 22,3$	0,997	0,25-10
β -karoten	$y=154,4x - 19,5$	0,998	0,25-10
α -karoten	$y=118,0x - 17,2$	0,999	0,25-10

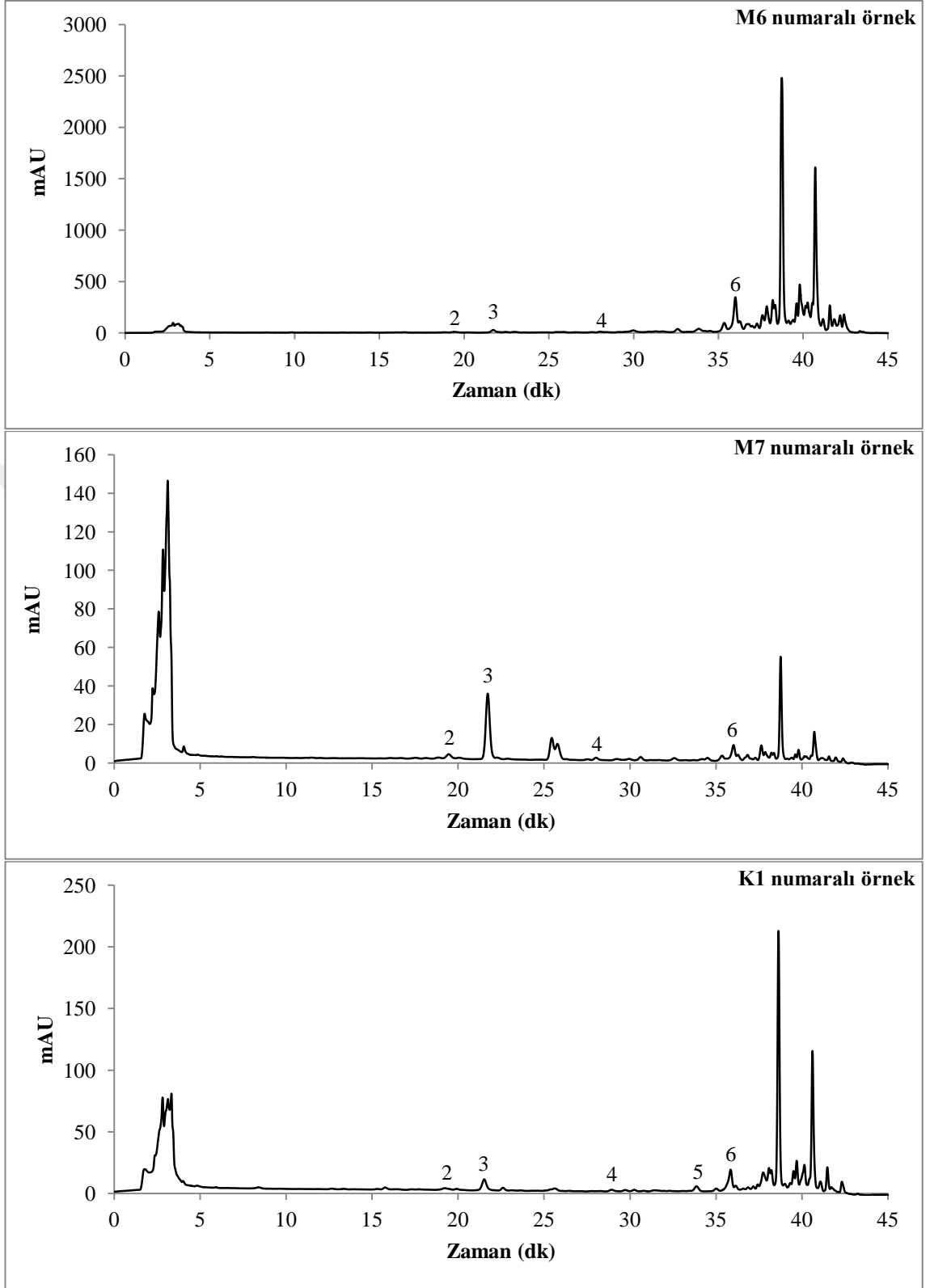
Şekil 3.2’de belirtildiği şekilde hazırlanan kestane arı poleni etanol ekstraktları kromatografik olarak Çizelge 3.12’de belirtilen HPLC-DAD çözücü programı kullanılarak analiz edilmiştir. Kestane arı poleni örneklerinin HPLC-DAD karotenoid kromatogramları Şekil 4.6’da verilmiştir. Elde edilen kromatogramlardaki piklerin UV spektrumları alıkonma zamanlarına göre standartlarla karşılaştırılarak örneklerin karotenoid içerikleri tespit edilmiştir. Daha sonra tespit edilen bu karotenoidlerin pik alanları her bir standart için belirlenen kalibrasyon grafiğinde yerine koyularak örneklerdeki miktarları tayin edilmiştir. Kestane arı poleni örneklerindeki karotenoidlerin miktarları mg/kg örnek olarak Çizelge 4.12’de verilmiştir.



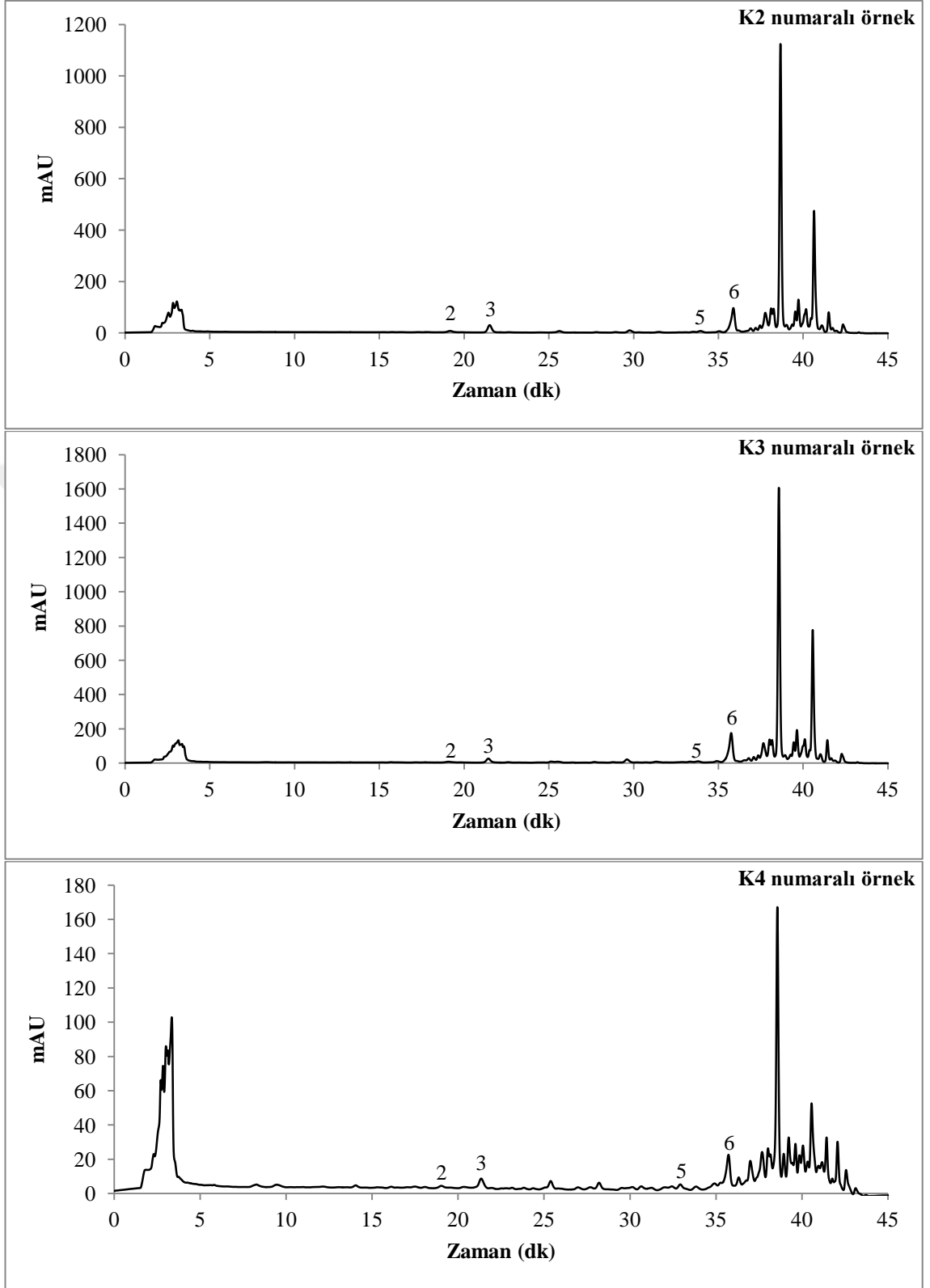
Şekil 4.6. Kestane arı poleni etanol ekstraktlarının HPLC-DAD karotenoid kromatogramları (1: astaksantin, 2: lutein, 3: zeaksantin, 4: β -kriptoksantin, 5: α -karoten, 6: β -karoten.)



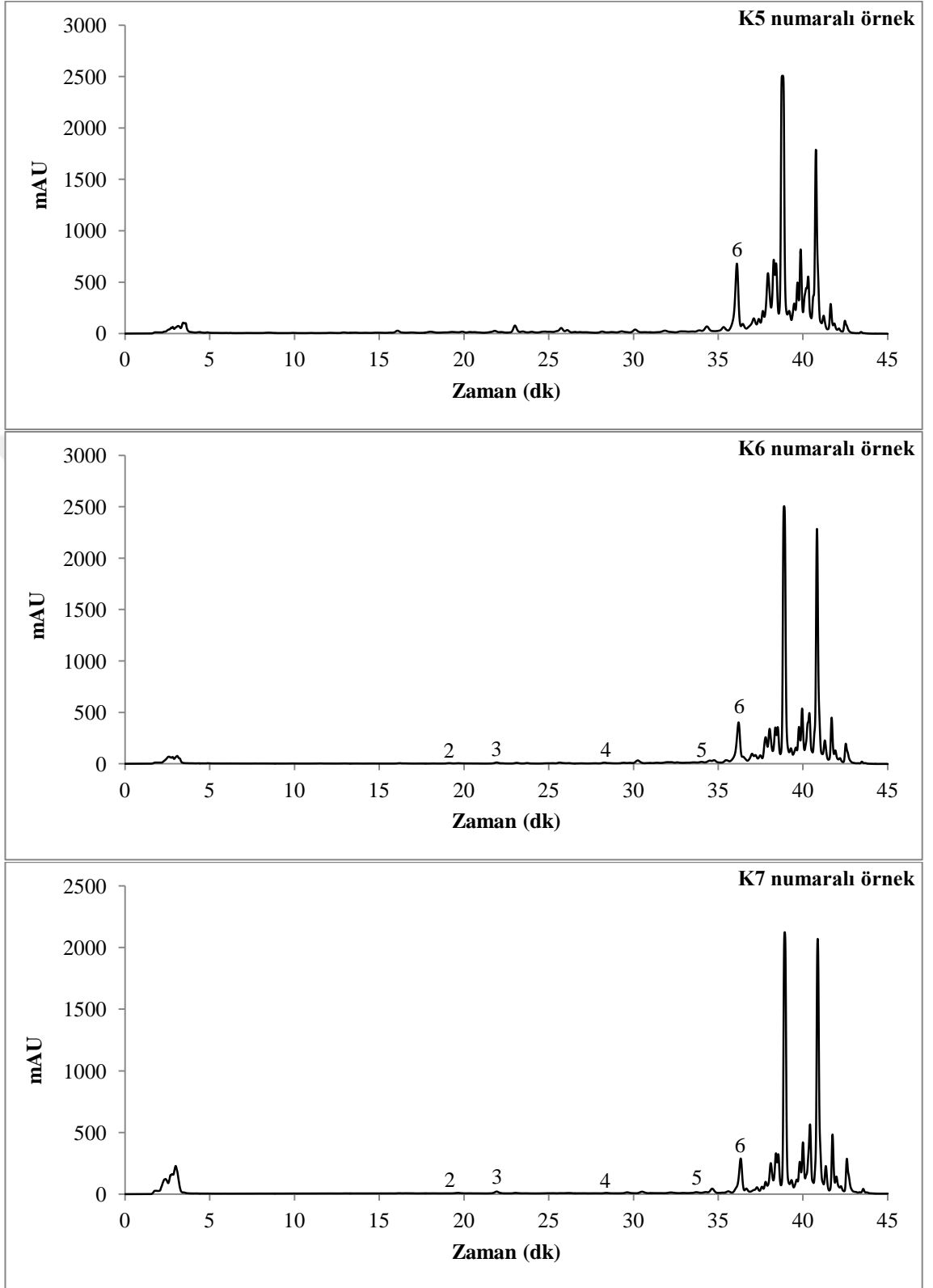
Şekil 4.6. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin HPLC-DAD karotenoid kromatogramları (1: astaksantin, 2: lutein, 3: zeaksantin, 4: β -kriptoksantin, 5: α -karoten, 6: β -karoten.)



