



**GIDA KATKISI OLARAK KULLANILAN
BİBERİYE, KEKİK VE DEFNENİN ETKEN
MADDELERİNİN KARŞILAŞTIRILMALARI
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hasret Kübra UÇAN
Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

Şubat 2021

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GIDA KATKISI OLARAK KULLANILAN BİBERİYE, KEKİK VE
DEFNENİN ETKEN MADDELERİNİN KARŞILAŞTIRILMALARI
ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

Hasret Kübra UÇAN

Danışman

Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Şubat 2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GIDA KATKISI OLARAK KULLANILAN BİBERİYE, KEKİK VE DEFNENİN ETKEN MADDELERİNİN KARŞILAŞTIRILMALARI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Hasret Kübra UÇAN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK

Bu çalışmada, süperkritik karbondioksit (SC-CO₂) ve distilasyon yöntemleriyle ekstrakte edilen kekik (*Thymus vulgaris L.*), biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) ve defne (*Laurus nobilis L.*) uçucu yağların kimyasal bileşimi belirlenmiştir. SC-CO₂ ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen kekik, biberiye ve defne uçucu yağlarında sırasıyla %14.565, %4.134 ve %2.755 linalool tespit edilirken, aynı bitki yağlarında sırasıyla %37.057, %2.942 ve % 2.742 karvakrol teşhis edilmiştir. Distilasyon yöntemiyle elde edilen kekik uçucu yağı %3.589 linalool, %72.160 karvakrol, %1.626 borneol ve % 1.920 timol içerirken, biberiye uçucu yağı %3.331 linalool, %10.449 1,8-sineol, %11.224 kamfor, % 6.669 borneol ve %0.207 timol içermiştir. Her iki yöntemle elde edilen kekik uçucu yağın dominant bileşeni karvakrol iken, biberiye ve defne uçucu yağının ise 1,8-sineol olmuştur.

2021, ix + 41 sayfa

Anahtar Kelimeler: kekik, biberiye, defne, ekstraksiyon, süperkritik karbondioksit, distilasyon

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

RESEARCH ON THE COMPARISON OF ACTIVE INGREDIENTS OF ROSEMARY, THYME AND LAUREL

Hasret Kübra UÇAN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Ramazan ŞEVİK

In this study, the chemical composition of *thyme* (*Thymus vulgaris* L.), *rosemary* (*Rosmarinus officinalis* L.) and *laurel* (*Laurus nobilis* L.) essential oils extracted by supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) and distillation methods were determined. While 14.565%, 4.134% and 2.755% linalool were detected in *thyme*, *rosemary* and *laurel* essential oils obtained by SC-CO₂ extraction method, respectively, 37.057%, 2.942% and 2.742% carvacrol were detected in the same plant oils, respectively. While *thyme* essential oil obtained by the distillation method contains 3.589% linalool, 72.160% carvacrol, 1.626% borneol and 1.920% thymol, *rosemary* essential oil contained 3.331% linalool, 10.449% 1,8-cineol, 11.224% camphor, 6.669% borneol and 0.207% thymol. While the dominant component of *thyme* essential oil obtained by both methods was carvacrol, the major constituent of *rosemary* and *laurel* essential oils was 1,8-cineol.

2021, ix+ 41 pages

Keywords: thyme, rosemary, laurel, extraction, supercritical carbon dioxide, distillation

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ramazan ŞEVİK' e, Sayın Prof. Dr. Mehmet Musa ÖZCAN' a, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan AKARCA' ya her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma, Ufuk KISAK, Mesut YUMUK' a ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

Hasret Kübra UÇAN
AFYONKARAHİSAR, 2021

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1 Kekik.....	5
2.2 Biberiye.....	8
2.3 Defne.....	11
2.4 Süperkritik Akışkan	15
2.4.1 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	16
2.4.2 Süperkritik Akışkan Seçimi.....	17
2.4.3 Süperkritik CO ₂ Özellikleri	17
2.4.4 Süperkritik CO ₂ Ekstraksiyonu	18
2.4.5 Süperkritik Akışkan CO ₂ Ekstraksiyonun Üstünlükleri.....	19
2.4.6 Süperkritik Akışkan CO ₂ Ekstraksiyonun Dezavantajları	19
2.4.7 Gıda Endüstrisinde Süperkritik Akışkanın Önemi.....	20
2.4.8 Gıda Endüstrisinde Kullanıldığı Alanlar.....	20
2.5 Distilasyon Yöntemleri	23
2.5.1 Su Distilasyonu (Hidrodistilasyon).....	23
2.5.2 Su-Buhar Distilasyonu	23
2.5.3 Buhar Distilasyonu.....	24
3. MATERYAL ve METOT	25
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	35
6. KAYNAKLAR.....	36

ÖZGEÇMİŞ.....	41
---------------	----



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μL	Mikrolitre
Ppm	Milyonda bir
Atm	Atmosfer basıncı
MPa	Megapascal
K	Kelvin sıcaklık birimi
Kg.m^{-3}	Yoğunluk
Kg(m.s)^{-1}	Viskozite
m^2s^{-1}	Yayınırılık

Kısaltmalar

B.cereus	Bacillus cereus
DMBA	7,12-dimetil benz(a) antrosenin
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DOX	Deksorubisin
E.coli	Escherichia coli
EPA	Çevre Koruma Ajansı
FDA	Gıda ve İlaç Yönetimi
L.monocytogenes	Listeria monocytogenes
Pc	Kritik basınç
S.aureus	Staphylococcus aureus
SC-CO ₂	Süperkritik CO ₂
SCWO	Süperkritik su oksidasyonu
Tc	Kritik sıcaklık
VIN	Vinblastin
V.paraemolyticus	Vibrio parahaemolyticus

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 İzopiren molekülünün kimyasal konfigürasyonu	3
Şekil 1.2 Analizi yapılan uçucu yağ etken maddelerinin monoterpen yapıları.....	4
Şekil 2.1 Maddenin Süperkritik akışkan faz grafiği.....	16
Şekil 2.2 Süperkritik ekstraksiyon sisteminin şematik olarak gösterimi.....	18
Şekil 4.1 Kekik bitkisinin elde ediliş yöntemine göre farklılıkları	31
Şekil 4.2 Biberiye bitkisinin elde ediliş yöntemine göre farklılıkları	32
Şekil 4.3 Defne bitkisi içeriklerinin elde ediliş yöntemine göre farklılıkları.....	33



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1 SC-CO ₂ ve Distilasyon Yöntemi İle Elde Edilen Uçucu Yağların Bileşenlerinin Değerleri (%).....	27
Çizelge 4.2 SC-CO ₂ Yöntemi İle Elde Edilen Kekik Uçucu Yağının Analiz Sonuçları (%)	28
Çizelge 4.3 SC-CO ₂ Yöntemi İle Elde Edilen Biberiye Uçucu Yağının Analiz Sonuçları (%)	29
Çizelge 4.4 SC-CO ₂ Yöntemi İle Elde Edilen Defne Uçucu Yağının Analiz Sonuçları (%)	30
Çizelge 4.5 Kekik bitkisi içeriklerinin elde ediliş yöntemine göre farklılıkları	30
Çizelge 4.6 Biberiye bitkisi içeriklerinin elde ediliş yöntemine göre farklılıkları	31
Çizelge 4.7 Defne bitkisi içeriklerinin elde ediliş yöntemine göre farklılıkları	32

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 2.1 Analize kullanılan kekik bitkisi.....	5
Resim 2.2 Analizde kullanılan biberiye yaprağı.....	8
Resim 2.3 Analizde kullanılan defne yaprağı.....	12
Resim 3.1 Uçucu yağları çıkartılan baharatlar.....	25



1. GİRİŞ

Son yıllarda tüm Dünya’da yaşanan en yaygın sağlık sorunlarından biri haline gelen gıda kaynaklı hastalıklar hem insan sağlığı hem de gıda endüstrisi açısından büyük bir sorun teşkil etmektedir. Bu tür hastalıklardan özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan ve risk grubu olarak tanımlanan hastalar, yaşlılar, çocuklar ve hamileler etkilenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü her yıl yaklaşık 600 milyon kişinin gıda kaynaklı hastalığa maruz kaldığını, 420 000 kişinin hayatını kaybettiğini ve bunun yaklaşık % 40’ını beş yaşın altındaki çocukların oluşturduğunu bildirmiştir. Bu nedenle, sağlık kaybı ile birlikte büyük ekonomik kayıplara da mal olan bu hastalıkların engellenmesine yönelik olarak yapılan çalışmalar büyük önem taşımaktadır (Şengün vd. 2018). Eski çağlardan beri gıdayı muhafaza etmek ortak sorunlar arasına girmektedir. İnsanlar yüzyıllarca teknolojiye sahip olmadan bir şekilde gıdaları doğal yollarla koruyabilmeyi başarmışlardır. Günümüzde ise gıdayı korumak için genelde kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar hastalıkların artmasının sebepleri arasında gıdalarda kullanılan kimyasalların da neden olduğunu göstermektedir. Bu sebepten dolayı doğal koruyucu maddeler bulmak önemli hale gelmiştir. Bunlardan biri de baharat kullanımıdır. Bazı araştırmalar, kimyasal ve sentetik koruyucuların antimikrobiyal etkileri ve ayrıca kimyasal ve sentetik koruyucuların sağlık üzerindeki yan etkilerinin artan riski nedeniyle, kimyasallar ve sentetikler yerine baharat kullanımının vazgeçilmez hale geldiğini göstermiştir (Erkmen ve Özcan 2008).

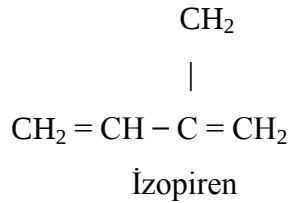
Baharatların antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin ne kadar olduğuna, hangi baharatın hangi gıdada kullanımının daha uygun olacağına, hangi miktarda kullanılırsa daha iyi sonuç vereceğine, hangi uçucu yağ hangi mikroorganizmaya etki edeceğine, baharatların uçucu yağının hangi yöntemle çıkarılırsa daha saf bir şekilde bileşik elde edilebileceğine kadar birçok faktörle ilgilenmişlerdir. Baharat uçucu yağları gıdaların kalitesini etkilemeyecek düzeylerde katıldıklarında her mikroorganizmada işe yaramayabilir. Bu yüzden yardımcı koruyucu olarak gıdalara ilave edilmelidir. Uçucu yağlar, aromatik bitkilerden veya bitkisel droglardan elde edilen, kuvvetli kokulu ve buharla sürüklenebilen, yağimsı bileşenlerinin kompleks bir karışımıdır. Bulundukları ortamdan su, buhar, kuru distilasyon veya sıkma yoluyla serbest hale gelebilirler. Uçucu

yağlar, bitkilerin başta çiçek ve yapraklarında olmak üzere kök, meyve, tohum, yaprak, rizom gibi diğer dokularında da görülmektedir. Bağlı oldukları familyaya bağlı olarak belli oranlarda salgı tüyleri, salgı kanalları ve salgı ceplerinde bulunurlar. Bitki hormonlarının yapısını oluşturmakla birlikte hücreler arası bilgilerin taşınması gibi bitkide temel rollere sahiptirler. Uçucu yağlar oda sıcaklığında sıvı halde bulunan, kolayca kristalleşebilen terpenoid veya terpenoid olmayan bileşenlere sahiptirler (Erdoğan 2014). Uçucu yağların bitkilerde neden var olduğu ile ilgili birçok fikir öne sürülmüştür. Bazı araştırmacılara göre artık ürün olarak kabul edilen uçucu yağlar, koruyucu ajanlardır ve bitkilerin yaralanması sırasında meydana gelen reçinelerin çözünmesinde görev alırlar. Uçucu yağların böcekleri kaçıрма ya da çekmek için üretildiği de düşünülmektedir. Uçucu yağları taşıyan bitkilerin hayvanlar tarafından yenilmediği ve çevresindeki yabancı otların da çimlenmediği düşünüldüğünde, bitkinin korunması ve neslinin sürdürülmesinde çok önemli bir yer tuttukları anlaşılmaktadır. Ayrıca uçucu yağ bitkileri sıcak iklim bölgelerinde serin iklim bölgelerine göre daha fazla sayıda bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar bunun nedenini, sıcaklardan korunmak için uçucu yağ üretmeye bağlamaktadırlar. Uçucu yağlar, sıcak havalarda buharlaşarak bitki üzerinde bir serinlik etkisi bırakmaktadır (Çelen 2011).

Yemeklik yağ ile uçucu yağlar arasında farklar bulunmaktadır. Yemeklik yağın yapısına bakıldığında Trigliserid ve gliserol içerirken uçucu yağların yapısında terpenik bileşenler, aromatik bileşikler, düz zincirli hidrokarbonlar, azot ve kükürt taşıyan bileşikler gibi bir çok çeşitli kimyasal formasyonlara sahiptirler. Ayrıca izopilen yapıdadırlar. Yemeklik yağlar doymuş ve doymamışlık özelliğe sahipken uçucu yağlarda böyle bir özellik bulunmamaktadır. Ester yapıya sahip değillerdir. Yemeklik yağlar ester yapıya sahiptirler ayrıca kıyafetlere değdiği zaman leke bırakırlarken uçucu yağlar leke bırakmazlar. Uçucu yağlar tahriş ederler kullanılmak istendiği zaman bu özellik dikkate alınmalıdır. Su ile konsantrasyonu düşürülüp öyle kullanılmaktadır. Yemeklik yağda tahriş edici özellik yoktur. Uçucu yağlar aromaterapide kullanılma sebebinden bir tanesi beyin zarından geçebilen tek madde olmasıdır. Vücudumuzun kontrol merkezi beyin olduğu için bu özellik tedavi açısından önemlidir. Uçucu yağlar spazm çözücü, irrite edici, antiseptik, antifungal, antiviral ve antimikrobiyal özellikler göstermektedirler. Uçucu yağların antibiyotik ve antiseptik özellikleri bakteriler, küf

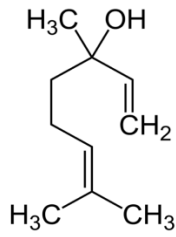
mantarları ve mayalara karşı olabilmektedir. Terpenlerin uçucu yağların ana bileşenleri olması, bu sınıf bileşiklerin de biyolojik özelliklerinin araştırılmasına yol açmıştır. Örneğin, kekik uçucu yağında bulunan bir timol ve karvakrol, fenolden 20 kat daha antiseptiktir ve diş macunlarında kullanılır. Bu bileşikler hem antioksidan hem de antibiyotik özelliklere sahip olup karaciğeri koruyucu ve iyileştirici etkilerinin yanında kalp kası üzerinde de olumlu etkileri vardır (Yaylı 2013).

Terpenler, uçucu yağların % 90' nını oluştururlar. Bunlar iki veya daha fazla izopren moleküllerinin baş-kuyruk düzenlemeleri yoluyla oluşan hücrenin sekonder metabolit bileşenleridir. Temel yapısal formülü $C_{10}H_{16}$ olup, bir monoterpen ve iki izopren molekülünden oluşur (Abak 2018). Terpen' ismi reçineden elde edilen bir bileşik olan 'turpentin' isminden türemiştir. Çoğu yüksek bitkilerden izole edilen, 100'den fazla bilinen monoterpen vardır. Monoterpenler bazı böceklerin koruma ve feromonal salgılarında da bulunmuştur, deniz organizmalarından izole edilmiş halojenli monoterpenler de vardır. Monoterpenler bitkilerde bulunan tat ve kokudan sorumlu olan yaygın bileşendir. Monoterpenlerin öne çıkan karakteristiği keskin kokuları ve uçuculuğudur (Sağır 2016).

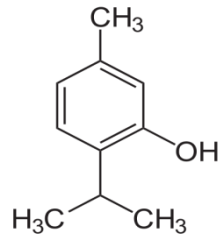


Şekil 1.1 İzopiren molekülünün kimyasal konfigürasyonu.

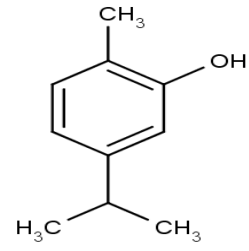
İsimleri içerdikleri karbon sayılarına göre değişir; C_5 hemiterpen, C_{10} monoterpen, C_{15} seskiterpen C_{20} diterpen, C_{30} triterpen, C_{40} tetraterpen, gibi. Oksijen gibi başka elementler içeren terpenlere terpenoidler denir. Bu araştırmada analizde miktarları diğer bileşenlere göre daha fazla çıkan etken maddelerin yapılarına bakıldığında, hepsi monoterpendir.



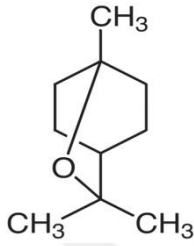
Linalool



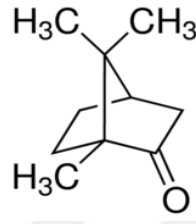
Timol



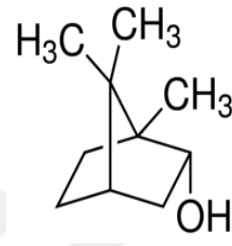
Karvacrol



1,8- cineol



Kamphor



Borneol

Şekil 1.2 Analizi yapılan uçucu yağ etken maddelerinin monoterpen yapıları.

Linalool etken maddesinin, monoterpen yapısı alkol olmakla birlikte halka yapısı Asiklik' dir (3 tane çift bağ içerir). Borneol etken maddesinin, monoterpen yapısı alkol olmakla birlikte halka yapısı Bisiklik'tir (1 tane çift bağ içerir). 1,8-cineol etken maddesinin, monoterpen yapısı eterdir. Kekğin yapısında bulunan timol ve karvacrol ise monoterpen yapısı fenoldür. Kamphor etken maddesinin, monoterpen yapısı Bisiklik'dir. Uçucu yağlar ile ilgili bilgiler ilerleyen bölümlerde geniş bir şekilde yer verilecektir. Bu çalışmada 3 bitkinin antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri kıyaslanacaktır ama esas dikkat edilmesi gereken şey bu özellikleri etkileyen faktörlerdir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Kekik (*Thymus vulgaris*)

Kekiğin familyası Ballıbabagiller (*Lamiaceae*) ve cinsi *Thymus* 'dur. Sıcak bölgeleri sevdiği için kayalık ve dağlık bölgelerde sık görülür. Çayırılarda, çimenlik alanlarda, orman kıyılarında da kekiği görmek mümkündür. Çok yıllık bir bitkidir. Kekiğin morfolojik yapısı incelendiği zaman mevsimlere göre değişiklik gösterdiği gözlemlenebilir bu da değişik koşullara adaptasyon yeteneğinin güçlü olduğunu gösterir. *Lamiaceae* familyasında çok tür bulunur ama uçucu yağında yüksek miktarda karvakrol ve timol bulunanlar kekik olarak kabul görmektedir. Ayrıca en güçlü antioksidanlar *Lamiaceae* familyasından çıkar. Kekiğin güçlü bir antioksidan olması ise içerdiği karvakrol ve timol sayesinde.



Resim 2.1 Analizde Kullanılan Kekik Bitkisi.

Günümüzde gıdaların muhafazasının sağlanması amacıyla çeşitli koruyucular kullanılmaktadır. Bunun için kimyasal maddeler, organik asitler, hayvansal kaynaklı enzimler, baharatlar vb. kullanılmaktadır. Doğal olması ve ülkemizde fazla bulunması dolayısıyla kekikler antioksidan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel bir üründür. Eski zamanlarda bile kekik değişik amaçlar için kullanılmıştır. Kekiğin sağlık açısından faydaları şunlardır:

Güçlü bir dezenfektan yeteneğine sahiptir. Kramp sıkıntısını giderir. Balgam söktürücüdür. Akciğer, bronş, mide ve bağırsak sıkıntılarını çözerek o bölgedeki zararlı mikroorganizmaları etkisiz hale getirmek kekiğin uzmanlık alanıdır. Kekik vücuttaki suyu atarak yağları eritir. Vücuttaki kan sirkülasyonunu hızlandırarak kalbe fayda sağlar. Gaz gidericidir ve mide bulantısında mideyi sakinleştirir. Baş ağrılarına ve uykusuzluğa karşı iyi gelir. Sara hastalığı için kullanılması tavsiye edilmektedir. Ağız antiseptiği olarak kullanılır ve diş ağrılarına iyi gelir. Saçlar için kullanıldığında kırılan saçları onarır ve hoş bir parlaklık verir. Kekik antimikrobiyal özelliği çok güçlü bir bitki olduğu için mumyalamada kullanılmış ve kara ölüm hastalığından korunmak için kullanılmıştır.

Kekiğin uçucu yağında bulunan iki önemli bileşik vardır. Bunların miktarındaki artış kekiğin kalitesinin belirlenmesinde etkilidir. Bunlar karvakrol ve timoldür. Bu iki bileşiğin miktarı ne kadar yüksek çıkarsa antioksidan ve antimikrobiyal gücü o kadar fazla olduğu anlamına gelir. Ayrıca, söz konusu değerlerin yüksek çıkması gıdaların muhafazasında kimyasal koruyuculara karşı bize üstünlük sağlayacaktır. Karvakrol antibakteriyal, antifungal, antihelmintik, insectisidal, aneljik ve antioksidan etkilere sahipken timol ise fenolik bileşiklere göre 4 kat daha az toksik etkisi ve 30 kat daha fazla antiseptik özelliğe sahiptir. Kekiğin antioksidan özelliği dolayısıyla yağlar için kullanıldığında yağların stabilizasyonunu artırdığı tespit edilmiştir. *Thymus vulgaris L.* (kekik) ekstrakt ve uçucu yağının *Clavibacter michiganensis subsp michiganensis*' in antibakteriyal etkisi üzerine bir yapılan bir araştırmada 5 farklı konsantrasyonlarda kekik uçucu yağı kullanarak mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal özelliklerine bakmışlar ve sonucunda kekik uçucu yağının konsantrasyonunun artmasıyla mikroorganizma sayısı azalmıştır (Bergüzar vd. 2016). Etlik piliç rasyonlarına antibiyotiklere karşı alternatif olsun diye 100, 200 ve 400 ppm oranında kekik yağı ilave etmişler ve piliçlerin canlı ağırlığına, etinin gevrekliğine, lezzetine ve ne kadar beğenildiğine bakmışlar. Sonucunda ise canlı ağırlığının en yüksek olduğu konsantrasyon 200 ppm çıkarken, gevrekliği ve lezzeti bakımından en çok hoşlarına giden konsantrasyonun ise 400 ppm kekik yağı olduğunu belirlemişler (Şimşek vd. 2005). Kekik uçucu yağını SC-CO₂ metodu ile ayrıştırılmış ve en iyi ayırımın sistem basıncı 70 atmosfer, kolon sıcaklığı 55°C ve ekstraktör sıcaklığı 38°C olduğu şartlarda

gözleendiği tespit edilmiştir (Köse 1998). Yapılan bir çalışmada, kekik uçucu yağı 10 ppm konsantrasyonunda gıda patojeni olan *Vibrio parahaemolyticus*'un gelişmesini, 150 ppm'de ise *E. coli* 0157:H7'nin gelişmesini durdurduğunu belirtmişlerdir (Shetty and Labbe 1998). Keklik uçucu yağının *L. monocytogenes* üzerinde inhibisyon gücünün çok iyi olduğunu belirtmişlerdir (Seaberg vd. 2003). Yine kekik uçucu yağının ise *L. monocytogenes* ve *B. cereus* üzerindeki etkisine bakmışlar ve inhibisyon gücünün oldukça iyi olduğunu belirtmişlerdir (Pol ve Smid 1999).