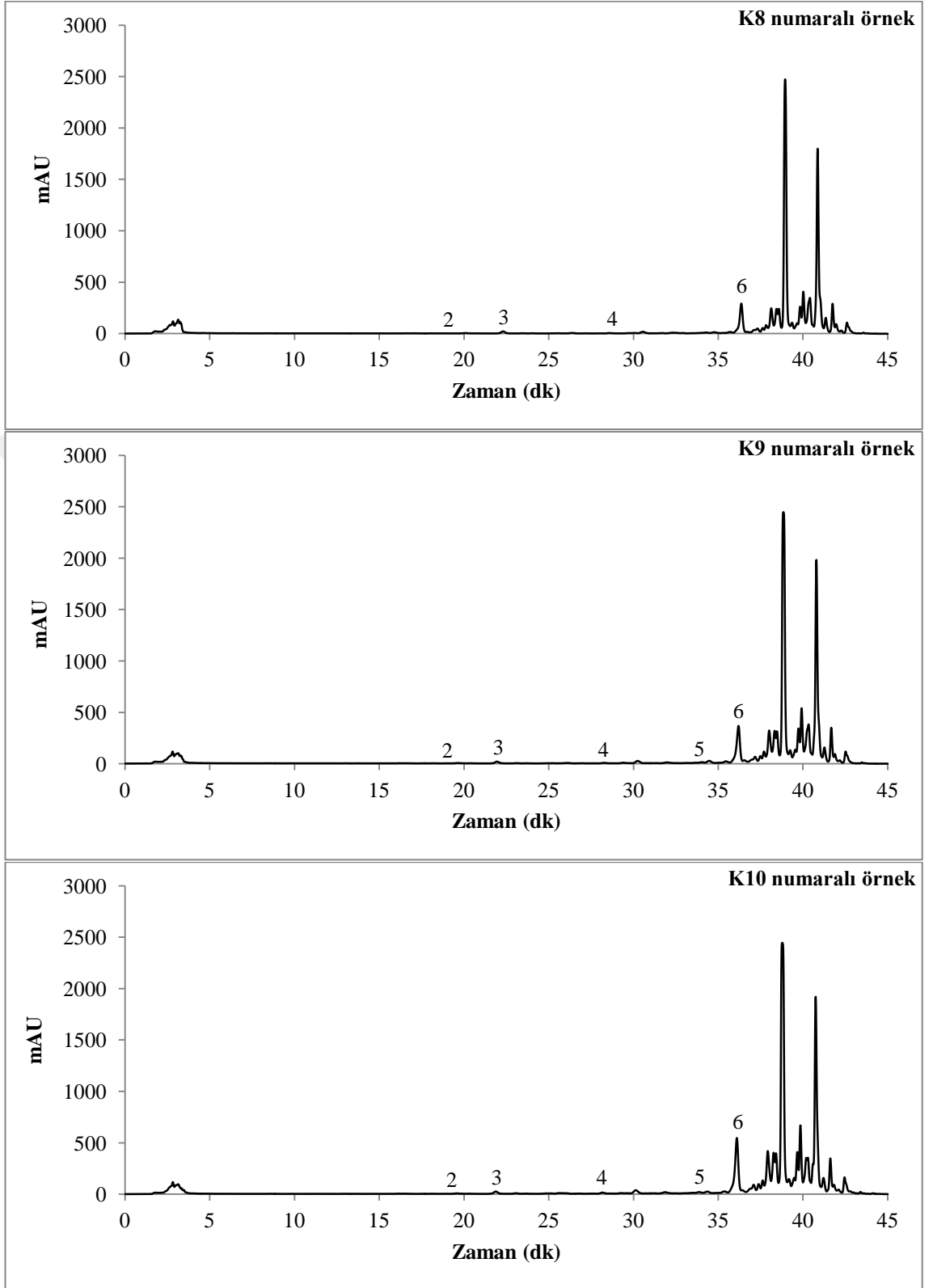
Şekil 4.6. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin HPLC-DAD karotenoid kromatogramları (1: astaksantin, 2: lutein, 3: zeaksantin, 4: β -kriptoksantin, 5: α -karoten, 6: β -karoten.)



Şekil 4.6. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin HPLC-DAD karotenoid kromatogramları (1: astaksantin, 2: lutein, 3: zeaksantin, 4: β -kriptoksantin, 5: α -karoten, 6: β -karoten.)



Şekil 4.6. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin HPLC-DAD karotenoid kromatogramları (1: astaksantin, 2: lutein, 3: zeaksantin, 4: β -kriptoksantin, 5: α -karoten, 6: β -karoten.)



Şekil 4.6. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin HPLC-DAD karotenoid kromatogramları (1: astaksantin, 2: lutein, 3: zeaksantin, 4: β -kriptoksantin, 5: α -karoten, 6: β -karoten.)

Çizelge 4.12. Kestane arı poleni örneklerindeki karotenoid miktarları (mg/kg örnek)

Örnek	AST	LU	ZEA	β-KRİP	α-KAR	β-KAR
M1	x	15,00 ± 0,10	17,30 ± 0,56	x	x	4,45 ± 0,01
M2	x	18,75 ± 0,02	15,82 ± 0,16	24,13 ± 0,29	x	21,01 ± 0,18
M3	x	5,91 ± 0,09	6,97 ± 0,14	9,41 ± 0,06	x	8,39 ± 0,17
M4	6,88 ± 0,05	20,20 ± 0,03	36,38 ± 0,21	21,51 ± 0,05	6,63 ± 0,02	40,81 ± 0,00
M5	x	7,30 ± 0,15	32,44 ± 0,28	x	x	2,42 ± 0,01
M6	x	33,42 ± 0,35	20,73 ± 0,30	44,67 ± 0,61	x	294,42 ± 8,43
M7	x	7,22 ± 0,02	25,15 ± 0,06	7,81 ± 0,05	x	9,51 ± 0,16
K1	x	4,40 ± 0,07	8,03 ± 0,05	7,55 ± 0,10	6,84 ± 0,09	19,31 ± 0,12
K2	x	18,59 ± 0,18	27,20 ± 0,04	x	152,42 ± 0,04	116,68 ± 0,03
K3	x	13,19 ± 0,38	16,32 ± 0,00	x	9,80 ± 0,10	179,68 ± 1,60
K4	x	3,88 ± 0,08	4,88 ± 0,05	x	6,20 ± 0,01	31,42 ± 0,33
K5	x	x	x	x	x	388,20 ± 9,77
K6	x	8,77 ± 0,03	8,72 ± 0,10	30,49 ± 0,16	25,99 ± 0,36	296,12 ± 0,33
K7	x	12,58 ± 0,07	12,21 ± 0,34	14,65 ± 0,07	19,84 ± 0,12	289,38 ± 3,86
K8	x	8,12 ± 0,04	13,14 ± 0,03	32,47 ± 0,10	x	271,25 ± 0,08
K9	x	9,50 ± 0,03	11,84 ± 0,12	18,68 ± 0,18	7,95 ± 0,05	289,52 ± 1,47
K10	x	12,98 ± 0,15	15,57 ± 0,22	34,21 ± 0,20	31,06 ± 0,15	395,02 ± 2,48

Ortalama ± standart sapma, x: tespit edilemedi, AST: astaksantin, LU: lutein, ZEA: zeaksantin, β-KRİP: β-kriptoksantin, α-KAR: α-karoten, β-KAR: β-karoten.

4.2.4. Kestane arı poleni örneklerinin DNA oksidatif baz hasar ürünlerine etkisi

DNA çeşitli mekanizmalarla sürekli olarak oksidatif hasara uğrar (Dizdaroglu 2012). DNA'da oluşan bu oksidatif hasarın doğal sebze ve meyvelerin içerdikleri antioksidanlar tarafından korunduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, yüksek antioksidan özelliklere sahip bir ürün olan kestane arı polenin DNA oksidatif hasarı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Kestane arı poleni örneklerinin DNA oksidasyonunu önleme etkisinin incelenmesi için Şekil 3.4'te belirtilen şekilde hazırlanan DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin kromatografik olarak Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14'te belirtilen GC-MS/MS çalışma koşullarında analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir hasar ürününün belli derişim aralıklarında belirlenen doğru denklemleri ve regresyon katsayıları Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çizelge 4.13. DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin validasyon parametreleri

DNA baz hasar ürünü	Doğru denklemi	R ²	Derişim aralığı (µg/L)
56DHT	$y = 16646x + 18767$	0,9999	0,25-200
56DHU	$y = 29866x + 26116$	0,9999	0,25-200
5H5MH	$y = 139484x + 40828$	0,9995	0,25-200
5HH	$y = 332926x + 456151$	0,9999	0,10-200
5FU	$y = 37526x + 182000$	0,9985	0,50-200
5HU	$y = 180247x - 71952$	0,9983	0,25-200
5HMU	$y = 35141x + 5368$	0,9997	0,05-200
Alx	$y = 403716x - 448535$	0,9985	0,10-200
5HC	$y = 234156x - 344006$	0,9969	0,10-200
46D5NP	$y = 25379x - 19999$	0,9978	0,50-200
TG	$y = 650289x + 807385$	0,9966	0,10-200
5HMC	$y = 12495x - 2449$	0,9991	0,10-200
FapyAde	$y = 123507x + 139198$	0,9998	0,10-200
8HA	$y = 204511x + 825496$	0,9918	0,10-200
2HA	$y = 8172x + 55630$	0,9104	0,25-200
FapyGua	$y = 99348x - 214935$	0,9962	0,25-200
28DHA	$y = 63055x - 139448$	0,9976	0,50-400
8HG	$y = 82775x + 2508$	0,9874	0,10-25

Fenton reaksiyonu ile oksidatif strese uğratılan DNA ve kestane arı poleni ilave edilerek oksidatif strese uğratılan DNA örnekleri Şekil 3.4'te belirtildiği şekilde analize hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14'te belirtilen GC-MS/MS çalışma koşullarında analiz edilerek her bir standart baz hasar ürününün oluşum miktarları belirlenmiştir. Çizelge 4.13'te verilen sonuçlara göre M0 numaralı kestane arı poleni örneğinin oksidatif stres sonrası DNA'da oluşan baz hasar ürünlerinin oluşumunu önleme etkisi hesaplanmıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Kestane polenin DNA hasarını önleme etkisi (%)

DNA oksidatif baz hasar ürünleri	DNA (ng/g DNA)	DNA+Polen (ng/g DNA)	Kestane polenin DNA hasarını önleme etkisi (%)
56DHU	5,52	3,11	43,64
5H5MH	22,18	5,91	73,36
5HH	29,42	8,94	69,61
5HU	5,23	0,38	92,81
5HMU	8,57	2,78	67,55
Alx	4,05	0,58	85,60
5HC	3,85	3,73	3,01
46D5NP	1,30	1,30	0,00
TG	0,93	0,68	26,85
5HMC	0,34	0,34	0,00
46D5FP	0,00	0,00	0,00
8HA	0,00	0,00	0,00
2HA	0,00	0,00	0,00
FapyGua	3,02	2,96	1,71
28DHA	0,73	0,42	42,54
8HG	7,74	1,26	83,78
TOPLAM	92,87	32,39	65,12

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaşamımız boyunca hücrelerde meydana gelen kimyasal reaksiyonlar veya UV-ışınları, sigara dumanı, çevre kirlilikleri gibi çeşitli dış etkenlerle birlikte vücudumuzdaki oksidan-antioksidan dengesi bozularak serbest radikal oluşumu gerçekleşmektedir. Oluşan bu duruma karşı vücudun savunma mekanizması yetersiz kaldığında serbest radikaller DNA, yağ, protein gibi yapılara saldırarak bu yapılarda oksidatif hasar oluştururlar. Askorbik asit, tokoferol, karotenoid ve fenolik bileşik gibi antioksidan özellikli moleküller serbest radikallere elektron vererek onları etkisiz hale getirirler. Böylece serbest radikal etkisini ortadan kaldırarak doku fonksiyonlarının bozulması sonucu ortaya çıkabilecek ve birçok hastalığa neden olabilecek zincir reaksiyonları, önlemiş olurlar (Leja ve ark. 2007, Kolaç ve ark. 2017).

Günümüzde fenolik bileşiklere olan ilgi antioksidan özelliği ve serbest radikal süpürücü aktivitesine bağlı olarak artmıştır. Eski çağlardan beri bal, polen, propolis gibi arı ürünleri zengin içeriğinden dolayı geleneksel tıbbın yanı sıra besin takviyesi olarak da kullanılmaktadır (Isla ve ark. 2001). Arı poleni zengin fenolik madde içeriği sebebiyle diğer arı ürünlerine nazaran sahip olduğu anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-kanser, anti-inflamatuar gibi terapötik özellikleri açısından son zamanların ilgi odağı olmuştur (Carpes ve ark. 2007). Bu doğrultuda farklı coğrafî ve bitki kökenli arı poleni örneklerinin antioksidan özelliklerinin araştırılması önem kazanmıştır. Türkiye'nin kestane üretimi açısından Dünya sıralamasında önemli bir yere sahip olması ve literatüre bakıldığında kromatografik olarak (nicel analiz) kestane arı poleni ile yapılmış çok fazla çalışma olmaması sebebiyle bu tez kapsamında farklı coğrafi bölgelerden toplanan kestane arı poleni örnekleriyle çalışılmıştır.

Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik bileşiklerin tayininin doğru bir şekilde yapılabilmesi için örnek hazırlama aşaması son derece önemlidir. Fenolik bileşikler serbest formda bulunup bulunmadığına, yağ asitleri (çözünbilir esterler) veya çözünmeyen makromoleküller gibi diğer moleküllere kovalent olarak bağlı olup olmadığına bağlı olarak serbest, esterlenmiş ve çözünmeyen-bağlı formlara ayrılabilir. Çözünmeyen-bağlı fenoliklerin çoğu, kimyasal olarak, pektin, selüloz ve yapısal proteinler dahil olmak üzere hücre duvarı maddeleri ile kovalent bağlar oluştururlar.

Gıdaların antioksidan özelliğinden, çözünür fenoliklere kıyasla çözünmeyen bağlı fenolik bileşiklerin nispeten daha büyük bir miktarda sorumlu olduğu bilinmektedir (Shahidi ve Yeo 2016). Bağlı fenolik bileşikleri serbest bırakmak için alkali, asidik veya enzimatik hidroliz yöntemleri kullanılabilir (Sani ve ark. 2012, Su ve ark. 2014). Çalışma kapsamında kestane arı poleni örneklerinin ekstraksiyonu, bağlı fenolikleride ekstrakte edebilmek için asidik hidroliz yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.2). Tez kapsamında ekstrakte edilen kestane arı poleni örneklerindeki fenolik bileşiklerin tayini için kullanılan yöntemler iki ana başlıkta toplanabilir. Bunlar;

- Spektroskopik yöntemler
- Kromatografik yöntemler

5.1. Spektroskopik Yöntemler

5.1.1. Kestane arı poleni örneklerinin antioksidan özelliklerinin belirlenmesi

Literatüre bakıldığında spektroskopik olarak antioksidanlar Folin-Ciocalteu, CHROMAC, FRAP, CUPRAC, ABTS ve DPPH gibi yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Yapılan tez çalışmasında toplam fenolik madde miktarının tespiti için Folin-Ciocalteu yöntemi, antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için ise CHROMAC, FRAP ve ABTS yöntemleri kullanılmıştır.

Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'nin farklı lokalitelerinden toplanan kestane arı poleni örneklerinin toplam fenolik madde içerikleri $16,19 \pm 0,25$ ile $39,50 \pm 0,45$ mg GAE/g örnek arasında bulunmuştur (Çizelge 4.3). Yıldız ve ark. (2013), 2008 yılında Zonguldak'tan toplanan kestane polenin toplam fenolik madde miktarını $28,87$ mg GAE/g DW olarak tespit etmişlerdir. Sonuç, tez kapsamında 2017 yılında Zonguldak ilinin farklı bölgelerinden toplanan kestane poleni örneklerinin toplam fenolik madde içerikleri ile karşılaştırıldığında ortalama değerinin altında olduğu gözlenmiştir. Aynı şekilde Karadeniz bölgesinden toplanan kestane poleni örneği (Yıldız ve ark. 2014) ile 2013 yılında Sinop'un farklı bölgelerinden toplanan kestane poleni örneklerinin (Avşar ve ark. 2016) toplam fenolik madde miktarları sırasıyla $52,12$ mg GAE/g kestane poleni

ve 64,02 - 103,8 mg GAE/g kestane poleni olarak bulunmuştur. Sonuçlar elde ettiğimiz verilerle karşılaştırıldığında tez sonuçlarının daha düşük olduğu görülmüştür. Gözlenen bu farklılıklar kestane poleni örneklerinin farklı coğrafi ve botanik özelliklere sahip olması ile ekstraksiyon yöntemlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Kestane arı poleni örneklerinin antioksidan kapasite sonuçları FRAP yöntemi ile $1,53 \pm 0,06$ - $4,75 \pm 0,02$ mM TE/g kestane arı poleni, ABTS ve CHROMAC yöntemi ile sırasıyla $13,85 \pm 0,03$ - $42,58 \pm 0,28$ mg TE/g kestane arı poleni ve $45,48 \pm 0,27$ - $115,58 \pm 0,96$ mg TE/g kestane arı poleni olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Zonguldak'tan alınan kestane balı örneği (Sarıkaya ve ark 2009) ile 2014 yılında Karadeniz'in farklı coğrafi bölgelerindeki arıcılardan temin edilen kestane balı örneklerinin (Kolaylı ve ark. 2016) FRAP yöntemi ile antioksidan kapasite sonuçları sırasıyla, $94,27 \pm 0,91$ - $104,42 \pm 1,01$ μ M TE/g kestane balı ve $355 \pm 23,08$ - $462 \pm 18,48$ μ mol FeSO₄/100 g kestane balı olarak bulunmuştur. Almeida ve ark. (2017) 'nın liyofilize arı poleni ile yaptıkları çalışmada antioksidan kapasite değeri FRAP yöntemi ile $60,64 \pm 0,63$ mmol Fe/g arı poleni olarak bulunmuştur. Ulusoy ve Kolaylı (2014) 'nın 2007-2008 yıllarında toplanan anzer polenleri ile yaptıkları diğer bir çalışmada ise antioksidan kapasite sonuçları $11,77 \pm 0,63$ ile $105,06 \pm 0,59$ μ mol TE/g anzer poleni aralığında bulunmuştur. Yıldız ve ark. (2013) 'nın kestane poleni ile yaptıkları çalışmada ise antioksidan kapasite sonucu (FRAP) $82,31 \pm 2,41$ mM TE/g DW olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Karadeniz Bölgesi'nden toplanan kestane balı, kestane poleni ve kestane propolisinin antioksidan kapasite değerleri sırasıyla, $24,11 \pm 1,10$, $124,62 \pm 4,88$ ve $509,86 \pm 12,11$ mM TE/g örnek olarak kaydedilmiştir (Yıldız ve ark. 2014). Genel olarak bakıldığında tez kapsamında FRAP yöntemi ile elde edilen antioksidan kapasite değerleri literatürden daha yüksek bulunmuştur.

Almeida ve ark. (2017) liyofilize arı poleninin antioksidan kapasitesini ABTS yöntemi ile belirlemiş ve $120,10 \pm 0,21$ μ mol TEAC/g arı poleni olarak bulmuşlardır. Yapılan diğer bir çalışmada ise Türkiye'nin farklı bölgelerindeki arıcılardan temin edilen kestane ballarının antioksidan kapasite değerleri $1,06 \pm 0,06$ ve $6,22 \pm 0,23$ mg TE/g kestane balı aralığında bulunmuştur (Güneş ve ark. 2016). Buna göre tez kapsamında çalışılan kestane arı poleni örneklerinin antioksidan özelliği daha yüksektir.

CHROMAC yöntemi yeni gelişen bir yöntem olduğundan literatürde çok çalışma bulunmamaktadır. Bildiğimiz kadarıyla Güneş ve ark. (2016) 'nın kestane ve çiçek ballarıyla yaptıkları araştırma dışında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Elde ettikleri verilere göre kestane ballarının antioksidan kapasite değerleri $10,80 \pm 0,01$ ve $22,00 \pm 1,00$ mg TE/kg arasında değişmektedir. Bu veriler doğrultusunda tez kapsamında analiz edilen kestane arı polenlerindeki antioksidan kapasite değerleri kestane ballarına oranla daha yüksek bulunmuştur.

Genel olarak kestane arı poleni örneklerinin antioksidan kapasite ölçümlerinde 3 farklı yöntem kullanılmıştır. Çünkü antioksidan kapasitenin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin her biri farklı çalışma mekanizmasına sahiptir. Etki ettikleri fenolik bileşikler farklı olduğu için örneklerdeki antioksidan kapasite değerleride farklı olacaktır. Bu nedenle sonuçlar literatürdeki örneklerle karşılaştırılırken aynı yöntemler birbiri ile karşılaştırılarak yorumlanırsa daha sağlıklı sonuçlara ulaşılabilecektir. Yapılan tez çalışmasında spektroskopik yöntemler birbirleriyle karşılaştırıldığında, yöntemler arasında yüksek korelasyonların olduğu gözlenmiştir. Folin-Ciocalteu yöntemi ile ABTS ve FRAP yöntemleri arasındaki korelasyon katsayıları (R^2) sırasıyla, 0,8991 ve 0,8114, ABTS ile FRAP yöntemleri arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) ise 0,6294 olarak belirlenmiştir. Yöntemler arasındaki yüksek korelasyon, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğunu göstermektedir.

Kestane arı poleni örneklerindeki toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasite miktarları literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında farklı sonuçların elde edildiği gözlemlenmiştir. Flavonoid ve fenolik asit gibi fenolik bileşikler, her bir bitki için benzersiz bir profile sahiptir. Kestane ağaçlarının coğrafi bölgelerinin farklı olmasından dolayı toprak tipi ve iklim koşullarındaki farklılıklar kestane arı poleni örneklerindeki fenolik bileşik içeriğini belirlemektedir. Ayrıca arıcılık faaliyetleri, saklama koşulları, örnek hazırlama teknikleri ve ekstraksiyon koşulları gibi faktörlerde örneklerin fenolik madde içeriğini etkilemektedir.

5.1.2. Kestane arı polenin DNA oksidasyonuna etkisinin incelenmesi

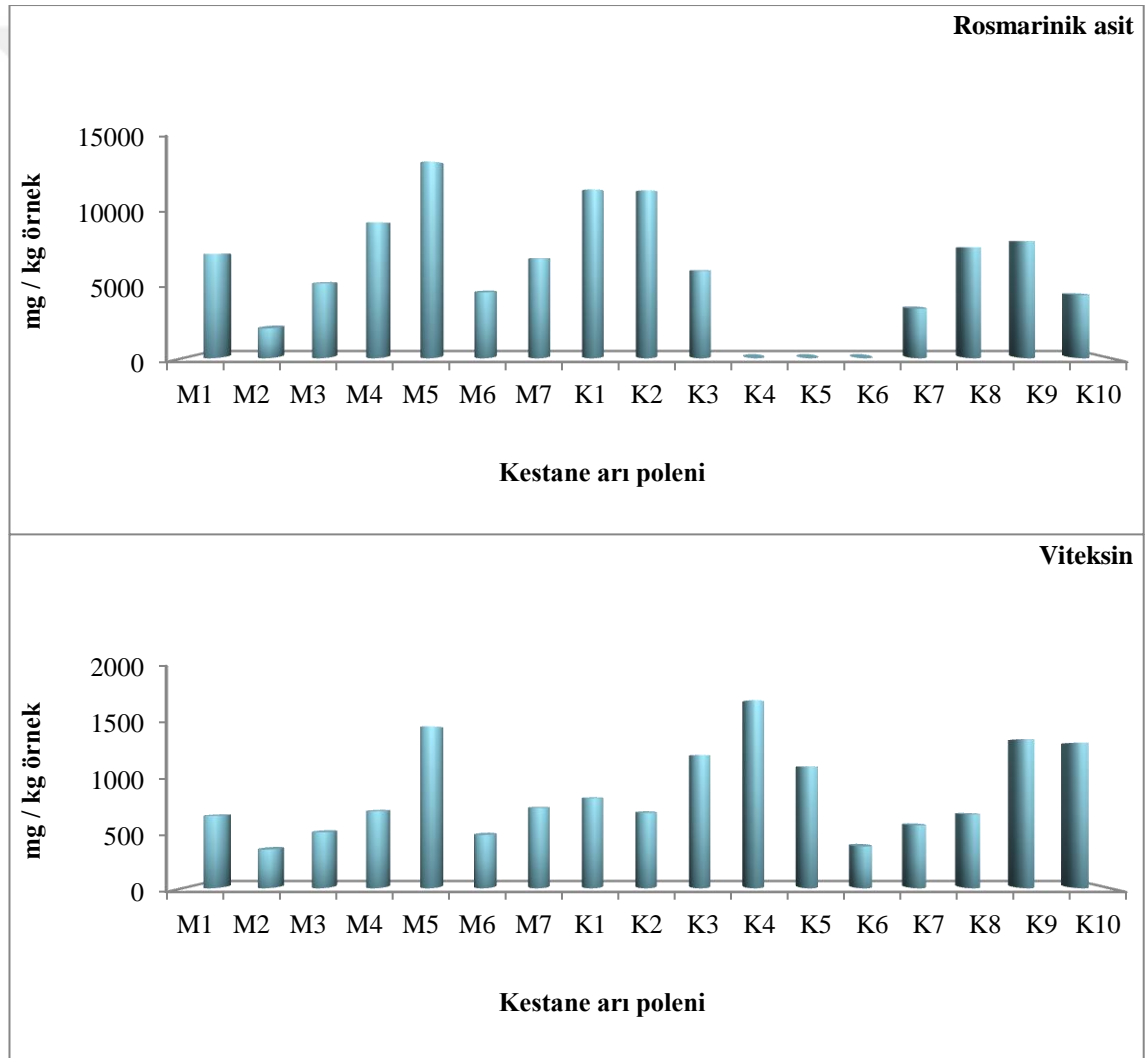
DNA hasarı, canlı hücrelerde çeşitli mekanizmalarla oksidatif olarak ortaya çıkmaktadır (Dizdaroğlu 2012). İnsan vücudunda doğal olarak var olan savunma mekanizması yetersiz kaldığında DNA hasarı tamir edilemez ve çeşitli mutasyonlar, kanser gibi birçok hastalık oluşmaya başlar. Sebze ve meyvelerin bünyelerinde doğal olarak içerdikleri fenolik bileşiklerin antioksidatif etki göstererek DNA hasarını koruduğu bilinmektedir. Bu çalışmada yüksek antioksidan özelliklere sahip, doğal bir ürün olan kestane arı polenin DNA hasarı üzerindeki etkisi incelenmiştir. 20,0 µg/mL derişimindeki saf DNA'nın Fenton reaksiyonu ile oksidatif hasara uğradıktan sonra miktarının 10,2 µg/mL 'ye düştüğü görülmüştür. Ancak kestane arı poleni varlığında oksidatif hasara uğratılan DNA'nın miktarının 12,4 µg/mL'ye düştüğü tespit edilmiştir. Normal şartlarda %49 oranında oksidatif hasara uğrayan DNA, kestane arı polenin varlığında %38 oranında oksidatif hasara uğramıştır. Kestane arı poleni örneğindeki fenolik bileşiklerin DNA'nın oksidatif hasara uğramasını %11 oranında önlediği belirlenmiştir (Şekil 4.2) (Karkar ve ark. 2018).