Yapılan bir çalışmada kekiğin tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğunu söylemişler. Ayrıca iki sene sonra tekrardan kekik ile ilgili çalışmalarında analiz sonuçlarının değişmediğini yine tüm mikroorganizmaları yok ettiğini belirtmişlerdir (Sağdıç ve Özcan 2003). Kekiğin antioksidan gücü E vitaminine göre düşük olduğunu ama yarı yarıya olan formülasyonunda sinerjist bir etki gösterdiğini bildirilmiştir (Gül 2012). Kekik ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Önemli olan soru hangi yöntemlerle kekik yağı elde edilmiştir ve hangi analiz metoduyla deney gerçekleştirilmiştir. Kekiğin cinsi ve hangi bölgeden elde edildiği, elde edilen kekik yağının saflık derecesi, yöntemin doğru uygulanıp uygulanmadığı gibi sorular analizin seyrini kesinlikle değiştiren faktörlerdir. Kekik uçucu yağının özellikleriyle çok fazla analiz ve araştırmalar yapılmıştır ve yapılmaya da devam edilecektir. Yazılan makalelere, tezlere araştırma yazılarına bakıldığında ortak karar kekiğin antioksidan ve antimikrobiyal gücünün yüksek olduğu yönündedir. İzmir'de yapılan bir çalışmada kekik, nane, defneyaprağı ve bunların alkol özütlerinin gıda zehirlenmesine yol açan bakterilerden *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ve *Vibrio parahaemolyticus*'un üzerine engelleyici etkileri araştırılmış; *Salmonella typhimurium*'un her baharat ortamında da en az duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Kekik % 0.05 seviyelerinde *S. aureus*'un gelişimini inhibe etmiştir ki bu, üç baharat içinde belirlenen en yüksek inhibitör etki olmuştur. Baharat özütü içeren her bir gelişim ortamında *V. parahaemolyticus* en duyarlı bakteri olarak bulunmuş; bakterinin gelişimi sırasıyla 1000, 5000 ve 6000 ppm kekik, defneyaprakları ve nane ilavesi ile inhibe edilmiştir. Yapılan bir çalışmada adaçayı, biberiye, çörekotu, kimyon, karanfil, kekik ve bunların temel bileşenlerinin inhibitör etkileri analiz edilmiştir. Çalışmada çeşitli uçucu yağların 0.25-12 mg/ml oranlarında dahi mikrobiyal gelişimi önlediği, uçucu yağların ve temel

bileşenlerinin Gram (-) bakteriler üzerine, Gram (+) bakterilere oranla daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada en etkili yağların kekik ve kimyon yağları olduğu bulunmuştur (Coşkun 2010).

2.2 Biberiye (*Rosmarinus officinalis*)

Biberiye'nin familyası Ballıbabagiller (*Lamiaceae*), cinsi ise *rosmarinus*' dur. Biberiye, yaz kış yeşil kalan çok yıllık bir bitki olup doğal olarak yetiştirilebilen bir bitkidir. *Lamiaceae* familyasından olduğu için bu biberiye'nin de antioksidan özelliği vardır. Latin dilinde anlamı deniz çiği olan biberiye adını yüksek ihtimalle bitkinin habitatının kıyı şeridi boyunca uzanmasından ve çiçeklerinin soluk okyanus mavisini andırmasından kaynaklanıyor olabilir. Aldığı isimden de anlaşılacağı üzere kökeni Akdeniz Bölgesinden gelmekle birlikte Eski Yunan ve Romalılar tıbbi tedavi amacıyla ve mutfakta baharat olarak kullanıldığı bilinmektedir.



Resim 2.2 Analizde Kullanılan Biberiye Bitkisi.

Eski zamanlarda biberiye anma ve bağlılığı temsil ettiğine inanıldığı için aşkın ve sadakatin sembolü olarak, düğün ve cenaze törenlerinde, ritüellerde sıklıkla kullanılmıştır. Hatta hafızayı kuvvetlendirdiğini düşündüğü için âlimler sınava girecekleri zaman biberiyeyi rozet olarak takmışlardır. Günümüzde de biberiye'nin bu

özelliklerinden dolayı nörolojik ve sinirsel sorunları olan hastalara, Alzheimer ve Demans hastalarına kullanmaları için tavsiye edilmektedir. Geleneksel ağrı kesici ve iltihap gidericidir. Yine eski zamanlarda biberiye antimikrobiyal olduğu için mahkemelerde hâkimler hapisanedeki suçlulardan mikrop kapmamak için kapının kenarlarına biberiye asarlar ve aynı zamanda tütsü olarak yakıldığı bilinmektedir. Temizliğinden şüphe edilen yerlere gidildiğinde bir bohçaya biberiye konulup arada koklandığı söylenmektedir.

İspanya’da yapılan bir araştırmaya göre biberiyenin aktif bileşenlerine bakılacak olursa; % 2,5’e kadar uçucu yağ içerir. 1,8-sineol (% 15-25), kafur (% 13-18,5), α -pinen (% 18-26), kamfen (% 8-12), β -pinen, mirsen, limonen, bornil asetat, borneol ve verbenon. Biberiye (Tunus, Fas): 1,8-sineol (% 38-55), kafur (% 5-15), α -pinen (% 9-14), kamfen (% 2,5-6), β -pinen (% 4–9), bornyl asetat, borneol, verbenone, linalool. Yapraklarda ayrıca fenolik asitler (rosmarinik asit), acı diterpenler (karnosol, karnozik asit, rosmanol), triterpenler (oleanik ve ursolik asit), triterpen alkoller (α -amyrin, β -amyrin, betulin) ve birkaç flavonoidler ve bunların glikozitleri (diosmetin, luteolin, genkwanin) bileşenleri içermektedir. (Charles 2013). Biberiyenin genel kullanım alanlarına bakılacak olursa bir hayli geniştir. Et ve et ürünleri, unlu mamuller ve Akdeniz mutfakları için popüler bir tariftir. Taze veya kurutulmuş yapraklar, yapraklı yeşillikler, kümes hayvanları, güveçler ve soslardan yapılan kremalı çorbalarla özel vurgu için kullanılabilir. Biberiye özü, gıda ürünlerinde antioksidan özelliklere sahiptir. Benedictine gibi likörlerde. Biberiye yaprakları ve salkım üstleri kuzu kızartmalarında, koyun eti müstahzarlarında, biberli yemeklerde, turşularda, buket garnilerde, pişmiş bonfilede, pirinçte, salatalarda, ara sıra yumurta müstahzarları, köfte, sirke, yağda, elmalar, yaz şarapları ve meyve likörlerinde kullanılır. Kurutulmuş yapraklar ve özütler kızarmış tavuk, salata krutonları, fırınlanmış ürünler, şekerlemeler ve alkolsüz içeceklerde ve parfümlerde ve sabunlarda kullanılır. (Charles 2013). Biberiye, gıda işlemede geniş bir kullanım alanı olan en etkili bitkidir. Avrupa ve ABD’de biberiye, teknik olarak doğal koruyucu veya antioksidan olarak listelenmemiş olsa da, ticari olarak bir antioksidan olarak kullanılmak üzere temin edilebilir. Biberiye, aşırı ısınmış lezzetin (WOF) bastırılmasında potansiyel bir uygulamaya sahiptir. Biberiyenin antioksidan özellikleri, süperoksit radikallerini temizleme, lipit antioksidasyonu, metal

çelatlama vb. yeteneklerine atfedilir. Biberiye özleri ve uçucu yağ içeren gıdalar, tereyağı vb. oksidasyona ve ekşimeye karşı stabilize etmek için kullanılabilir (Peter 2004). Biberiyenin somon sarsıntılı atıştırmalıklarda lipit oksidasyonunu kontrol ettiği bulunmuştur. En etkili ekstraksiyon koşullarından elde edilen biberiye ekstraktının toplam fenolikleri, lipit peroksidasyonu üzerinde yüksek bir inhibitör etki göstermiştir (Charles 2013).

Biberiye, kekik ve defne uçucu yağlar arasında antioksidan ve antimikrobiyal kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir araştırmada, en yüksek antioksidan kapasitesi her iki yöntemde de defne uçucu yağında tespit edilmiş, bunu kekik uçucu yağı takip etmiş ve en düşük antioksidan kapasite biberiye uçucu yağında gözlenmiştir. Defne uçucu yağının antioksidan kapasitesinin öjenol ve metil öjenol içeriği ile ilişkili olduğu kekik uçucu yağının antioksidan kapasitesinin ise timol ve karvakrol içeriği, bilinen antioksidan kapasitesine sahip iki fenolik bileşik ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, biberiye uçucu yağının antioksidan kapasitesi, epirosmanol, karnosol, rosmanol, karnozik asit, rosmaridifenol, rosmadial, rosmarinik asit, izorosmanol ve rosmariquinone içeriğinden gelmektedir. Bu bileşikler, hidrojen vererek başlangıçta serbest yağ asidi radikallerinin oluşumunu engelleyerek oksidasyonu geciktirir. Bu çalışmanın sonuçları, incelenen tüm uçucu yağların ve karışımlarının hem antimikrobiyal aktivite hem de antioksidan kapasite sergilediğini gösterdi. Uçucu yağlar arasında en yüksek antimikrobiyal aktivite kekik uçucu yağında belirlenirken, en yüksek antioksidan kapasite defne uçucu yağında belirlendi (Tural vd. 2017). Türkiye’de yetiştirilen 31 çeşit aromatik bitkinin antioksidan etkisinin ayçiçeği yağında incelendiği bir çalışmada, en güçlü antioksidan etkiye sahip biberiye bitkisinin olduğu, bunu sırasıyla adaçayı, sumak ve kekik gibi bitkilerin izlediği görülmüştür (Çoban vd. 2010). İstavrit ve berlam balığının kıyması ve filetoları üzerine biberiye uçucu etkisi araştırılmış ve her iki balık türünün hem kıymasında hem de filetolarında Malondialdehit (MDA) düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Sardalye kıymasının oksidatif stabilitesi üzerine soğan suyu ve biberiye uçucu yağının etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, biberiye ekstraktının muhafaza süresince (5 ay) antioksidatif etki gösterdiği, soğan suyunun ise oksidasyonu 3 ay geciktirdiği bildirilmiştir. Tavuk sosislerine biberiye ekstraktı ilave ederek 3 farklı

sıcaklık derecelerinde (4, 12, 25°C) antioksidan aktivitesini incelemiş bütün sıcaklık derecelerinde, muhafaza süresince yüksek antioksidatif etki tespit etmişlerdir. -20°C’ de 6 gün muhafaza edilen tavuk etlerinde (göğüs ve but), lipid oksidasyonunun önlenmesinde, biberiye ekstraktı ve α - tokoferolün aynı düzeyde etkili olduğunu belirlemişlerdir (Çoban vd. 2010).

Yapılan bir diğer çalışmada 32 farklı bitki ve baharat türünün domuz yağı üzerindeki antioksidan etkisi araştırılmış ve en önemli antioksidan etkiyi biberiye ve adaçayının gösterdiği belirlenmiştir (Çoban vd. 2010). Biberiye artık kanser tedavisinde önem kazanmaktadır. Biberiyeden tespit edilen başlıca antikanser bileşikler, karnosol, karnozik asit, ursolik asit, befulinik asit, rosmaridifenol ve rosemanoldür. Karnosolün, farelerde DNA'ya zarar verebilen serbest bir radikal olan hücresel nitrik oksidi azalttığı bulunmuştur. Biberiye bitkisinin bütün bir özünün uygulanmasının, kanserojen 7,12-dimetil benz (a) antrasenin (DMBA) sıçanlarda göğüs hücresi DNA'sına bağlanmasını önlemede, tek başına karnosol veya ursolik asit uygulamasından daha etkili olduğu da bildirilmektedir. Biberiye özütü, aflatoksinlerin insan karaciğer hücrelerine ve benzo (a) pireninin bronş dokusuna bağlanmasını engeller. Biberiye özütünün, ilaca dirençli MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde deksorubisin (DOX) ve vinblastin (VIN) gibi yaygın kemoterapi ilaçlarının hücre içi birikimini artırdığı ve bu da biyoaktivite için ilaçların bulunabilirliğinin artmasına neden olduğu bulunmuştur (Peter 2004).

2.3 Defne (*Laurus nobilis*)

Defnenin familyası Defnegiller (*Lauraceae*) cinsi ise *Laurus*’ dur. Defne yaz kış yeşil kalabilen ve her zaman da hoş kokular yayan bir ağaçtır. Ülkemizde Ege, Akdeniz ve Karadeniz Bölgelerinin kıyısında yetişir. 10 metreye kadar boylanabilen, her dem yeşil ağaç veya çalıdır. Yaprakları 5-10 cm uzunlukta, 2-5 cm genişlikte, sert, derimsi görünümde, kenarları dalgalı ve kısa saplıdır. Çiçekleri sarı renklidir. Meyvesi 1,5 cm çapında, zeytin benzeri, olgunlaştığında parlak siyah renklidir. Tek tohumlu olan meyve, acı lezzetli ve baharlı-aromatik kokuludur. Anadolu Mitolojisi’nde yer alan defne, Hititler tarafından, “Alanza” adıyla biliniyor ve ilaç yapımında kullanılıyordu. Antik Yunan’da ve Roma’da, yapraklı dallarından hazırlanan zafer tacı, başarı simgesi

olarak önemli kişilere takılırdı (Baser 2018).



Resim 2.3 Analizde Kullanılan Defne Yapağı.

Aromatik bir bitki olduğı için baharat olarak et ve balık yemeklerine, çorbalara, unlu mamullerde ve şekerlemelerde kullanılmaktadır. Antibakteriyel özelliğinden dolayı ise gıda koruyucular sınıflandırmasının içinde yer almaktadır.

Defnenin tarihçesine bakıldığında hüznü bir hikâyesi bulunmaktadır. Irmak Tanrısı Peneios'un Daphne isminde çok güzel bir kızı varmış. Daphne, hiçbir erkeğın boyunduruğı altına girmek istemez ormanda avlanmaktan büyük zevk almış. Bir gün yine ormandayken Zeus'un oğıu Apollon, Daphneyi görür ve kızın güzelliğinden etkilenir ve kızla konuşmak ister. Apollon'u fark eden Daphne tüm gücüyle koşmaya başlar. Gücü gittikçe tükenen Daphne yakalanacağını anlayınca Toprak anaya yalvarır; beni al, sakla ve koru der. Apollon, Daphne'yi yakalayacağı sırada ağaca dönüşüverir. Apollon durum karşısında sarsılır ve Daphne, bundan sonra sen, Apollon'un kutsal ağacı olacaksın. O solmayan ve dökülmeyen yaprakların, başımın çelengi olacak. Değerli kahramanlar, savaşlarda zafere ulaşanlar, hep senin yapraklarınla alınlarını süsleyecekler. Şarkılarda, şiirlerde adımız yan yana geçecek." Bu tatlı sözler üzerine Defne, dallarını eğerek Apollon'u saygı ile selamlar. Bu öykünün geçtiğı yer bugünkü Harbiye'dir. Apollon teessür ve heyecan içinde o ağacı amblem olarak alır ve parlak yapraklarından başına bir taç yapar. İşte o zamandan beri şiir ve silah zaferi defne dalı ile ödüllendirilir ve inanışa göre Defne'nin gözyaşları bugün hala Harbiye'de şelaleler

meydana getirmektedir (Kalaycıoğlu 2011).

Halk tıbbında yaprakları, astım, kalp hastalıkları, sindirim sistemi rahatsızlıkları, romatizma, üriner sistem rahatsızlıkları (diüretik etkilidir), böbrek taşları gibi sorunlar için kullanılır. Anadolu halk tıbbında terletici, mideyi ve antiseptik etkileriyle bilinir. Hazımsızlık, iştahsızlık ve müzmin bronşitte yararlı olduğu kabul edilir. Günlük dozda, % 5-10'luk infüzyonu, 2-3 bardak içilir. İçim kolaylığı sağlamak üzere, 4 g defneyaprağı ve 8 g kurutulmuş portakal kabuğu, 200 g kaynar suda bekletildikten sonra, bezden süzülür ve bal ile tatlandırılarak hazır hale getirilir (Başer 2018).

Defneyaprakları baharat olarak kullanılmasının yanında uçucu yağ üretiminde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Defne yaprak uçucu yağı gıda endüstrisinde koruyucu ve aroma verici olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında defneyapraklarında elde edilen uçucu yağ melanom inhibisyonunda, eklem ve kas ağrılarını gidermede, kozmetik ürünlerde koruyucu olarak, sindirim sistemi ve cilt problemlerinin tedavilerinde, aromaterapide, masaj ürünlerinde, böcek kovucu olarak da kullanılmaktadır (Gölükçü vd. 2017). Türk mutfağında sık kullanılan kekik, biberiye, defneyaprağı ve tane sumanın et marinasyonunda oluşturdukları etkilerini incelemek için bir çalışma yapılmıştır. Bu amaçla, 1 cm kalınlığında dilimlenmiş dana sırt etleri (longissimus dorsi-LD) %1,5 oranında tuz ile muamele edildikten sonra farklı örneklerle farklı miktarlarda kekik, biberiye, defneyaprağı ve tane sumak eklenerek vakumlanmış ve +2°C'de depolanmıştır. Depolamanın 7. ve 14. gününde vakum ambalajından çıkarılan etler fiziksel (pH), kimyasal (tiyobarbütirik asit-TBA) analizler yapılmıştır. Ardından örnekler kömür döküm ızgarada pişirilerek duyu analizleri gerçekleştirilmiştir. Etin her iki yüzeyine eşit olacak şekilde kuru marinasyon ve masaj yöntemi kullanılarak el yordamıyla uygulanmıştır. Polietilen vakum poşetlerine yerleştirilen etlerin tüm havası alınarak vakumlanmış ve anaerobik koşullarda 14 gün +2°C'de depolanmıştır. Analize hazır hale gelen örneklerin 0, 7 ve 14. günlerde kimyasal ve duyu analizleri yapılmıştır. Örnek miktarı üzerinden %1,5 oranında iyotlu tuz kullanılarak örnekler aynı anda ve aynı sürede döküm ızgarada pişirilerek panelistler tarafından duyu analiz yapılmıştır. Analizlerin tamamı incelendiğinde defneyaprağı ile marine edilen etlerin hem kimyasal hem de duyu analiz sonuçlarının diğer örneklerle göre daha olumlu

olduğu düşünülebilir. Vakumlu ambalajlanmış etlerin 14 gün sonundaki duyuşal kalite parametreleri göz önünde bulundurulduğunda, defneyaprağı en beğenilen marinasyon bitkisi olduğı görülmüştür (Hastaoğlu vd. 2020).

Defne (*Laurus nobilis*) uçucu yağının *L. monocytogenes* ve diğerk patojenlere karşı bakterisidal aktivitesinin olduğunu (Nakahara and Alzoreky 2003), defne uçucu yağının *S. aureus*, *E. coli* ve diğerk patojenlere antibakteriyal etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir (Çenet vd. 2006). *E. coli* O157:H7 üzerinde en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi mercanköşk ve kekiğın gösterdiğini belirlemişlerdir (Sağıdıç vd. 2002). Kekik uçucu yağının *E. coli*, *S. aureus* ve *K. pneumoniae*' ya karşı antimikrobiyal etkisinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (İlcım vd. 2001). *L. nobilis*'in farklı kısımlarındaki uçucu yağların fiziko-kimyasal karakterizasyonu ve kimyasal bileşimi üzerine çok sayıda çalışma rapor edilmiştir. Şimdiye kadar defne uçucu yağı üzerinde yapılan çalışmalar, çeşitliliğın coğrafi kökeninin ve hasat mevsiminin kimyasal bileşim üzerindeki etkisini göstermektedir. Çiçek uçucu yağının kimyasal bileşimi, bitkinin diğerk kısımlarından, yani yapraklar, gövde kabuğı ve gövde odunundan oldukça farklıdır (Peter 2000). Defneyaprağı ekstraktlarının hipoglisemik aktivitesi de rapor edilmiştir. Defneyaprakları, glikoz metabolizmasında insülinin etkisini güçlendirdiğı ve glikoz taşınmasını azalttığı gözlenmiştir. *L. nobilis*'in yapraklarının etanolik özütünün 200 ve 600 mg / kg dozlarının uygulanması, diyabetik tavşanlarda kan glikoz seviyelerinde önemli bir düşüş sağlamıştır. *L. nobilis* tohumlarının olası antiülserojenik aktivitesi, sıçanlarda deneysel olarak (etanol) indüklenen mide ülserleri üzerinde test edilmiştir. Sonuçlar, % 20 ve % 40 sulu özütler ve ayrıca tohumların yağlı fraksiyonu için anti-ülserojenik aktivite göstermiştir. *L. nobilis*'in yapraklarından elde edilen metanolik ekstrakt, etanol yüklü sıçanlarda kan etanol seviyesinin yükselmesini inhibe etmiştir. Biyo-tahlil kılavuzlu ayırma, aktif bileşenler olarak kostunolid, dehidrokostus lakton ve santamarinin izolasyonu ile sonuçlanmıştır. Metilen-butirolakton yapısının, etanol emilimi üzerindeki önleyici etki için gerekli olduğı bulunmuştur. Ek olarak, mide boşalmasının gecikmesi, koruyucu etkilerde kısmen rol oynamıştır. *L. nobilis*'in sulu yaprak ve çiçeklerinin yetişkin salyangoz ve embriyo (*Biomphalaria glabrata*) üzerindeki etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, embriyolar üzerinde 125 ppm konsantrasyonda başlayan bir toksisite derecesi göstermiştir. Çiçek özü daha etkili

görünmüştür. Hem yaprak (50 ppm) hem de çiçek (25 ppm) ekstreleri ile muamele edilen embriyolarda sefalik ve kabuk malformasyonları bulunmuştur. Yetişkin salyangozlarda LD₉₀ değeri çiçek özütü için 340 ppm ve yaprak özütü için 1900 ppm olarak tahmin edilmiştir. Hamamböceği kovucu aktivitesi defneyapraklarında da bulunmuştur (Peter 2000). Defne uçucu yağının antidiyabetik özelliği ile ilgili çalışma yapılmıştır. Hidroalkolik ekstratlarla, aseton ekstratlarıyla ve defneyapraklarından elde edilmiş uçucu yağlar ile birçok araştırma yapılmıştır. Bir metanolik ekstraktın α -glukozidazı inhibe ettiğini belirlenmiş ve α -glukozidaz inhibisyonunu yapan üç ana bileşenini tanımladı. Bunlar 1,8-sineol, 1- (S) - α -pinen ve R - (+) – limonen'dir. Bunun dışında da birçok farklı çalışma ile de hipoglisemik aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Alejo ve Armijo 2017).

2.4.Süperkritik Akışkan

Her maddenin sahip olduğu bir kritik sıcaklığı (Tc) ve kritik basınç (Pc) değeri vardır. Maddelerin bu değerlerinin üzerine çıkıldığı zaman katı, sıvı ve gaz fazından başka bir faz daha oluşur. Bu faza süperkritik akışkan fazı denir. Madde bu faz esnasında ne sıvının özelliklerini ne de gaz fazın özelliklerini gösterir. Her iki fazında en iyi özelliklerini bünyesinde barındırır. Maddenin yoğunluğu sıvı faza, viskozite ve yayınlılığı ise gaz fazına yakınlık gösterir. Zaten bu bölgede ki akışkanın en önemli özelliklerini viskozitesi, yayınlılığı ve yoğunluğu oluşturur. Bu üç önemli özellik de sıcaklık ve basınç değişimlerine karşı oldukça duyarlı olmakla birlikte basıncıdaki ufak bir artışla bile akışkanın yoğunluğu artacak ve sıvı fazın çözme gücünden daha kolay bir şekilde kontrol altına alınabilecektir. Süper kritik akışkan fazı, sıvı faza göre yayınlılığı daha yüksek olmakla birlikte yüzey gerilimi ve viskozitesi daha düşüktür. Bu mükemmel özellik sayesinde kütle aktarımı daha kolay bir şekilde gerçekleşmektedir. Bu fazın yoğunluğu ve çözme gücü arasındaki olumlu ilişki ve kütle aktarımı özellikleri sayesinde de süperkritik akışkan ekstraksiyonunu uygun hale getirmektedir.



Şekil 2.1 Maddenin Süperkritik akışkan faz grafiği.