5.2. Kromatografik Yöntemler

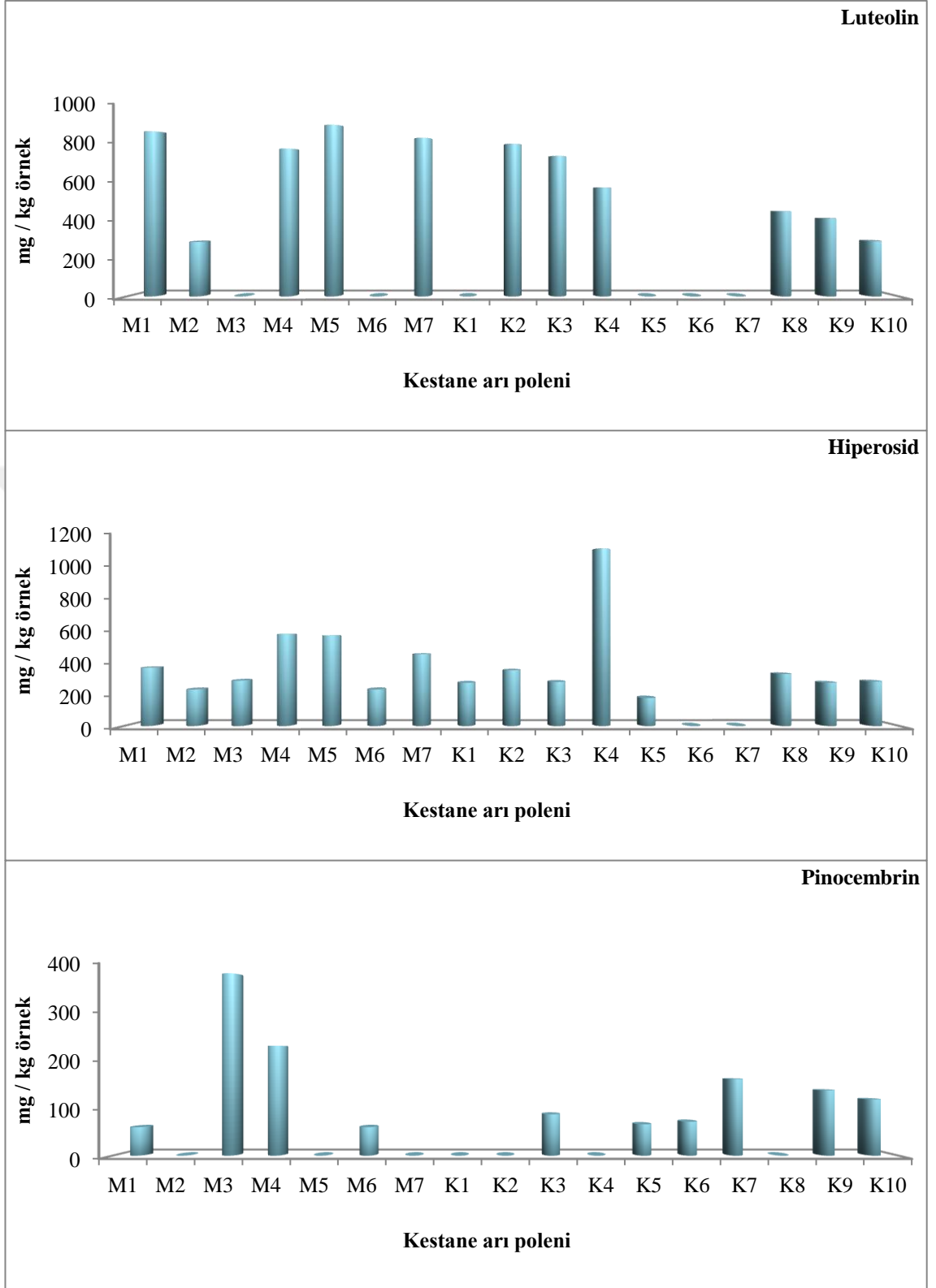
5.2.1. Kestane arı poleninde bulunan fenolik bileşiklerin tayini

Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik bileşikleri kromatografik olarak HPLC-DAD ile analiz edebilmek için öncelikle uygun kolon, çözücü ve çözücü programı belirlenmiştir. Bunun için literatürdeki benzer çalışmalar incelenmiş ve XBridge C18 (3,5 µm, 4,6 x 250 mm) kolonu ile çalışılmıştır. Ters faz kromatografisi kullanılarak metanol ve %1'lik sulu formik asit gibi polar çözücülerden oluşan gradient programlı (Çizelge 3.11) hareketli faz sistemi kullanılmıştır. 0,5 mL/dk akış hızı ve 10 µL enjeksiyon hacmi ile standart fenolik bileşiklerin ve kestane poleni etanol ekstraktlarının analizleri gerçekleştirilmiştir.

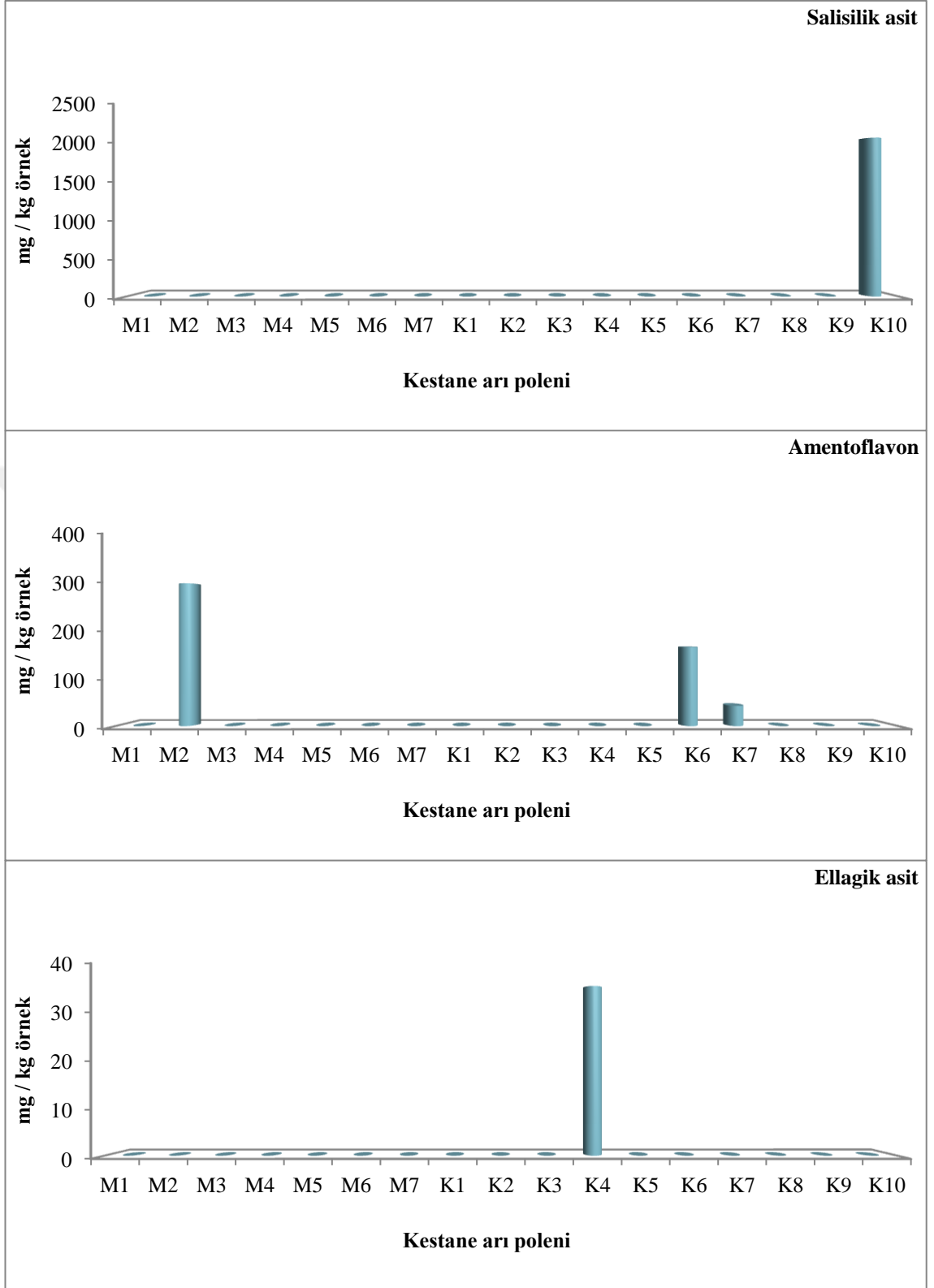
0,2-10,0 mg/L derişim aralığında Çizelge 3.11’de belirtilen çözücü programı kullanılarak tüm standartlar analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramlardan fenolik bileşiklerin pik alanları belirlenerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Çizelge 4.7). Aynı koşullarda analiz edilen kestane arı poleni örneklerinin kromatogramları incelenerek fenolik bileşik profilleri belirlenmiştir. Daha sonra belirlenen kalibrasyon grafikleri yardımıyla fenolik bileşiklerin miktarları mg/kg örnek olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Farklı lokaliteden toplanan kestane arı poleni örneklerinin oldukça farklı fenolik bileşik içeriğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Şekil 5.1’de kestane arı poleni örneklerindeki fenolik bileşiklerin bar grafikleri verilmiştir.



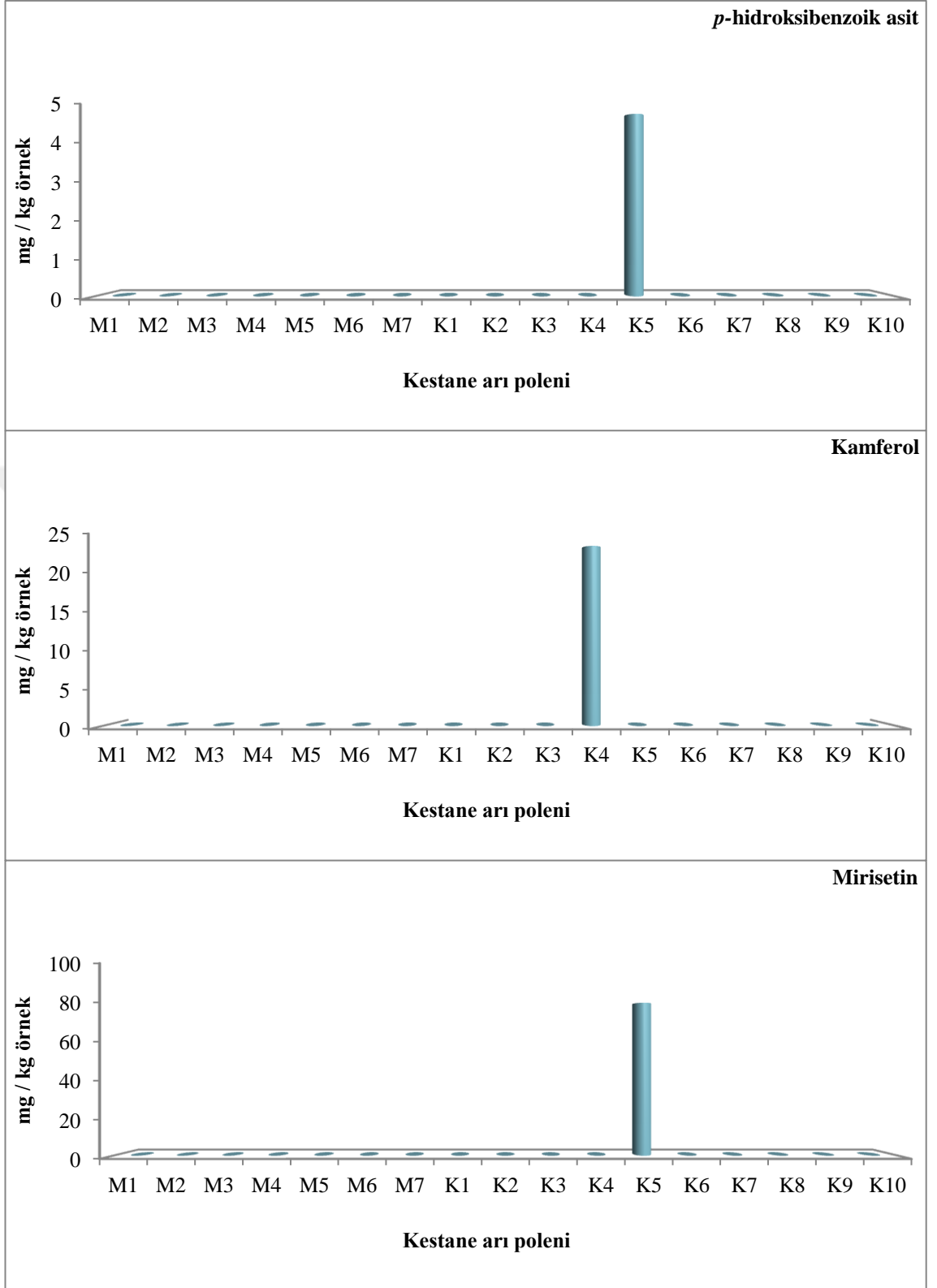
Şekil 5.1. Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



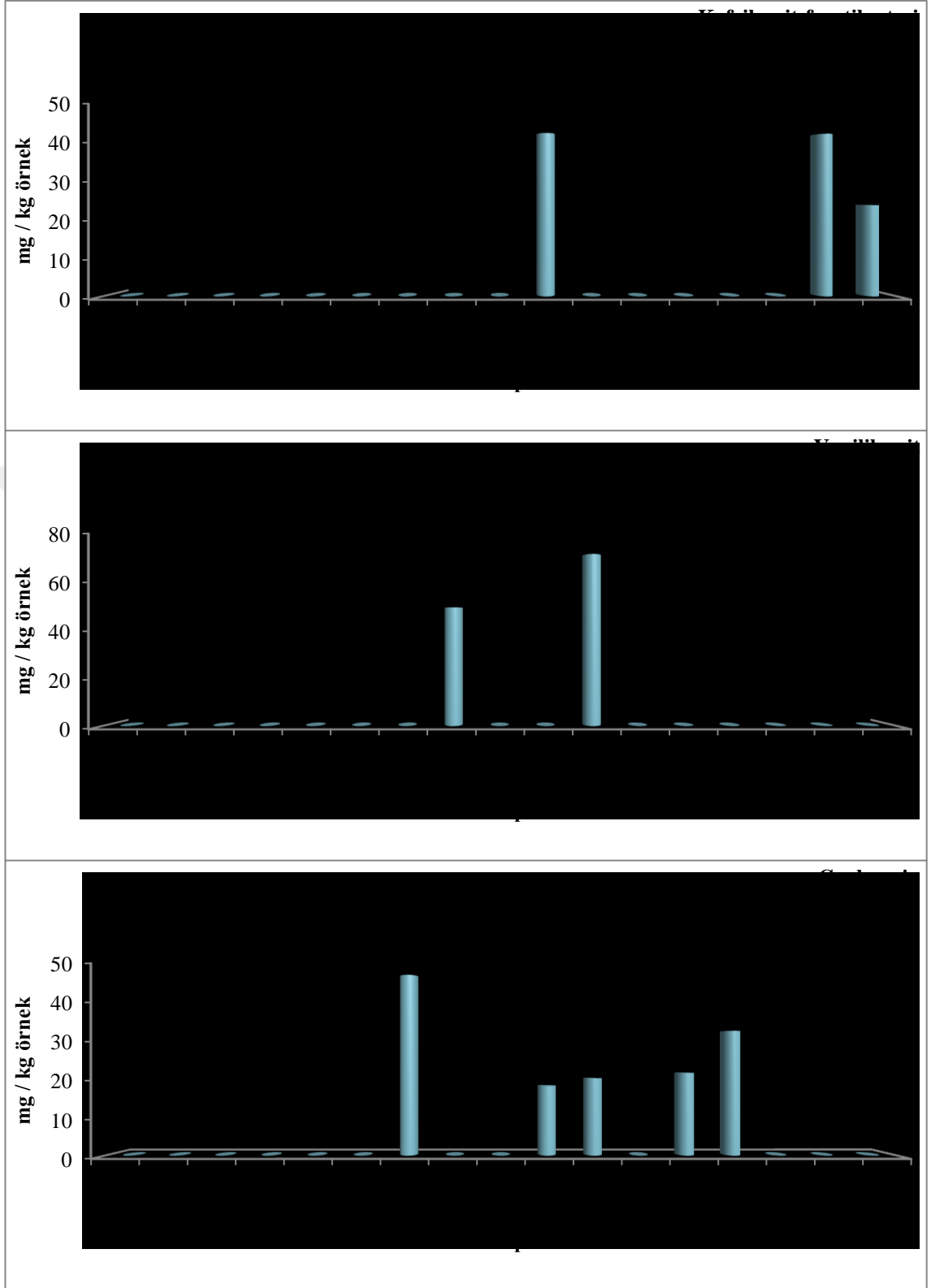
Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



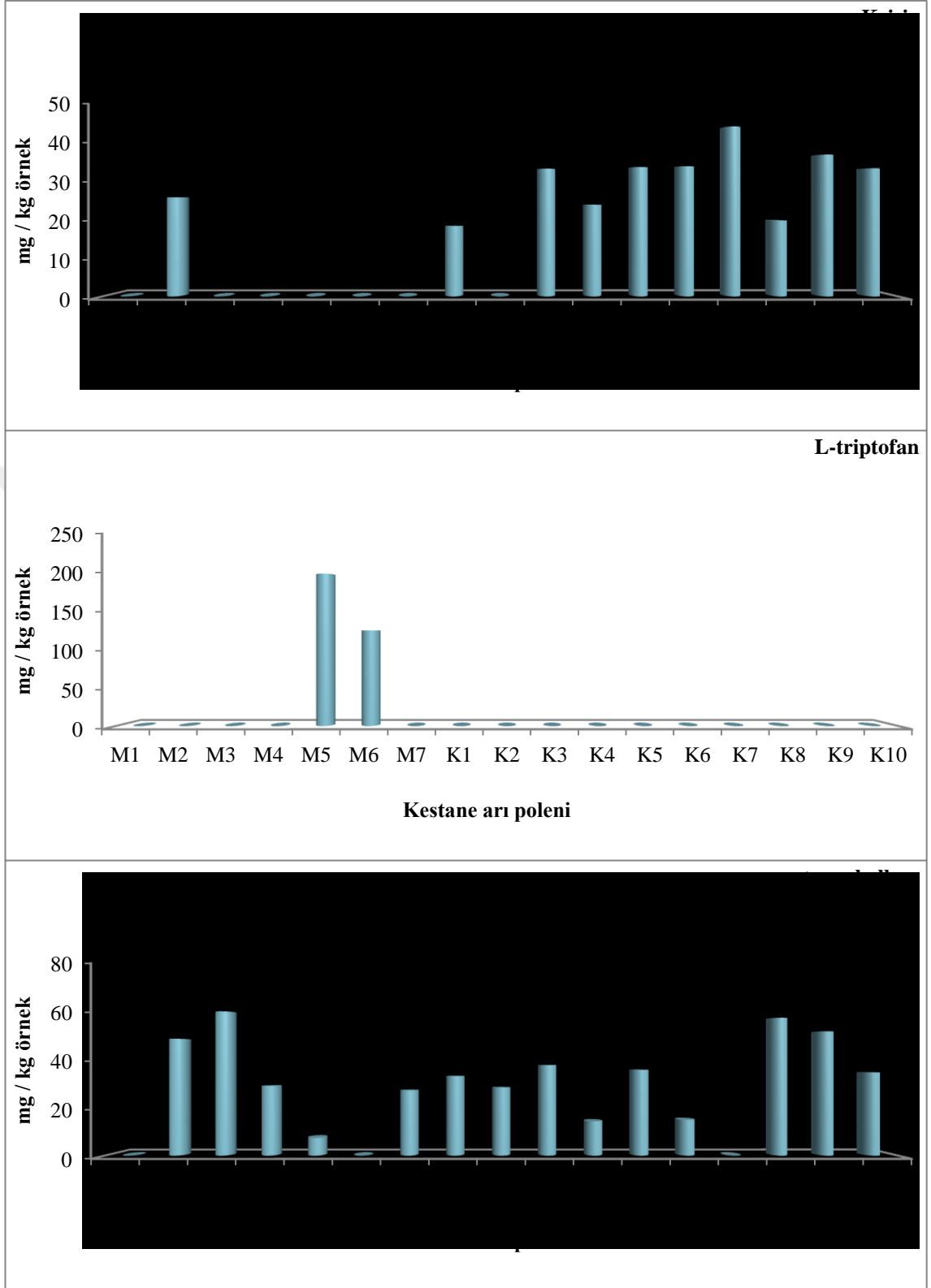
Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



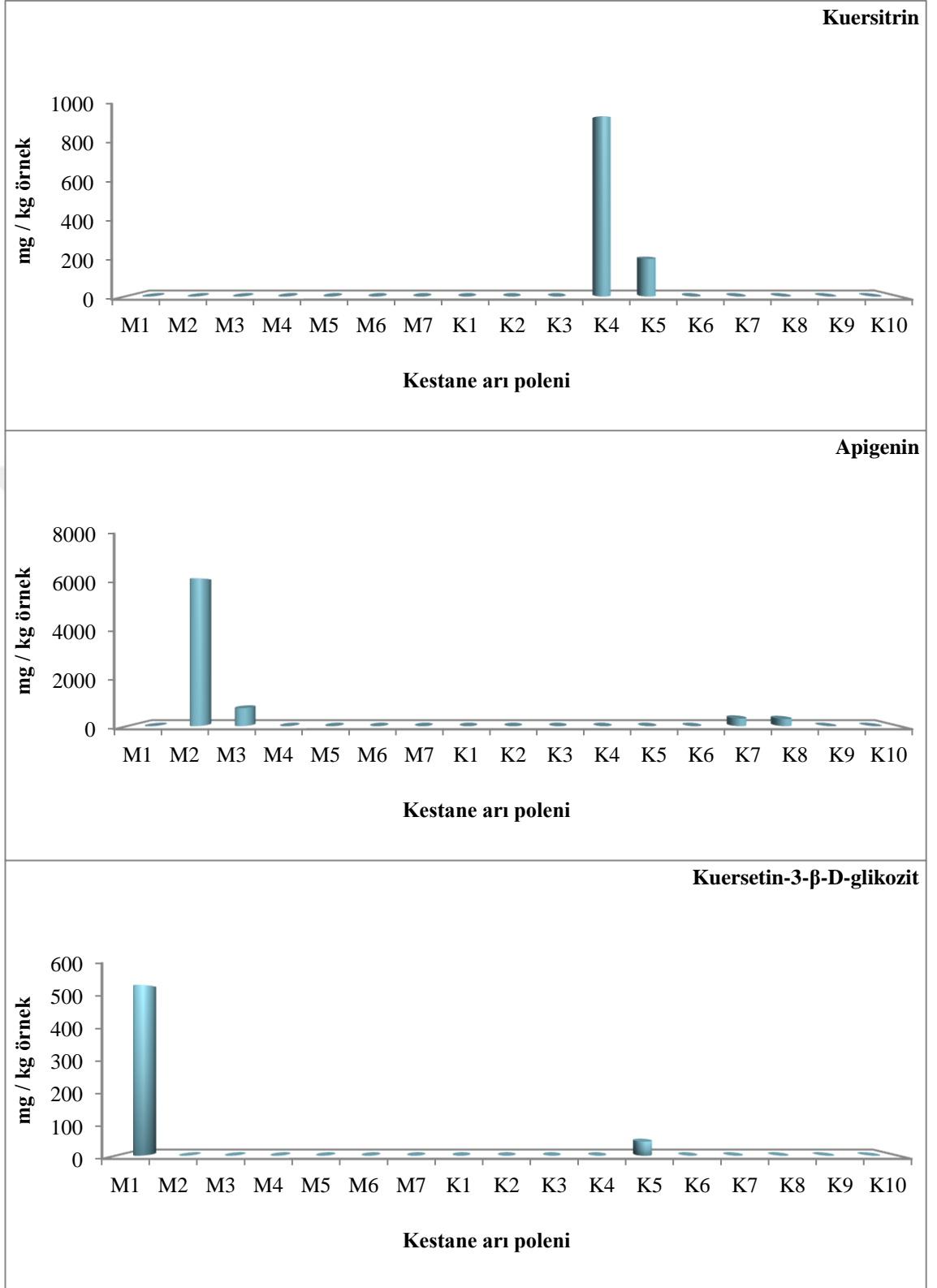
Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



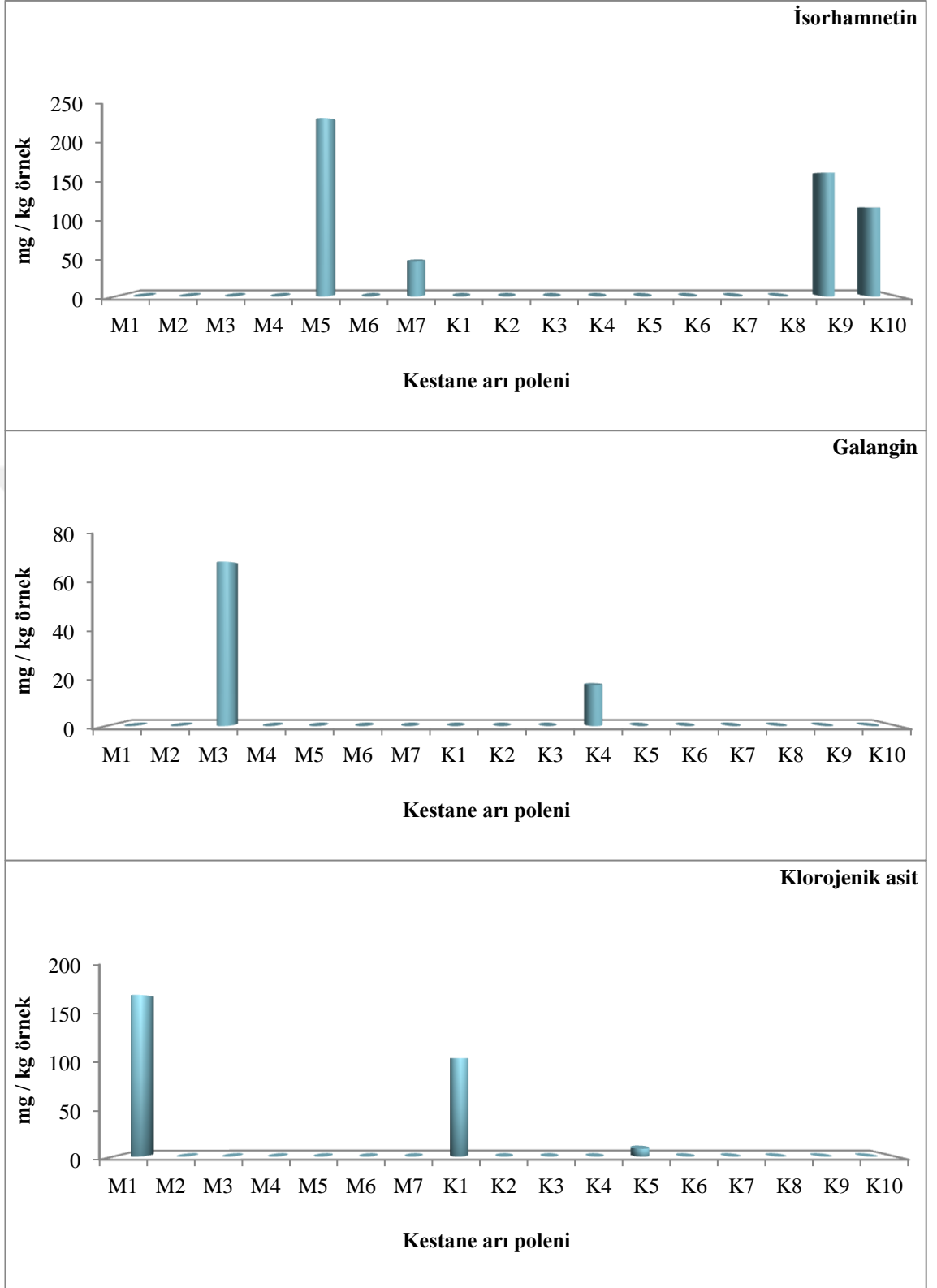
Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