2.4.1 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Bir maddenin kritik noktası ilk kez Baron Cagniardde'la Tour tarafından 1822'de gözlenmiştir. 1879'da Hannay ve Hogart metal halojenürler gibi katı maddelerin süperkritik metanol ve karbon tetraklorür de çözüldüğünü rapor etmişlerdir. Francis 1954'de yayımladığı bir makalede 261 tane farklı bileşenin süperkritik CO₂'e çözüldüğünü belirtmiştir. 1980'den sonra süperkritik teknolojiyle elde edilen çözeltiler analitik kimyada büyük gelişme göstermeye başlamasıyla birlikte endüstriyel alanda da hızlı bir şekilde yer almıştır. Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) süperkritik akışkan ekstraksiyon metodlarının gelişimi için çaba göstermektedir (Sezgi 2019). 2000' li yıllardan itibaren bilinen ekstraksiyon yöntemlerine karşı alternatif bir metod olarak süperkritik akışkan dikkatleri üstüne toplamıştır. Bilinen ekstraksiyon metodlarında başarısız işlemlerde süperkritik akışkan ekstraksiyonla üstünlük sağlamıştır. Bu metod ile kullanılan çözücü miktarı ve işlenilen basamak sayısı azalmakta ayrıca analiz süresi diğer metodlara nazaran ciddi bir şekilde azalma sağlamıştır. Çözücü miktarının azalması hem ekonomik yönden hem de çevre kirliliği açısından önemlidir.

2.4.2 Süperkritik Akışkan Seçimi

Gıda endüstrisinde ekstrakte edilecek hammadde için kullanılacak akışkan seçimi oldukça önem arz etmektedir. Akışkan seçilirken dikkat edilmesi gereken birkaç önemli husus vardır:

1. Çözücünün hammaddeye ne kadar etki ettiği,
2. Çözücünün toksik, patlayıcı ve yanıcı özellikte olup olmaması,
3. Çözücünün kimyasal kararlılığı,
4. Üründen kolay ayrılabilirliği
5. İnertliği,
6. Kolay bulunabilmesi ve ekonomik olması gibi özellikler göz önüne alınarak seçim yapılmalıdır.

Aşağıdaki çizelgede akışkanların fiziksel özellikleri ve değerleri bulunmaktadır. Gıda endüstrisinde en çok kullanılan akışkan CO₂'dir. Dikkat edilmesi gereken bir husus da kritik sıcaklığı yüksek olan akışkanların gıda endüstrisinde kullanılmaması gerektiğidir. Çünkü sıcaklığa duyarlı olan maddelerin ekstrakte edilmesinde uygun bir çözen değildir.

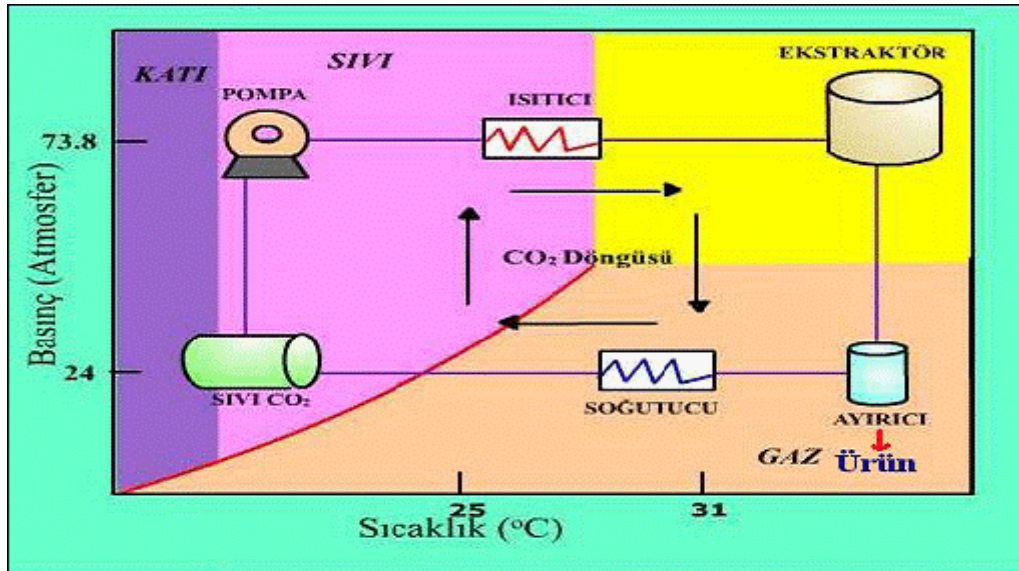
2.4.3 Süperkritik CO₂'nin Özellikleri

CO₂ birçok avantajından dolayı süperkritik akışkan olarak en fazla kullanılan bir bileşiktir. Bunlar; zehirli olmaması, temin edilmesinin kolay ve ucuz olması, kararlı bir bileşik olması, yanıcı özellikte olmaması, sistemden rahatlıkla ayrılıp ekstrakte edilen ürünün içinde kalıntı bırakmaması, transfer kapasitesinin yüksek olması, kritik sıcaklığı (31°C) ve basıncının (7.38 MPa) düşük olması bu sayede kolaylıkla bu değerlere ulaşılabilmesi, kuru ortamda korozyon olmaması, gıdaya ve çevreye zarar vermemesi, katı ve sıvı sistemler için uygun olabilmesi, apolar ve orta polar organik bileşikler için yüksek çözme gücüne sahip olması sayılabilir. Bütün bunlar süperkritik akışkan ekstraksiyonunda akışkan olarak CO₂'nin neden sıklıkla başvurulduğunun birer kanıtıdır.

Süperkritik akışkan olarak CO₂'den sonra kullanılan akışkanlar; aseton, toluen, metanol, etanol ve amonyaktır. Bu akışkanlar ayrıca yardımcı solvent olarak CO₂ ile birlikte de kullanılabilirler.

2.4.4. SC-CO₂ EKSTRAKSİYONU

Süperkritik akışkan ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi Şekil 2.2' de verilmiştir. Sistemdeki sıvı akışkan önce bir pompa ile istenilen basınç değerine ayarlanır. Buradan bir ısıtıcıya gönderilen akışkan istenilen sıcaklık değerine ısıtılır. Böylece süperkritik sıcaklık ve basınç değerlerine getirilmiş olan akışkan sıcaklığı sabit tutulan bir ekstraktöre gönderilir. Ekstraktörde bulunan madde ile temas sonucu, süper kritik akışkanda çözünen karışım bir ayırıcıya alınır ve basıncı düşürülür. Basıncının düşürülmesi sırasında çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır. Ayırıcıdan alınan süper kritik gazının geri kazanımı için bir soğutucuda sıcaklığı düşürülmektedir. Soğutucudan çıkan sıvı akışkan tekrar sisteme beslenmek üzere sıvı CO₂ tüpünden alınan akımla karıştırılır. Elde edilen ürün ya da ürünler ayırıcının altından toplanır (Sezgi 2019).



Şekil 2.2 Süperkritik ekstraksiyon sisteminin şematik olarak gösterimi.

2.4.5 Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonun Üstünlükleri

1. SC Ekstraksiyon genellikle hızlı bir tekniktir. Bu numune matriksi ile ekstraksiyon akışkanı arasındaki kütle aktarım hızı, ekstrakte edilecek türün akışkandaki difüzyon katsayısına ve akışkanın viskozitesine bağlıdır. (difüzyon hızı ne kadar büyük ve viskozite ne kadar küçükse, kütle aktarımı o kadar hızlı olur).
2. Önceden de belirtildiği gibi, süperkritik akışkanlar her iki bakımdan da sıvılara üstündür. Sonuç olarak, süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon genelde 10-60 dakikada tamamlanırken, sıvılarla gerçekleştirilen bir ekstraksiyon saatler hatta günler alabilir.
3. Bir süperkritik akışkanın çözünürlük gücü basıncı ve daha az önemli olmakla birlikte, sıcaklığı değiştirerek geliştirilebilir. Aksine, sıvıların çözünürlük güçleri basınçla artar ve sıcaklıktan fazla etkilenmez. Bu sebeple, süperkritik akışkanlarla ekstraksiyon yapılırken, basınç ve sıcaklık, analit için en uygun değerlere ayarlanabilir.
4. Pek çok süperkritik akışkan, oda koşullarında gazdır. Çözeltilerdeki analitlerin geri kazanılması, sıvı çözeltilere göre basittir. Çünkü sıvıları ısıtarak buharlaştırmak gerekir ve bu da bir yandan sıcaklığa duyarlı maddelerin bozunmasına, bir yandan da uçucu analitlerin kaybına yol açar. Hâlbuki süperkritik bir akışkanı, sadece basıncı kaldırarak analitten ayırmak mümkündür.
5. Alternatif olarak, süperkritik akışkandaki analit çözeltisini, içine analiti iyi çözen bir sıvı çözücü konmuş küçük bir kaptan kabarcıklar halinde geçirmek ve böylece analitin değişik bir çözeltisini hazırlamak mümkündür.
6. Bazı süperkritik akışkanlar ucuz, inert ve sağlığa ve çevreye zararsızdır. Bu akışkanlar, ekstraksiyondan sonra kolayca bertaraf edilebilir. Bunun için, akışkanı atmosfere bırakmak yeterlidir (Büyükkiz 2007).

2.4.6 Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonunun Dezavantajları

1. İlk kurulum maliyeti çok yüksektir.
2. Cihazdan anlayan insan sayısı çok azdır.

3. Sistem kurulumu iyi yapılmazsa işletmede ciddi boyutlarda patlama meydana gelir. Bunun sebebi ise 1 atm' lik alana 73 atm' lik CO₂ sığdırıldığı içindir.

Karbondiyoksit apolar yapıya sahip bir bileşiktir. Bu yüzden de apolar yapıya sahip olan bileşikler iyi bir şekilde çözecektir. Bu olumsuz özellik polar yapıya sahip olan çözücüler tarafından elemine edilebilmekte ve karbondiyoksitin geniş bir spektrumda çalışmasına olanak vermektedir. En çok kullanılan yardımcı çözücüler ise; etanol, metanol ve asetonur. Bu sistem karbondiyoksit ve iki yardımcı solvent kullanımına da uygundur.

2.4.7 Gıda endüstrisinde Süperkritik Akışkanın Önemi

Süperkritik akışkan uygulamaları gıda sanayinde çok önemli bileşiklerin elde edilmesinde kullanılabilmektedir. Baharat ve meyvelerden esansiyel ve uçucu yağ elde edilmesinde, istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılmasında, mineral yağ üretiminde, bitkisel ve hayvansal protein üretiminde, doğal boya üretiminde, yağ uzaklaştırılmasında, deodorasyon, rejenerasyon, alkolsüz şarap ve bira üretimi ve birçok maddenin elde edilmesi ve uzaklaştırılmasında çok etkili bir yöntem olduğu için bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır.

2.4.8 Gıda Endüstrisinde Kullanıldığı Alanlar

Yağların Ekstraksiyonu

Süperkritik karbondiyoksit ekstraksiyonu (SC-CO₂), yağ, antioksidan ve biyoaktif bileşikler çıkarmak için yeşil bir teknolojidir. Karbondiyoksit ekstraksiyon işleminin tamamlanmasından sonra kalıntı bırakmaz. Süperkritik karbondiyoksit ekstraksiyonu birçok araştırmacı tarafından bitkilerden ve bitki aksamlarından etkili biyoaktif madde elde etmek için uygulanmıştır. Son yıllarda, süperkritik sıvı ekstraksiyonunun, *Pithecellobium Jiringan* (Jack) Prain, tohumları, palmye yağı, *pipper batle* yaprakları ve kauçuk tohumları yağı gibi birçok bitki ve bitkiyi başarıyla çıkardığı bildirilmiştir (Putra vd. 2018). Süper kritik akışkanla yapılan yağların rengi daha berrak ve saftır. Elde edilen yağların kompozisyonu ve miktarlarının da SC-CO₂'de fazla olduğu

gözlenmiştir. Yağı çıkarılacak hammaddenin nem içeriği % 4'e kadar düşürülmelidir. Çünkü nem etkileşimi azaltır ve difüzyona karşı bir bariyer oluşturur. Ayrıca partikül büyüklüğü de ekstraksiyonu etkileyen bir parametre olup büyük olması difüzyon yeteneğini azaltır, çok küçük olması ise ekstraktörde kanal oluşturarak işlemi geçmeyerek sistemi terk etmesine neden olur. Akışkanın çözme yeteneği basınçla artarken sıcaklıkla azalır ve akışkanın hacmi basınçla doğru orantılıdır. Akışkan hacminin yüksek olması hammaddeye daha fazla diffüze olması demektir ki bu bizim kesinlikle istediğimiz bir şeydir. SC-CO₂ genellikle düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir, bunun sonucunda ısıya duyarlı (hassas) bileşenlerin ekstraksiyonu için ideal bir teknik olabilmekte ve ekstraksiyon esnasında istenmeyen yan ürünlerin oluşması önlenmektedir (Öztaş vd. 2011).

Kahve ve Çayda Kafeinin Uzaklaştırılması

Dekafeinizasyon; kafein içeren materyallerden (çay, kahve, kakao vb.) kafeinin uzaklaştırılması işlemidir. İlk ticari kafeinizasyon kahve çekirdeklerinde yapılmıştır. Tuzlu su çözeltisi ile kahve çekirdekleri nemlendirilmiş ve daha sonra kafeini uzaklaştırmada çözücü olarak benzen kullanılmıştır. Daha sonra, bu yöntem benzenin oluşturduğu riskler nedeniyle tamamen terk edilmiştir (Koca ve Bostancı 2013). Çaydan kafeinin ayrılmasında birçok yöntem bulunmaktadır. Ancak bu yöntemleri her çay tipine uygulamak mümkün değildir. Örneğin yeşil çaya uygulanan her yöntem siyah çaya uygulanamamaktadır. Yeşil çaydan kafeinin uzaklaştırılması siyah çaya göre daha kolaydır. Çaydan kafein uzaklaştırılırken aroma ve tat kayıplarından kaçınmak mümkün değildir. Bu nedenle tat ve aroma bileşenleri kafein ayrılması işleminden sonra tekrar ortama ilave edilmelidir (Koca ve Bostancı 2013). Kafeini uzaklaştırmamanın birçok yönteminin bulunmasıyla birlikte tamamı kafeinin suda çözünmesi esasına dayanmaktadır.

Fenolik Bileşiklerin ve Antioksidanların Ekstraksiyonu

Bilindiği üzere fenolik bileşikler ve antioksidanların kaynağı bitkilerdir. İki grupta düşük konsantrasyonlarda ve genellikle karmaşık yapılarda bulunduklarından araştırmacılar hammaddeden geri kazanımı için daha etkili ve seçici ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine odaklanırlar (Parab vd. 2013). Süperkritik CO₂ uygulamasında optimum sıcaklık 35-40°C' dir. 40°C'nin üzerine çıkılmaz çünkü bileşikler hassastır ve istenmeyen metabolitler oluşabilir ve ayrılmasını istediğimiz saf bileşik sıcaklıkta bozunduğu için çıkmayabilir. Bu yüzden sıcaklık konusunda dikkatli olunmalıdır. CO₂'nin yanında co-solvent olarak etanol de kullanılabilir. CO₂ polar yapıda olduğu için polar bileşikleri iyi çözecektir bu eksikliği kapatmak için ise genellikle etanol ile birlikte kullanılır.

Suların Arıtılması

Suyun kritik sıcaklık ve kritik basınç değerleri sırasıyla 374,8°C ve 221,3 bar' dır. Özellikleri, benzer bir polar sıvıdan hemen hemen apolar bir akışkana doğru değişir. Bu değişim, oldukça geniş bir sıcaklık aralığında gerçekleşir. Kritik noktadan daha yüksek sıcaklıklarda beklenildiğinden daha asidik olur ve diffüzivitesi artar. Su ile yüksek sıcaklıklarda çalışılıyor olması, ısıl reaksiyon hızını artırır, bu da reaktördeki karıştırma hızını artırarak organik maddelerin iyi çözünmesini, oksijenle hızlı reaksiyona girilmesini ve tuzların çöktürülmesini sağlar. Bu nedenle süperkritik su, çözünürlüğe dayalı bir kontrol mekanizması, düşük viskozite ve yüksek diffüzlenme yeteneğine dayalı mükemmel taşınım özellikleri ve hidroliz veya kısmi oksidasyon için yeni reaksiyon imkânları sunan bir çözücüdür (Akgün ve Söğüt 2008). Reaksiyonun kontrolü basınç ve sıcaklık ayarlamasıyla kolaylıkla sağlanabildiği için, reaksiyon hızı ve gidişatı kontrol altındadır. Ayrıca sistem dış ortamla temas halinde değildir ve zehirli atıkların bulunduğu yere taşınabilme özelliğine sahiptir. Süperkritik su ortamında atıkların yok edilmesi oldukça basittir. Bir tanka depolanan atık, yüksek basınç pompasıyla ön ısıtmadan geçirildikten sonra reaktöre gönderilir. Çalışma basıncına basınçlandırılırken, bir taraftan da okside edici ajanla karıştırılır. Atığın reaktörde kalma süresi, çalışma koşullarına (sıcaklık ve basınç) ve yok edilecek karışımın reaksiyon kinetiğine bağlıdır.

Reaksiyondan sonra, ürünler reaktörü terk eder. Yeni gelen atık çözeltisinin ısıtılması için gereken ısı, dışarıya çıkan akımdan geri kazanılarak sağlanır. Bu ısı transferi sırasında oluşan gaz ve sıvı fazlar ayrılır ve eğer gerekliyse, çevreye atılmadan önce bir başka muamelelerden geçirilir. SCWO (Süperkritik su oksidasyonu) sürecinde tamamen bir bozunma gerçekleşmesi için 375°C'den yüksek bir sıcaklık ve 23 MPa' dan yüksek bir basınç gereklidir. Bu koşullarda verim son derece yüksek olur ve reaktörde kalış süresi bir dakikanın altına iner; fakat ortamda, her zaman yeterli oksijen bulunmalıdır (Akgün ve Söğüt 2008).

2.5 DİSTİLASYON YÖNTEMİ

2.5.1 Su Distilasyonu (Hidrodistilasyon)

Kurutulmuş ve ıslatmakla bozunmayan bitkisel materyallerden uçucu yağ elde edilirken uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemle, elde edilen uçucu yağ yanında aromatik suda elde edilir. Su distilasyonu yönteminde, su miktarı uçucu yağı çıkarılacak bitkisel materyali örtecek kadar olmalı eğer su miktarı az olursa materyal aşırı ısınmadan dolayı kavrulabilir. Sistem dışarıdan ısıtılır ve su dokulara nüfuz ederek önce kuvvetli polar maddeleri çözer. Düşük polariteye sahip maddeler ise daha sonra distillenir. Karışım hücre cidarından difüzyona uğrar ve ısı etkisiyle buharlaşır. Yağ taşıyan buharlar soğutucuda yoğunlaşarak toplama kabında toplanır. Toplama kabında toplanan uçucu yağlar su ile karışmadığından ve sudan hafif olduğundan kolayca ayrılır. Su distilasyonu yönteminde, ısının etkisiyle uçucu yağdaki bazı bileşenlerin hidroliz olması, yağda bozunma ve parçalanma meydana gelmesi nedeniyle kimyasal bileşikler bazı değişikliklere uğrayabilir (Baddal 2010).

2.5.2 Su-Buhar Distilasyonu

Doygun ve aşırı ısıtılmış buharla bitkilere uygulanan bir yöntemdir. Su buharı damıtması ile kendi kaynama noktasında bozunmaya uğrayan maddeler düşük sıcaklıklarda bozunmadan damıtılabilir. Atmosfer basıncında yapılabildiği gibi nispeten atmosfer basıncından yüksek basınçlarda da uygulanabilen bir yöntemdir. Buhar distilasyonu boyunca bazı maddeler dayanıklılıklarını sürdürebildikleri halde bazı

maddeler ısı etkisiyle hidroliz olurlar. Bu hidrolizi engellemek ya da en düşük düzeye indirebilmek için hücre zarından su ve buhara difüzyon hızını çok iyi düzenlemek ve distilasyonu mümkün olduğu kadar hızlı yapmak gerekir (Kutlular 2007).

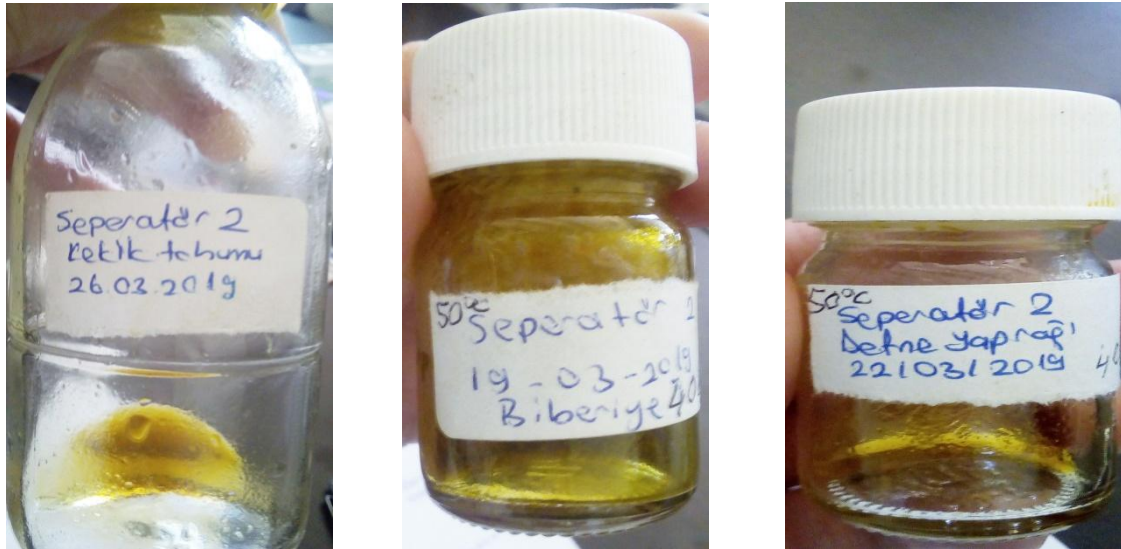
2.5.3 Buhar Distilasyonu

Kuru buhar damıtmasında bitkisel materyal bir kap içinde ve ızgara üzerinde bulunur. Bu kap su buharı jeneratöründen gelen buharın yoğunlaşmamasını sağlayacak kadar ısıtılır. Bu usullerden ilk ve ikincisinde esansın suda çözünme oranına göre bir kısmı su fazında çözünerek az çok kayıplar olur. Bitkisel materyalin toplanması ile damıtmaya sevk edilecek ana kadar geçen zaman içinde esans kaybı meydana gelebileceği dikkat edilecek bir noktadır. Toplanan mahsul depo edilirse uçucu yağ kesecikleri parçalanarak esans serbest kalır ve bu suretle hava teması ve bazı bitkisel enzimlerin tesiri ile fermentatif bir oksidasyona uğrar. Mesela gül petallerinin toplandığı torbaların orta yerinde sıcaklık sabahtan akşama kadar 45 - 50° C üstüne kadar yükselir. Bunu önlemek üzere bazı yerlerde petaller 15 - 18°C' lik su (veya tuzlu su) içinde bekletilir. Damıtma usullerinde distilatı teşkil eden su ve yağ tabakaları aktarma suretiyle ayrılırlar. Buradaki su kısmen çözülmüş esans ihtiva ettiğinden tekrar damıtma kabına sevk edilir. Sürekli (continue) olarak aktarma “florentin” denen bir özel kap ile yapılır (Baddal 2010).

3. MATERYAL ve METOT

Materyaller Afyon ilinde bulunan akıroğlu aktardan Şubat ayı 2019 yılında alınmıştır. Süperkritik ekstraksiyon ve Distilasyondan önce baharatlar öğütölmüştür. Baharatlardan elde edilen ekstraktlar analiz edilinceye kadar kahverengi şişelerde ve buzdolabında muhafaza edilmişlerdir. Yağ çıkarma işlemi Konya'da özel bir firmada gerçekleştirilmiştir. Süperkritik cihaz 50 °C'de ve 40 barda çalışılmıştır.