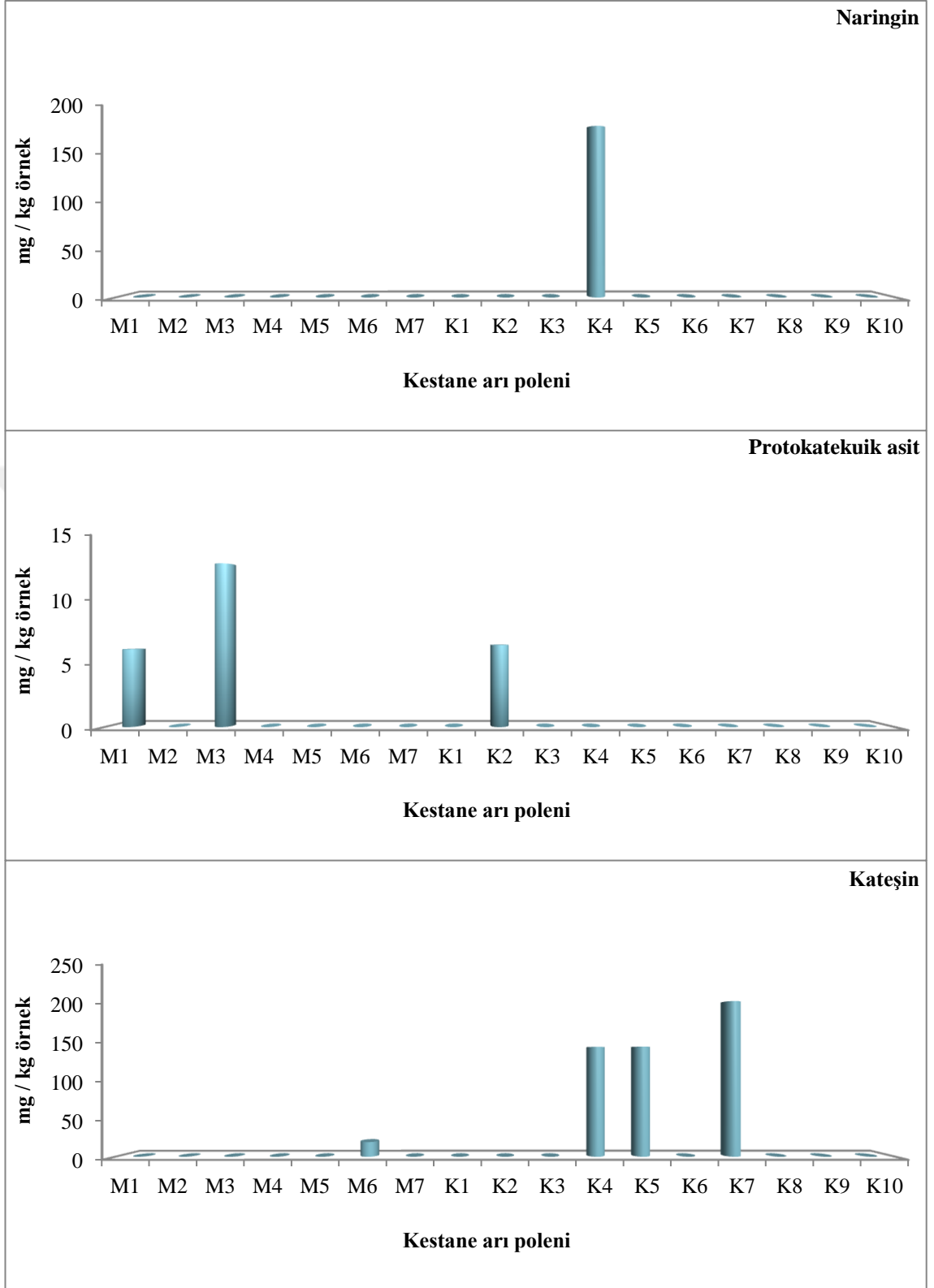
Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



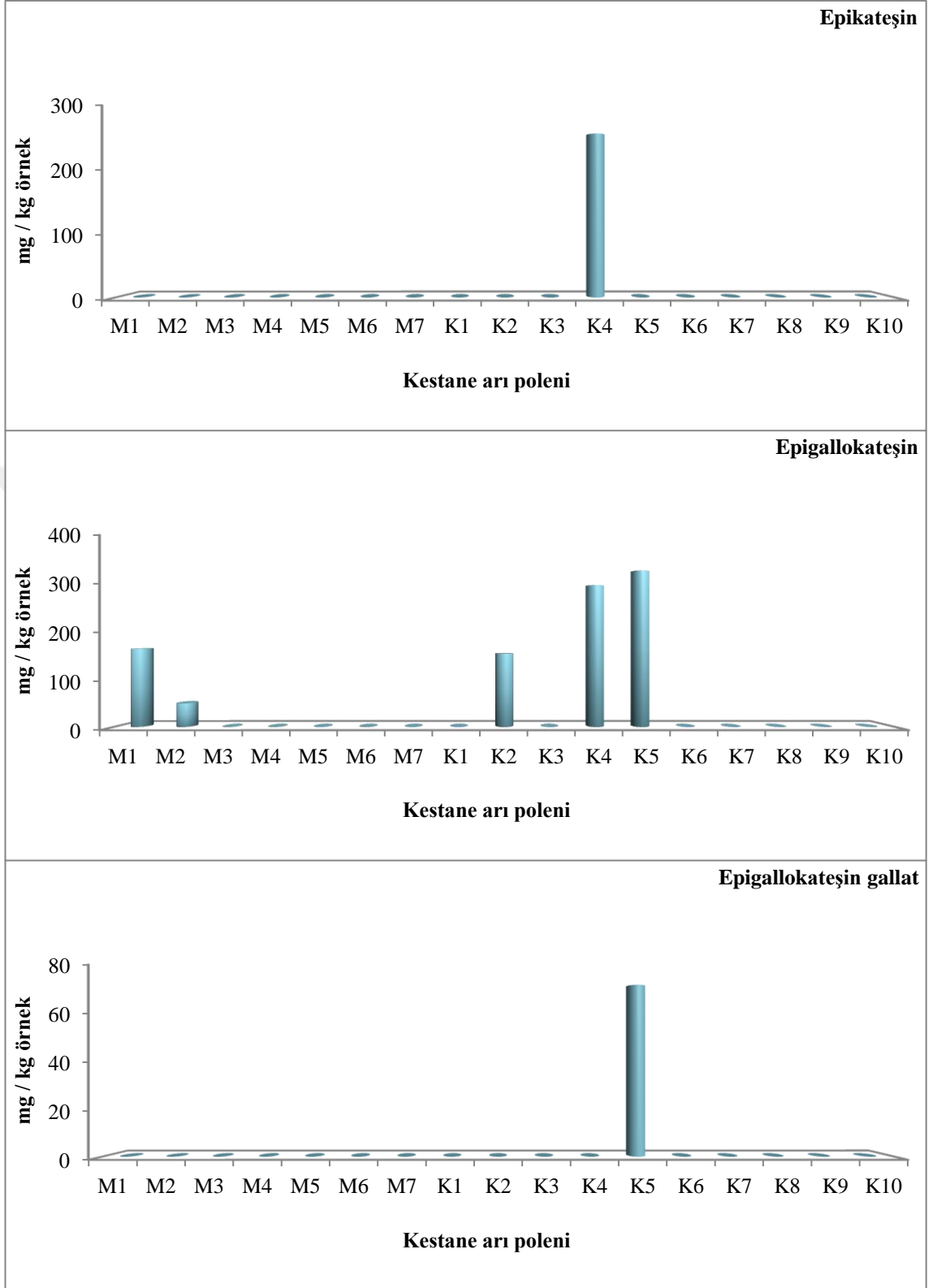
Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri



Şekil 5.1. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik profilleri

Karadeniz ve Marmara bölgelerinden toplanan örneklerde bulunan en önemli fenolik bileşiğin rosmarinik asit olduğu tespit edilmiştir. K4, K5 ve K6 numaralı örnekler dışında tüm örneklerde bulunan rosmarinik asidin en yüksek miktarı $13495,19 \pm 335,27$ mg/kg örnek olarak M5 numaralı örnekte, en düşük miktarı ise $5991,37 \pm 9,17$ mg/kg örnek olan K3 numaralı örnekte bulunmuştur. İkinci önemli fenolik bileşik olarak ise viteksin tespit edilmiştir. Tüm örneklerde tespit edilen viteksin $354,05 \pm 3,17$ (M2) ile $1719,96 \pm 34,83$ (K4) mg/kg örnek aralığında bulunmuştur. Kestane arı poleni örneklerinde üçüncü ve dördüncü olarak luteolin ve hiperosid fenolikleri tespit edilmiştir. Hemen hemen tüm örneklerde bulunan lutein ve hiperosid sırasıyla $287,66 - 906,53$ mg/kg ile $178,15 - 1115,02$ mg/kg aralığında bulunmuştur.

Kamferol, *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, kafeik asit- fenetil esteri, ellagik asit ve mirisetin yalnızca Karadeniz Bölgesi'ndeki örneklerde ve düşük miktarlarda bulunmuştur. Protokatekuik asit ise Karadeniz Bölgesi'ndeki K2 numaralı örnekte $6,51$ mg/kg örnek olarak bulunurken, Marmara Bölgesi'ndeki M1 numaralı örnekte $6,17$ mg/kg örnek iken M3 numaralı örnekte yaklaşık olarak iki katı miktarda ($12,99$ mg/kg örnek) bulunmuştur. Galangin Marmara Bölgesi'ndeki M3 numaralı örnekte ($69,42$ mg/kg örnek), Karadeniz Bölgesi'ndeki K4 numaralı örneğe ($17,32$ mg/kg örnek) göre daha yüksek bulunmuştur. Genkvanin K3, K4, K6 ve K7 numaralı örneklerde M7 numaralı örneğe ($47,72$ mg/kg örnek) göre daha düşük bulunmuştur. Kuersetin-3- β -D-glikozit K5 numaralı örnekte düşük miktarda ($44,42 \pm 2,02$ mg/kg örnek) bulunurken M1 numaralı örnekte yüksek miktarda ($540,86 \pm 52,67$ mg/kg örnek) tespit edilmiştir.

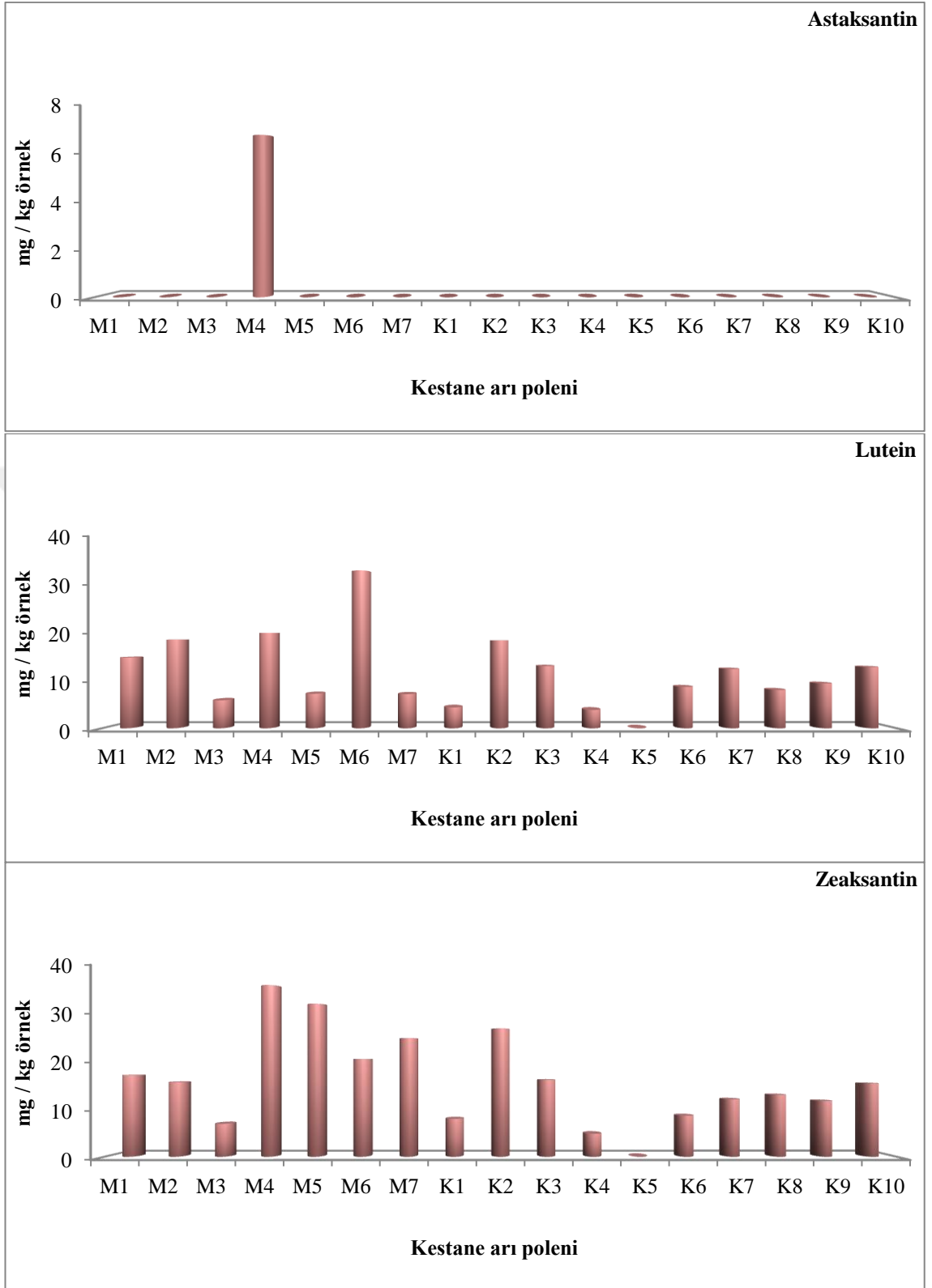
Kestane arı poleni örneklerinde bulunan krisin ve *trans*-kalkon miktarları sırasıyla $18,47- 44,88$ mg/kg örnek ile $7,51 - 60,96$ mg/kg örnek aralığında tespit edilmiştir. kateşin (K4, K5, K7 ve M6), epigallokateşin (K2, K4, K5, M1 ve M2), epikateşin (K4) ve epigallokateşin gallat (K5) gibi flavonoller çoğunlukla Karadeniz Bölgesi'nde bulunmasının yanında Marmara Bölgesi'ndeki örneklerde de düşük miktarlarda gözlenmiştir. Salisilik asit sadece K10 numaralı örnekte bulunmasına rağmen oldukça yüksek miktarda ($2095,03$ mg/kg örnek) tespit edilmiştir.

Birçok bitki flavonoid ve fenolik asitler gibi çok miktarda fenolik bileşik içerdiğinden ve her bitki kendine özgü bir profile sahip olduğundan, polenlerdeki fenolik bileşikler ve miktarları bitkilerin botanik kökenine bağlıdır. Bitkinin yetiştiği yer, iklim koşulları, büyüme veya olgunlaşma aşamasındaki farklılıklar fenolik bileşik içeriğinde değişikliklere neden olur. Güneş ve ark. (2017)'nin kestane balları ile yaptığı çalışma ile kestane polenlerindeki fenolik bileşikler karşılaştırıldığında rosmarinik asit, luteolin, amentoflavon, kateşin ve türevleri gibi birçok farklı fenolik bileşik tespit edilmiştir. Ayrıca kestane arı polenlerinde, kestane balları ile ortak olarak bulunan fenolik bileşikler ballara oranla çok daha yüksek miktarda bulunmuştur. Sonuç olarak, yüksek fenolik bileşik içeriği nedeniyle kestane arı poleninin kestane ballarından daha değerli doğal bir kaynak olduğu belirlenmiştir.

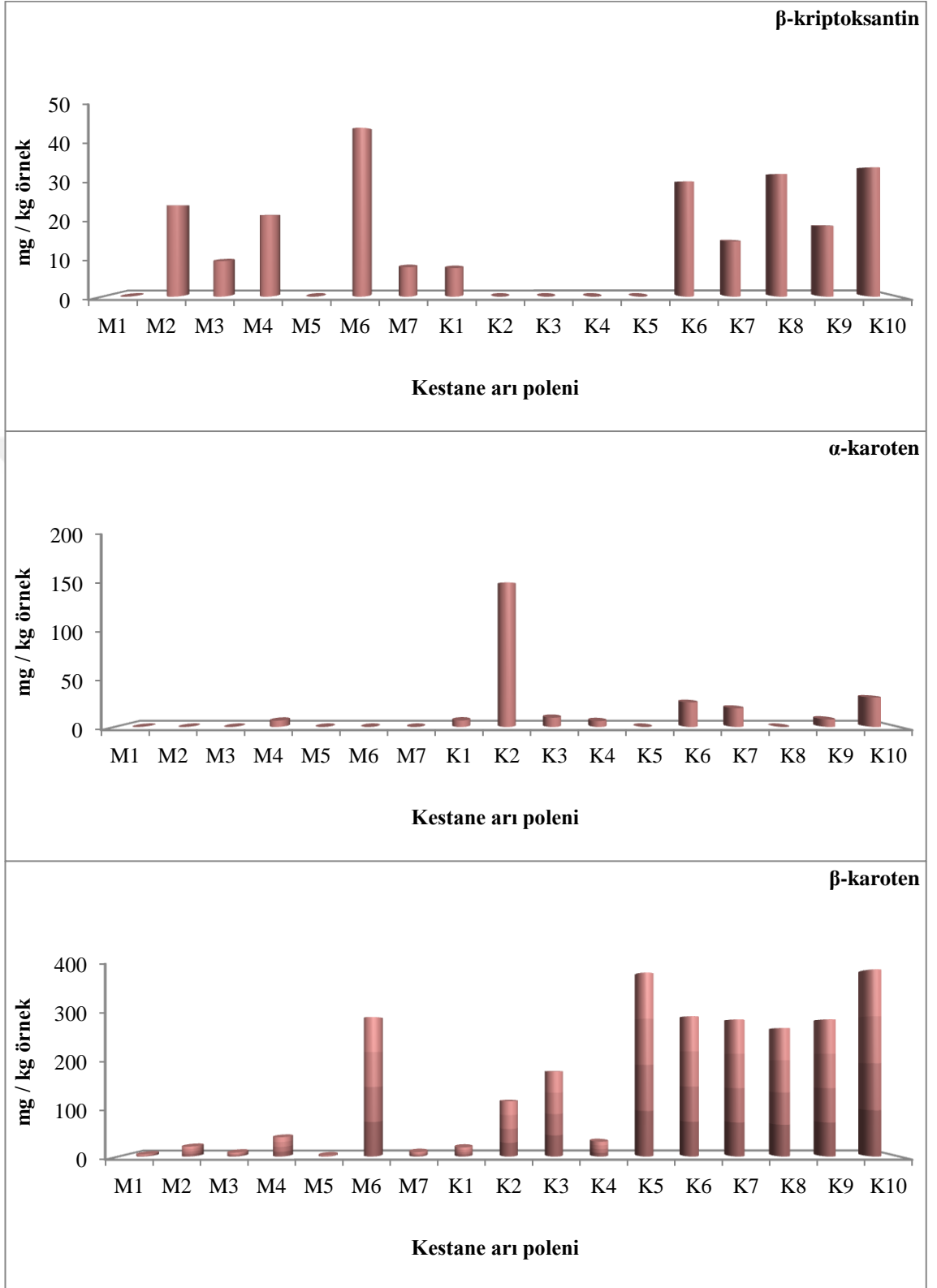
5.2.2. Kestane arı poleninde bulunan karotenoidlerin tayini

Kestane arı poleni örneklerinin fenolik bileşik içerikleri belirlendikten sonra fenolik bileşiklerin haricinde antioksidan özellik gösteren karotenoidlerin tayini gerçekleştirilmiştir. Karotenoidlerin analizinde C18 kolonu ile iyi bir ayırım yapılamamasından dolayı YMC Carotenoid C30 (250x4.6 mm, 5µm, YMC Co., Ltd) kolonu ile çalışılmıştır. Ters faz kromatografisi kullanılarak %95 metanol-%5 H₂O (H₂O: %0,05 trimetilamin içermektedir) ve tert-bütül metil eter gibi polar çözücülerden oluşan gradient programlı (Çizelge 3.12) hareketli faz sistemi kullanılmıştır. 1,0 mL/dk akış hızı ve 20 µL enjeksiyon hacmi ile kestane arı poleni örneklerinin kromatografik analizleri gerçekleştirilmiştir. Kestane arı poleni örneklerinin kromatogramları incelenerek kalibrasyon grafikleri yardımıyla karotenoidlerin miktarları mg/kg örnek olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'nden toplanan kestane arı poleni örneklerinde astaksantin, lutein, zeaksantin, β-kriptoksantin, α-karoten ve β-karoten karotenoidleri tespit edilmiştir. Şekil 5.2'de kestane arı poleni örneklerindeki karotenoidlerin bar grafikleri verilmiştir.



Şekil 5.2. Kestane arı poleni örneklerinin karotenoid profilleri



Şekil 5.2. (Devam) Kestane arı poleni örneklerinin karotenoid profilleri

Sadece M4 numaralı örnekte tespit edilen astaksantin 6,88 mg/kg örnek olarak bulunmuştur. Lutein ve zeaksantin K5 numaralı örnek dışında tüm örneklerde tespit edilmiş ve miktarları sırasıyla 5,91 – 20,20 mg/kg örnek ile 4,88 – 36,38 mg/kg örnek aralığında bulunmuştur. β -kriptoksantin en düşük miktarda (K1: 7,75 mg/kg örnek) Karadeniz Bölgesi'ndeki örnekte gözlenirken, en yüksek miktarda (M6: 44,67 mg/kg örnek) Marmara Bölgesi'ndeki örnekte tespit edilmiştir. K2 numaralı örnekte 152,42 mg/kg olarak en yüksek miktarda bulunan ve çoğunlukla Karadeniz Bölgesi'ndeki örneklerde gözlenen α -karoten, Marmara Bölgesi'ndeki M4 numaralı örnekte 6,63 mg/kg olarak tespit edilmiştir. β -kaoten ise tüm örneklerde gözlenmesine rağmen Karadeniz Bölgesi'ndeki örneklerde oldukça yüksek miktarlarda tespit edilmiştir.

Conte ve ark. (2017) İtalya'dan toplanan kestane arı polenin karotenoid içeriğini neoksantin, anteraksantin, lutein, zeaksantin, α -karoten ve β -karoten olarak tespit etmişlerdir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, Türkiye'deki kestane arı poleni örneklerinin İtalya'daki kestane arı poleni örneklerine oranla daha yüksek karotenoid içeriğine sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Karotenoidlerin sahip olduğu antioksidan özellikleri sayesinde, DNA'ya zarar veren ve kanser gibi tehlikeli hastalıkların oluşumunda etkili olan serbest radikallerin etkisini yok ettiği ve böylelikle kanser hücreleri oluşumuna neden olan zincir reaksiyonları önlediği bilinmektedir. Dembinska-Kiec (2005)'in yaptığı in-vivo ve in-vitro çalışmalarda β -karotenin serbest radikallerin DNA üzerinde oluşturduğu hasara karşı koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir. Yapılan birçok çalışmada, β -karoten gibi provitamin A aktivitesi gösteren karotenoidlerin yanında lutein, astaksantin gibi provitamin A aktivitesi göstermeyen karotenoidlerin de antioksidatif özellikleri nedeniyle kanser oluşumunu önlediği tespit edilmiştir (Seppanen ve Csallany 2002, Baker ve Günther 2004, Dembinska-Kiec 2005).

5.2.3. Ekstraksiyonda Kullanılan Çözücülerin ve Ekstraksiyon Yönteminin Etkisi

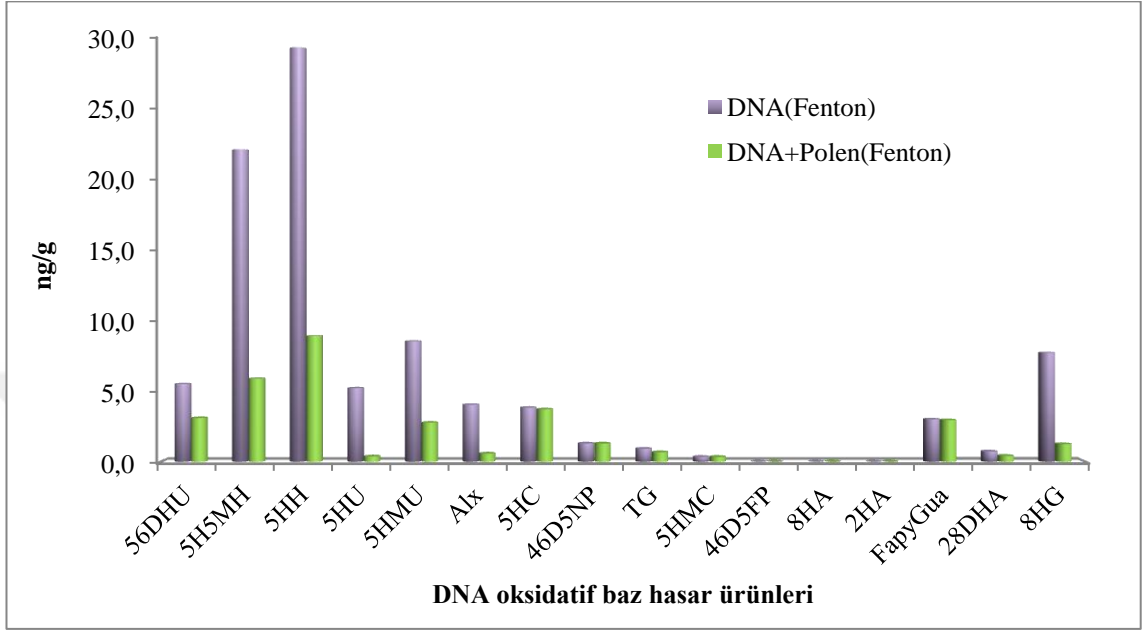
Bitkilerde bulunan ve antioksidan özellik gösteren fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan yöntemlerden en uygun olanı çözücü ekstraksiyonudur. Fenolik bileşiklerin polar özellik göstermelerinden dolayı ekstraksiyon yöntemlerinde yaygın

olarak kullanılan çözücüler su, etanol, metanol, aseton, etil asetat ve bu çözücülerin farklı oranlardaki asitli ve asitsiz karışımlarıdır. Asidik hidroliz yöntemi ile glikozit bağların parçalanması sonucu bağlı olan fenolik bileşiklerde serbest hale geçeceğinden daha fazla fenolik madde ekstrakte edilmiş olur. Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimi kullanılan çözücülerin çözünürlüğüne bağlı olduğu kadar tercih edilen ekstraksiyon yöntemlerine de bağlıdır. Kestane arı poleni örneklerindeki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için ultrasonik ekstraksiyon (Şekil 3.2) ile katı faz ekstraksiyonu (Şekil 3.3) yöntemleri su, etanol ve metanol çözücülerini kullanılarak karşılaştırılmıştır. Çizelge 4.2 ve 4.4’de verilen toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite sonuçlarına bakıldığında, katı faz ekstraksiyonuna göre ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen sonuçların daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca sonuçlar karşılaştırıldığında kestane arı poleni örnekleri için en uygun etanol çözücüsü ile daha fazla fenolik maddenin ekstrakte edildiği belirlenmiştir.

5.2.4. Kestane arı polenin DNA hasarını önleme kabiliyetinin incelenmesi

M0 numaralı kestane arı polenin DNA’da meydana gelen oksidatif hasarı %11 oranında önlediğini spektroskopik olarak tespit edilmişti. Bu çalışmada ise kestane arı polenin (M0 numaralı örnek) DNA’nın oksidatif hasara uğraması ile oluşan baz hasar ürünlerine etkisi incelenmiştir. Fenton reaksiyonu ile oksidatif strese uğratılan DNA ve kestane arı poleni ilave edilerek oksidatif strese uğratılan DNA örnekleri Şekil 3.4’te belirtildiği şekilde analize hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler DB-5MS (Agilent 128-5512) kapiler kolonu (12 m, 0,20 mm, 0,33 µm) ve seçilmiş reaksiyon görüntüleme (selected reaction monitoring, SRM) tekniği kullanılarak GC-MS/MS ile Çizelge 3.13 ve Çizelge 3.14’te belirtilen çalışma koşullarında analiz edilmiştir. Aynı şartlarda analiz edilerek belirlenen DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin kalibrasyon eğrileri (Çizelge 4.12) kullanılarak oksidatif stres sonrası oluşan miktarlar belirlenmiştir (Çizelge 4.13). Şekil 5.3’teki grafikte görüldüğü gibi oksidatif stres sonrası oluşan baz hasar ürünlerinin miktarları kestane arı poleni varlığında azalmaktadır. Kestane arı poleni örneğinin baz hasar ürünlerinin oluşmasını en fazla 5-hidroksi urasil (5HU) başta olmak üzere Allakson (Alx) ve 8-hidroksiguaninde (8HG) önlediği görülmektedir.