Diğer uçucu yağ elde etmede kullanılacak metod ise su buharı distilasyonudur. Birbiri içinde hemen hemen hiç çözünmeyen sıvıların damıtılması su buharı damıtması ile yapılır. Hangi baharatın uçucu yağı elde edilmek isteniyorsa o numuneden 15 gram alınarak balona yerleştirilir. Üzerine 100 ml saf su eklendikten sonra sisteme su buharı verilerek damıtma işlemi başlatılır. Su buharı eldesi için örneği koyduğumuz balonun öncesine içi su dolu bir balon yerleştirilerek kaynatılır. Kaynatma sonrasında oluşan su buharı aradaki bağlantı yardımı ile örneğin olduğu kaba geçer. Yağ damlacıkları gelmeyinceye kadar damıtmaya devam edilir. Toplanan kısım bir ayırma hunisine aktarılır, üzerine 6 ml. eter eklenir ve çalkalanır. Fazlar ayrılana kadar beklenir. Bir su banyosu üzerinde eter uçurulur, geriye kalan uçucu yağdır. Su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağların analizi ise Afyon Kocatepe Üniversitesi'nde yapılmıştır..



Resim 3.1 Uçucu yağları çıkartılan baharatlar.

Süperkritik CO₂ ile elde edilen yağların analizi Burdur Mehmet Akif Ersoy

Üniversitesi'nde yapılmıştır.

Çalışma Sıcaklığı: Fırın başlangıç sıcaklığı 60°C'dir. 60°C'de 2 dakika bekletildikten sonra dakikada 2°C'lik artışla 220°C'ye çıkarılmıştır. Bu sıcaklıkta 20 dakika bekletilmiştir. Dedektör ve enjektör sıcaklığı 250°C ve 240°C'dir. 100µL numune 1 mL hexanda çözülüp enjekte edilmiştir.

Kolon: CPWAX 52 CB (50*0,25(0,2))

Kullanılan Cihaz: AGILENT 5975 C AGILENT 7890A GC



4. BULGULAR

Süperkritik yöntem ve distilasyon yöntemi uygulanarak kekik, biberiye ve defnenin uçucu yağlarında bulunan etken maddeler ve değerleri çizelge halinde sunulmuştur.

Çizelge 4.1 SC-CO₂ Yöntemi ile Elde Edilen Kekik Uçucu Yağının Analiz Sonuçları (%)

% Oran	Bileşen
0,257	α -thujene
0,265	α -pinene
0,079	Camphene
0,029	Phenylethyl Alcohol
0,171	β -pinene
0,874	β -myrcene
0,162	1-Phellandrene
1,218	α -terpinene
6,473	1,8-Cinole
0,313	Sabinene
4,858	o-cymene
3,092	γ -terpinene
0,237	α -terpinolene
0,307	1-octen-3-ol
0,476	Cis- β -terpinol
0,153	α -campholene Aldehyde
14,565	Linalool
0,711	Cis Sabine Hydrate
0,096	Terpineol
0,171	(E)-3(10)-Caren-2-ol
0,64	Lnalyl acetate
0,068	1- Terpineol
2,652	4-Terpineol
0,187	Neosemburin
0,327	Carvacrol Methyl Ether
0,037	CisPinane((Bicyclo[3.1.1]heptane, 2,6,6-trimethyl-,[IR(1. α .,2. α .5. α .)]
2,126	Borneol
0,996	α -terpineol
0,339	Cyclopropane,
0,641	Carvol
4,853	Camphene
3,73	Trans- Caryophyllene
1,018	Aromadendrene
0,247	α -caryophyllene
0,809	Carvaryl Acetate
0,483	Ledene
2,992	β -bisabolene
0,308	β -selinen
0,191	d-cadinene
0,612	amorphene
0,462	methyleugenol
3,983	Eugenol
37,057	Carvacrol

Çizelge 4.2 SC-CO₂ Yöntemi ile Elde Edilen Biberiye Uçucu Yağının Analiz Sonuçları (%)

% Oran	Bileşen
6,769	α -pinene
1,326	Camphene
0,625	β -pinene
1,564	β -myrcene
0,262	α -terpinene
28,291	1,8-Cinole
2,743	o-cymene
0,193	Terpinolene
0,341	1-octen-3-ol
0,128	Linalool Oxide
0,079	Filifolone
0,352	p-cimenene
0,172	2-methyltricyclo[2.2.1.0(2,6)] heptane
4,134	Linalool
7,011	Alcanfor
0,125	3-Pinanone
0,621	2,3-Dimethyl-1,4-pentadiene
0,168	Phytol
2,09	4-Terpinol
0,23	Trans-Pinocarveol
1,836	Bomyl acetate
0,609	d-terpineol
8,265	Bomeol
10,185	d-3-Carene
0,184	α -copaene
1,061	D-(+)-Carvone (2-Cyclohexen-1- one, 2-methyl-5-(1- methylethenyl)-(S)-)
1,189	Isoterpinolene
0,743	p-Cumic aldehyde (Benzaldehyde, 4-(1- methylethyl)-)
6,09	Trans-Caryophyllene
0,461	Camphene
1,006	α -caryophyllene
0,25	α -amorphene
0,586	d-cadinene
0,619	α -amorphene
0,546	1S,Cis-Calamenene
2,79	Eugenol
0,933	2-Methyl-Z,Z-3,13- octadecadienol
2,942	Carvacrol
1,061	Germacrane D

Çizelge 4.3 SC-CO₂ Yöntemi ile Elde Edilen Defne Uçucu Yağının Analiz Sonuçları (%)

% Oran	Bileşen
1,131	α -pinene
0,101	Camphene
0,06	2-Thujene
3,69	β -phellandrene
0,49	β -myrcene
0,131	1- Phellandrene
0,16	α -terpinene
20,536	eucalyptol
1,141	o-cymene
0,52	γ -terpinene
0,124	α -terpinolene
0,101	1 octen-3 ol
0,038	Lşnalool oxide cis
0,072	p-cymenene
	1,3-Cyclopentadiene,trimethyl-
0,053	Linalool
2,755	Alcanfor
2,009	Bicyclo[3.1.1]heptan-2-one, 6,6-
0,068	dimethyl-
0,545	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-
	(1-methylethyl)-,trans-
0,134	Linalyl acetate
4,439	4-Terpineol
0,464	Trans-Pinocarveol
0,763	Bomyl acetate
0,247	Verbenene
1,247	d-terpineol
0,183	2-Undecanone
2,667	Bomeol
6,123	Camphene
2,008	Sabinene
0,326	Isoterpinolene
0,327	Germacrane D
19,65	d-carvone
3,787	4-Carene
0,34	Trans-Caryophyllene
0,791	Camphene
0,652	β -guaiene
0,391	α -humulene
2,543	Aromadendrene
0,54	Germacrene
0,54	d-cadinene
1,206	α -amorphene
0,454	Methyleugenol
0,243	p-Cymen-7-ol
2,421	Eugenol
2,777	Caryophyllene oxide
2,742	Carvacrol
0,422	Trans-Methyl Iso Eugenol
1,76	Spathulenol
0,336	Vulgarol

Çizelge 4.4 SC-CO₂ ve Distilasyon Yöntemi İle Elde Edilen Uçucu Yağların Bileşenlerinin Değerleri (%).

Bileşenler	SC-CO ₂ yöntemiyle ekstrakte edilen uçucu yağ			Distilasyon yöntemiyle ekstrakte edilen uçucu yağ		
	Kekik	Biberiye	Defne	Kekik	Biberiye	Defne
Linalool	14,565	4,134	2,755	3,589	3,331	2,475
Karvakrol	37,057	2,942	2,742	72,160	_*	_*
1,8-Sineol	6,473	28,291	20,536	_*	10,449	45,349
Kamfor	_*	7,011	2,009	_*	11,224	2,124
Borneol	2,126	8,265	2,667	1,626	6,699	0,28
Timol	_*	_*	_*	1,920	0,207	_*

* Tespit edilemedi.

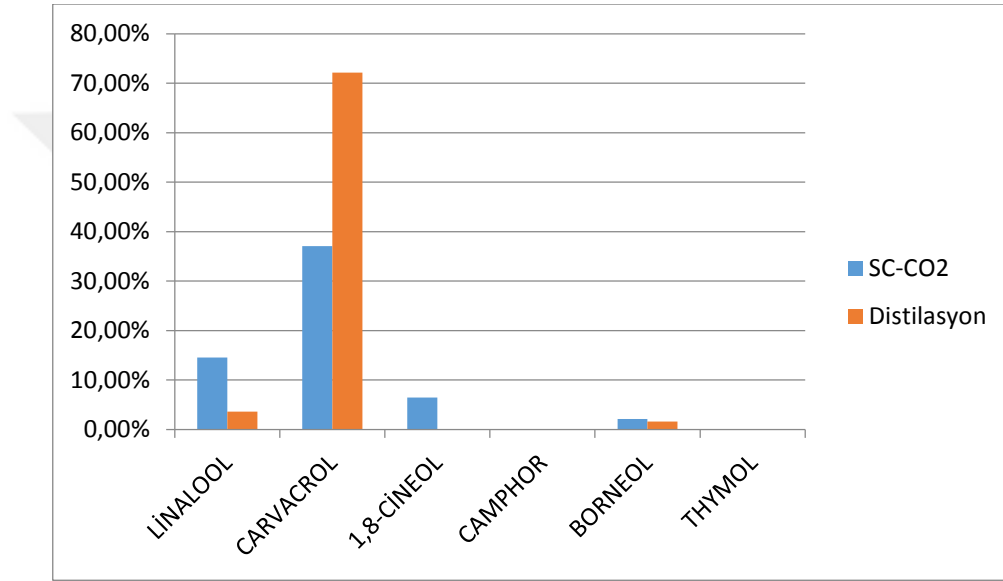
Çizelge 4.5 Kekik bitkisi içeriklerinin elde ediliş yöntemine göre farkları.

Kekik	SC-CO ₂	Distilasyon
Linalool	%14,565	%3,589
Carvacrol	%37,057	%72,160
1,8-cineol	%6,473	_*
Alcanfor (camphor)	_*	_*

Çizelge 4.5 (Devam) Kekik bitkisi içeriklerinin elde edilış yöntemine göre farkları.

Kekik	SC-CO ₂	Distilasyon
Borneol	%2,126	%1,626
Thymol	_*	%1,920

* Tespit edilemedi.



Şekil 4.1 Kekik bitkisi içeriklerinin elde edilış yöntemine göre farkları.

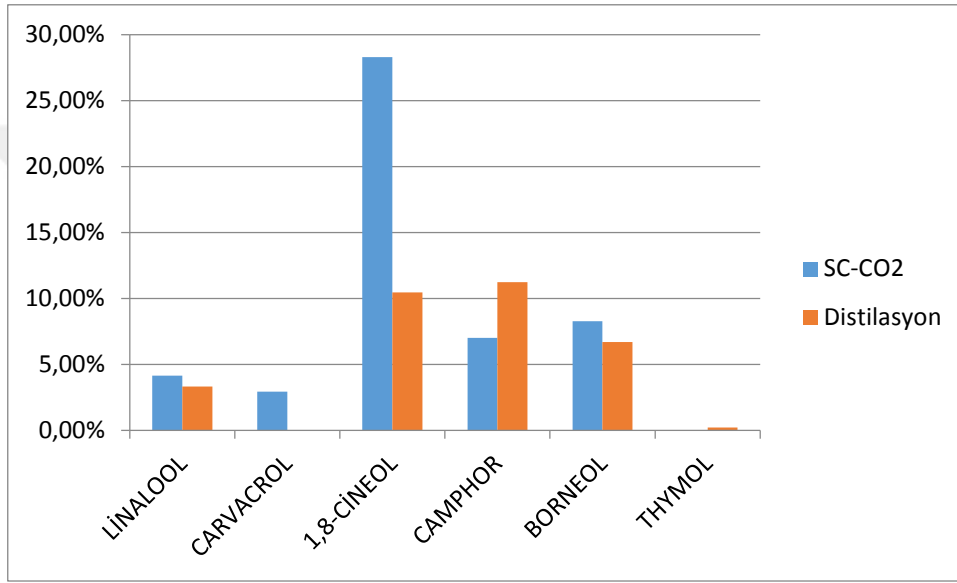
Çizelge 4.6 Biberiye bitkisi içeriklerinin elde edilış yöntemine göre farkları.