Sayısal veriler dikkate alındığında kestane arı poleni örneğinin DNA oksidatif baz hasar ürünlerinin oluşumunu toplamda miktarsal olarak %68,12 oranında önlediği belirlenmiştir.



Şekil 5.3. Kestane polenin DNA baz hasar ürünlerinin oluşumunu önleme etkisi

KAYNAKLAR

- Akçay, T. 2006.** Nükleik asitler: İnsan Biyokimyası, Editörler: Onat, R., Emerk, K., Sözmen, E.Y., Palme, Ankara, s. 395-488.
- Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A. 2010.** Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4): 401-409.
- Albertsen, J. 2006.** The toxicity of iron, an essential element. *Veterinary Medicine*, 82-90.
- Almeida-Muradian, I.L.P.M.L.M. 2010.** Stability of Antioxidants Vitamins in Bee Pollen Samples. *Química Nova*, 33 (3): 514-518.
- Amany, A.T., Ehab, M.A., Rasha, R.A., Yara, K.A. 2014.** Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. *Cytotechnology*, 66: 283-297.
- Atasoy, E., Altıngöz, Y. 2011.** Dünya ve Türkiye’de Kestanenin Önemi ve Üretimi. *Coğrafya Dergisi*, 22: 1-13.
- Avşar, C., Özler, H., Berber, İ., Civek, S. 2016.** Phenolic composition, antimicrobial and antioxidant activity of *Castanea sativa* Mill. pollen grains from Black Sea region of Turkey. *International Food Research Journal*, 23 (4): 1711-1716.
- Aybastır, Ö. 2016.** DNA’nın oksidatif hasarı üzerine fenolik maddelerin etkisi. *Doktora Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Bursa.
- Baker, R., Günther, C. 2004.** The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 484-488.
- Basim, E., Basim, H., Özcan, M. 2006.** Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. *Journal of Food Engineering*, 77: 992-996.
- Benzine, I.F.F., Strain, J.J. 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem*, 239: 70-76.
- Bevzo, V., Grygor’eva, N.P. 1997.** Effect of bee pollen extract on glutathione system activity in mice liver under X-ray irradiation. *Ukr. Biokhim. Zh.*, 69: 115-117.
- Bogdanov, S. 2004.** Quality and Standards of Pollen and Beeswax. *Apiacta*, 38: 334-341.
- Carpes, S.T., Begnini, R., Alencar, S.M., Masson, M.L. 2007.** Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciênc. agrotec*, 31 (6): 1818-1825.
- Carpes, S.T., Alencar, S.M., Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Mourão, G.B., Haminiuk, C.W.I., Luz, C.F.P., Masson, M.L. 2013.** Polyphenols and palynological origin of bee pollen of *Apis mellifera* L. from Brazil. Characterization of polyphenols of bee pollen. *CyTA - Journal of Food*, 11 (2): 150-161.
- Chen, Y., Xiong, H., Zhang, X., Wang, S. 2012.** Electrochemical detection of in situ DNA damage induced by enzyme-catalyzed Fenton reaction. Part I: in phosphate buffer solution. *Microchimica Acta*, 178: 37-43.
- Cheng, N., Ren, N., Gao, H., Lei, X., Zheng, J., Cao, W. 2013.** Antioxidant and hepatoprotective effects of *Schisandra chinensis* pollen extract on CCl₄-induced acute liver damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 55: 234-240.

- Cook, N.C., Samman, S. 1996.** Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*, 7: 66-76.
- Dawbaa, S., Aybastier, Ö., Demir, C. 2017.** Ultrasensitive determination of DNA oxidation products by gas chromatography–tandem mass spectrometry and the role of antioxidants in the prevention of oxidative damage. *Journal of Chromatography B*, 1051: 84–91.
- Dembinska-Kiec, A. 2005.** Carotenoids: risk or benefit for health. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740: 93-94.
- Dizdaroglu, M. 2012.** Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Letters*, 327: 26–47.
- Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S. 2009.** Effect of carbaryl on some biochemical changes in rats: The ameliorative effect of bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 86–91.
- Eraslan, G., Kanbur, M., Silici, S., Karabacak, M. 2010.** Beneficial Effect of Pine Honey on Trichlorfon Induced Some Biochemical Alterations in Mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5): 1084–1091.
- Erdoğan, Y., Dodoloğlu, A. 2005.** Bal arısı (*Apis mellifera* L.) kolonilerinin yaşamında polenin önemi. *Uludag Arıcılık Dergisi*, 5: 79-84.
- Fanali, C., Dugo, L., Rocco, A. 2013.** Nano-Liquid Chromatography in Nutraceutical Analysis: Determination of Polyphenols in Bee Pollen. *Journal of Chromatography A*, 1313: 270-274.
- Feás, X., Vázquez-Tato, M.P., Estevinho, L., Seijas, J.A., Iglesias, A. 2012.** Organic Bee Pollen: Botanical Origin, Nutritional Value, Bioactive Compounds, Antioxidant Activity and Microbiological Quality. *Molecules*, 17: 8359-8377.
- Furusawa, E., Chou, S.C., Hirazumi, A., Melera, A. 1995.** Antitumour potential of pollen extract on lewis lung carcinoma implanted intraperitoneally in syngeneic mice. *Phytother. Res.*, 9: 255–259.
- Güneş, M.E., Saliha Şahin, S., Demir, S., Borum, E., Tosunoğlu, A. 2017.** Determination of Phenolic Compounds Profile in Chestnut and Floral Honeys and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Journal of Food Biochemistry*, 41:e12345.
- Hari, Y., Obika, S., İmanishi, T. 2012.** Towards the sequence-selective recognition of double-stranded DNA containing pyrimidine-purine interruptions by triplex-forming oligonucleotides. *Eur. J. Org. Chem.*, 2875-2887.
- Hegazi, A.G. 2012.** Medical Importance of Bee Products. *Uludag Bee Journal*, 12: 136–146
- Isla, M.I., Moreno, M.I.N., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. 2001.** Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 76: 165–170.
- Kao, Y., Lu, M., Chen, C. 2011.** Preliminary Analyses of Phenolic Compounds and Antioxidant Activities in Tea Pollen Extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*, 19(4): 470-477.
- Karabulut, H., Gülay, M.Ş. 2016.** Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1): 50-59.
- Karadeniz, V. 2013.** Türkiye’de kestane tarımı ve başlıca sorunları. *The Journal of International Social Research*, 6 (27): 289-291.
- Karahocagil, P., Tosun, İ. 2004.** Kestane. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü*, 7: 1-4.

- Karkar, B., Şahin, S., Güneş, M.E. 2018.** Antioxidative Effect of Turkish Chestnut Bee Pollen on Dna Oxidation System and Its Phenolic Compounds. *The Journal of Food*, 43 (1): 34-42.
- Kolaç, T., Gürbüz, P., Yetiş, G. 2017.** Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, 5 (1): 1-17.
- Kolaylı, S., Can, Z., Yildiz, O., Sahin H., Alpay Karaoglu, S. 2016.** A Comparative Study of the Antihyaluronidase, Antiurease, Antioxidant, Antimicrobial and Physicochemical Properties of Different Unifloral Degrees of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Honeys. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (3): 96–104.
- Louveaux, J., Maurizio, A., Vorwohl, G. 1978.** Methods of melissopalynology. *Bee World*, 59: 139–157.
- Leja, M., Mareczek, A., Wyzgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekonska, K. 2007.** Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*, 100: 237–240.
- Maruyama, H., Sakamoto, T., Araki, Y., Hara, H. 2010.** RAesneatrcih-ianrticfleammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus* sp. of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *Complementary and Alternative Medicine*, 10 (30): 1-11.
- Medeirosa, K.C.P., Figueiredo, C.A.V., Figueredo T.B., Freire, K.R.L., Santosd, F.A.R., Alcantara-Neves, N.M., Silvaa, T.M.S., Piuvezama, M.R. 2008.** Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 119: 41–46.
- Mohdaly, A.A.A., Mahmoud, A.A., Roby, M.H.H., Smetanska, I., Ramadan, M.F. 2015.** Phenolic Extract from Propolis and Bee Pollen: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 538–547.
- Morais, M., Moreira, L., Feás, X., Estevinho, L.M. 2011.** Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1096–1101.
- Naranjo, R., Sánchez, J., Paramás, A., Gonzalo, J. 2004.** Liquid Chromatographic–Mass Spectrometric Analysis of Anthocyanin Composition of Dark Blue Bee Pollen from *Echium Plantagineum*. *Journal of Chromatography*, 1054: 205–210.
- Nelson, N. 1944.** A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem*, 153: 375-380.
- Oh, S.M., Chung, K.H. 2016.** Antiestrogenic activities of Ginkgo biloba extracts. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 100: 167–176.
- Özcan, M. 2004.** Inhibition of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by pollen and propolis extracts. *J. Med. Food*, 7: 114–116.
- Persano Oddo, L., Piro, R. 2004.** Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. *Apidologie*, 35: 38–81.
- Pinto, B., Caciagli, F., Riccio, E., Reali, D., Saric, A., Balog, T., Likic, S., Scarpato, R. 2010.** Antiestrogenic and antigenotoxic activity of bee pollen from *Cystus incanus* and *Salix alba* as evaluated by the yeast estrogen screen and the micronucleus assay in human lymphocytes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45: 4122-4128
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 1231-1237.

- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., Estevinho, L.M. 2014.** Biological Activities of Commercial Bee Pollens: Antimicrobial, Antimutagenic, Antioxidant and Anti-inflammatory". *Food and Chemical Toxicology*, 63: 233-239.
- Román, D.A., Zurek, G., Bäßmann, C., Almaraz-Abarca, N., Quirantes, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. 2007.** Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis–electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 389: 1909–1917.
- Sani, I.M., Iqbal, S., Chan, K.W., Ismail, M. 2012.** Effect of Acid and Base Catalyzed Hydrolysis on the Yield of Phenolics and Antioxidant Activity of Extracts from Germinated Brown Rice (GBR). *Molecules*, 17: 7584-7594.
- Sarıkaya, A.O., Ulusoy, E., Öztürk, N., Tunçel, M., Kolaylı, S. 2009.** Antioxidant Activity and Phenolic Acid Constituents of Chestnut (*Castania sativa* Mill.) Honey and Propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 33: 470–481.
- Sastre, J., Pallardo, F.V., Vina, J. 2000.** Mitochondrial Oxidative Stress Plays a Key Role in Aging and Apoptosis. *IUBMB Life*, 49: 427-435.
- Seppanen, C.M., Csallany, A.S. 2002.** The effect of paprika carotenoids on in vivo lipid peroxidation measured by urinary excretion of secondary oxidation products. *Nutrition Research*, 22: 1055-1065.
- Shahidi, F., Yeo, J. 2016.** Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, 21: 1216-1238.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999.** Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Somogyi, M. 1952.** Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem*, 195: 19-23.
- Sousa, C., Moita, E., Valentão, P., Fernandes, F., Monteiro, P., Andrade, P. 2015.** Effects of Colored and Noncolored Phenolics of Echinium Plantagineum L. Bee Pollen in Caco-2 Cells under Oxidative Stress Induced by tert-butyl Hydroperoxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 2083–2091.
- Su, D., Zhang, R., Hou, F., Zhang, M., Guo, J., Huang, F., Deng, Y., Wei, Z. 2014.** Comparison of the free and bound phenolic profiles and cellular antioxidant activities of litchi pulp extracts from different solvents. *Complementary and Alternative Medicine*, 14 (9): 6282-6292.
- Şahin, S., Işık, E., Aybastier, Ö., Demir, C. 2012.** Orthogonal signal correction-based prediction of total antioxidant activity using partial least squares regression from chromatograms. *Journal of Chemometrics*, 26: 390–399.
- Şahin, S., Demir, C. 2013.** Antioksidan kapasite tayin yöntemi. Türkiye, Retrieved from <http://online.turkpatent.gov.tr/EPATENT/servlet/PreSearchRequestManager> (Erişim tarihi: 20.05.2018).
- Şahin, S., Oran, S., Şahintürk, P., Demir, C., Öztürk, Ş. 2015.** Ramalina Lichens and Their Major Metabolites As Possible Natural Antioxidant And Antimicrobial Agents. *Journal of Food Biochemistry*, 39: 471-477.
- Ulusoy, E., Kolaylı, S. 2014.** Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Anzer Bee pollen. *Journal of Food Biochemistry*, 38: 73-82.
- Yıldız, O., Can, Z., Saral, Ö., Yuluğ, E., Öztürk F., Aliyazıcıoğlu, R., Canpolat, S., Kolaylı, S. 2013.** Hepatoprotective Potential of Chestnut Bee Pollen on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damages in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 461478, 9 sayfa.

Yildiz, O., Karahalil, F., Can, Z., Sahin, H., Kolayli, S. 2014. Total Monoamine Oxidase (MAO) Inhibition by Chestnut Honey, Pollen and Propolis. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(5): 690-694.

Yüksel, Ç. 2018. Farklı oksidatif stres ortamlarında mikroalglerde bulunan karotenoidlerin analizi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Bursa.

Zhou, J., Qi, Y., Ritho, J., Zhang, Y., Zheng, X., Wu, L., Li, Y., Sun, L. 2015. Flavonoid Glycosides as Floral Origin Markers to Discriminate of Unifloral Bee Pollen by LC-MS/MS. *Food Control*, 57: 54-61.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	:Büşra KARKAR
Doğum Yeri ve Tarihi	:OSMANGAZİ – 27/09/1992
Yabancı Dili	:İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	
Lise	:Hasan Coşkun Lisesi, 2010
Lisans	:Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, :Kimya Bölümü, 2015
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl	:-
İletişim (e-posta)	:busraakarkar@gmail.com
Yayımları	Karkar, B., Şahin, S., Güneş, M.E. 2018. Antioxidative Effect of Turkish Chestnut Bee Pollen on Dna Oxidation System and Its Phenolic Compounds. <i>The Journal of Food</i> , 43 (1): 34-42.