Biberiye	SC-CO ₂	Distilasyon
Linalool	%4,134	%3,331
Carvacrol	%2,942	_*
1,8-cineol	%28,291	%10,449
Alcanfor (camphor)	%7,011	%11,224

Çizelge 4. 6 (Devam) Biberiye bitkisi içeriklerinin elde edilış yöntemine göre farkları.

Biberiye	SC-CO ₂	Distilasyon
Borneol	%2,126	%1,626
Thymol	_*	%1,920

* Tespit edilemedi.



Şekil 4.2 Biberiye bitkisi içeriklerinin elde edilış yöntemine göre farkları.

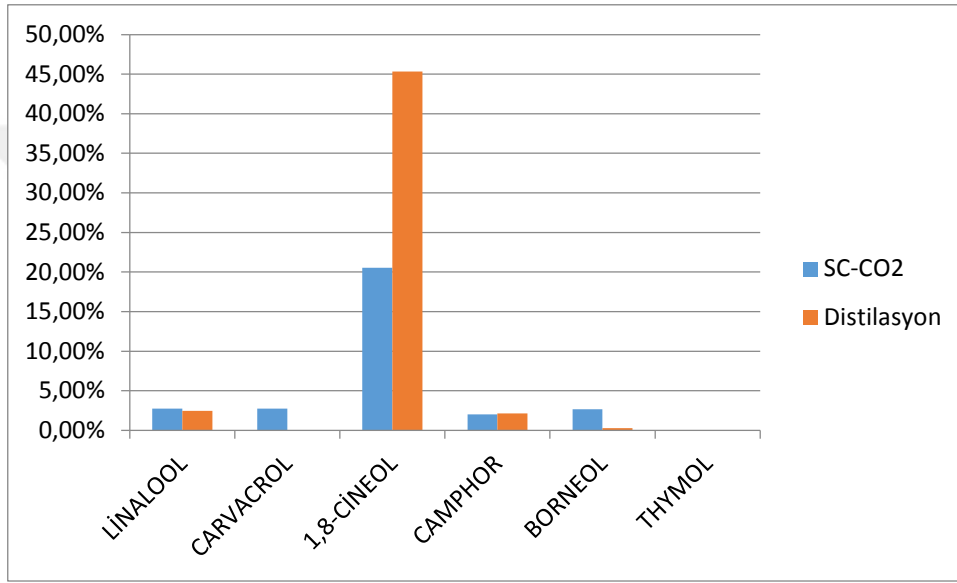
Çizelge 4.7 Defne bitkisi içeriklerinin elde edilış yöntemine göre farkları.

Defne	SC-CO ₂	Distilasyon
Linalool	%2,755	%2,475
Carvacrol	%2,742	_*
1,8-cineol	%20,536	%45,349
Alcanfor (camphor)	%2,009	%2,124

Çizelge 4.7 (Devam) Defne bitkisi içeriklerinin elde ediliş yöntemine göre farkları.

Defne	SC-CO ₂	Distilasyon
Borneol	%2,126	%1,626
Thymol	_*	%1,920

* Tespit edilemedi.



Şekil 4.3 Defne bitkisi içeriklerinin elde ediliş yöntemine göre farkları.

Süperkritik karbondioksit (SC-CO₂) ve distilasyon yöntemiyle elde edilen kekik, biberiye ve defne uçucu yağların kimyasal bileşimi Çizelge 4.1’ de verilmiştir. SC-CO₂ ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen kekik, biberiye ve defne uçucu yağlarında sırasıyla %14.565, %4.134 ve %2.755 linalool tespit edilirken, aynı bitki yağlarında sırasıyla %37.057, %2.942 ve % 2.742 karvakrol teşhis edilmiştir. Buna ilaveten, kekik biberiye ve defne uçucu yağlarının 1,8-sineol içerikleri %6.473, %28.291 ve %20.536 olarak tayin edilmiştir. Ayrıca, biberiye ve defne %7.011 ve %2.009 oranında kamfor içerirken, kekik uçucu yağında kamfor teşhis elde edilememiştir (Çizelge 4.2). Uçucu yağ örneklerinin borneol içerikleri %2.126 (kekik), %8.265 (biberiye) ve %2.667 (defne) olarak tayin edilmiştir (Çizelge 4.3). Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi, kekik uçucu yağın dominant bileşeni karvakrol iken, biberiye ve defne uçucu yağının ise 1,8-sineol olmuştur.

Distilasyon yöntemiyle elde edilen kekik, biberiye ve defne uçucu yağlarının kimyasal bileşimleri Çizelge 4.1’ de görülmektedir. Kekik uçucu yağı %3.589 linalool, %72.160 katvakrol, %1.626 borneol ve % 1.920 timol içerirken, biberiye uçucu yağı %3.331 linalool, %10.449 1,8-sineol, %11.224 kamfor, % 6.669 borneol ve %0.207 timol içermiştir. Buna ilaveten, distilasyon yöntemiyle elde edilen defne uçucu yağı %2.475 linalool, %45.349 1,8-sineol, % 2.124 kamfor ve %0.28 timol içermiştir (Çizelge 4.4). Porte ve Godoy (2008) *Thymus vulgaris* uçucu yağında %44.7 timol, %18.6 p-cymene ve %16.5 γ -terpinene tespit etmişlerdir. Özcan ve Chalchat (2008) distilasyon yöntemiyle elde ettikleri biberiye uçucu yağın temel bileşenlerini p-cymene (44.02%), linalool (20.5%), γ -terpinene (16.62%), timol (1.81%), β -pinene (3.61%), α -pinene (2.83%) ve eucalyptol (1,8-sineol) (2.64%) olarak tespit etmişlerdir. Bir kekik türü olan *O. saccatum*’un toprak üstü aksamlarından distilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağı başlıca temel bileşenler olarak p-cymene (82.8%), γ -terpinene (6.2%), p-cymene-8-ol (1.5%) ve carvacrol (1.2%) içermiştir (Özcan ve Chalchat, 2009). Özcan ve Chalchat (2004), kekik (*Thymus vulgaris* L.) uçucu yağının timol (% 46,2), α -terpinen (% 14,1), p-simen (% 9,9) α -pinenin (% 3,0) içerdiğini belirtmişlerdir. Sonuçlar literatürle kıyaslandığında bazı farklılıklar tespit edilmiştir. Bu farklılıkların muhtemel sebebi bitki türü, lokasyon, iklim şartları, ekstraksiyon tipi, ve bazı analitik şartlardan kaynaklanmış olabilir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kekik uçucu yağında 1,8-sineol ve kamfor teşhis edilemezken, defne uçucu yağında hem karvakrol hemde timol tayin edilememiştir. Ayrıca, biberiye yağında karvakrol belirlenememiştir. Distilasyon yöntemiyle elde edilen kekik, biberiye ve defne uçucu yağlarının dominant bileşenleri aynı olup sadece kantitatif değerlerinde farklılıklar gözlenmiştir. Kekik uçucu yağında dominant bileşen olarak %72.160 karvakrol tespit edilirken (Şekil 1), biberiye ve defne uçucu yağında ise sırasıyla %10.449 ve %45.349 1,8-sineol teşhis edilmiştir (Şekil 2 ve 3). Distilasyon yöntemiyle elde edilen kekik ve defne uçucu yağın karvakrol ve 1,8-sineol içeriği SC-CO₂ ekstraksiyon yöntemiyle elde edilene göre sırasıyla yüksek çıkarken, biberiyenin 1,8-sineol içeriği kısmen düşük çıkmıştır. SC-CO₂ ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen kekik ve biberiye uçucu yağlarının diğer bileşenleri distilasyon yöntemiyle elde edilene göre yüksek çıkmıştır. Aynı artış defne uçucu yağı içinde geçerlidir (kamfor hariç). Uygulanan ekstraksiyon yöntemlerine göre uçucu yağın kimyasal bileşimindeki farklılıklar, uygulanan basınç ve solvent saflığına, distilasyon tipi ve uygulanan sıcaklık süre ilişkisine, materyallerin hasat yılı, depolama şartları, öğütme sıcaklığı ve bitki türlerine bağlı olarak değişmiş olabilir. Dolayısıyla, dominant bileşenlerin fazlalığına göre uygulamada o ekstraksiyon yönteminin tercih edilmesinin daha iyi olabileceği düşünülmektedir. Süperkritik yöntem ve Distilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağların etken bileşenleri karşılaştırıldığında süperkritik yöntemle elde edilen bileşenlerin daha saf ve miktarının daha fazla olduğu görülmektedir. Zaten distilasyon yöntemi geleneksel bir yöntemdir ve fazla laboratuvar işlemi gerektirmemektedir. Süperkritik metod ise son zamanlarda uçucu yağ elde etmede oldukça popüler bir yöntemdir.

6. KAYNAKLAR

- Abak F, 2018, Şanlıurfa İli Lamiaceae (Ballıbabagiller) Familyasının Florası Bazı Taksonların Fitokimyasal Ve Etnobotanik Özellikleri, Doktora Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize.
- Akgün M, Söğüt O, 2008, Süperkritik Su Ortamında Tekstil Atık Sularının Arıtılması, Proje No: 104M214, 79s, Ankara.
- Baddal M K, 2010, Origanum Minutiflorum Bitkisinin Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 107s, Isparta.
- Belgüzar S, Yılar M. Yanar, Y Kadioğlu İ, Doğar G, 2016, Thymus vulgaris L. (Kekik) Ekstrakt ve Uçucu Yağının Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis Üzerine Antibakteriyal Etkisi, Turkish Journal of Weed Science, 19, 20-27.
- Büyükkız C, 2007, Süperkritik Karbondioksit İle Zeytinyağı Eldesi ve Biyofenolik İle Trigliserid Bileşimleri Açısından Konvansiyonel Teknolojilerle Elde Edilen Zeytinyağlar İle Kıyaslanması, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 105s, Adana.
- Cerit L S, 2008, Bazı Baharat Uçucu Yağlarının Antimikrobiyal Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Charles D, 2013, Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources, Springer Science Business Media, 610p, New York.
- Coşkun F, 2006, Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 2, 27-33.
- Coşkun F, 2010, Gıdalarda Kullanılan Bazı Baharat ve Baharat Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesi, Akademik Gıda Dergisi, 8, 41-46.
- Çelen S, 2011, Anadolu Çaprazına Özgü Dört Thymus L. (Lamiaceae) Türü Uçucu Yağının Kimyasal Bileşimleri, Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivite Özellikleri, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

- Çoban Ö E, Patır B, 2010, Antioksidan Etkili Bazı Bitki ve Baharatların Gıdalarda Kullanımı, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 5, 7-19.
- Çolak N, Tülek Y, 2003, Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu, 28, 313-320.
- Demirçivi B M, Altaş A, 2016, Üniversite Öğrencilerinin Baharatlara İlişkin Bilgileri ve Tüketim Tercihleri: Aksaray Üniversitesinde Bir Uygulama, Journal of Tourism and Gastronomy Studies, 4, 88-112.
- Dinçer S, Acaralı N B, Uzun İ, Deniz Ş, 2007, A Second Option In Special Separation Operations: Supercritical Fluid Processes, Journal Of Engineering And Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, 25, 106-128.
- Erdoğan E A, 2014, Lamiaceae Familyasına Ait Bazı Bitkilerin Uçucu Yağ içeriklerinin Belirlenmesi, Antimikrobiyal ve Antimutajenik Aktivitelerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Ergüt M, 2015, Portakal Ve Limon Posasındaki Fenolik Maddelerin Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 199s Mersin.
- Erkmen O, Özcan M M, 2008, Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms, J Med Food, 11, 587-592.
- Evren M, Tekgüler B, 2011, Uçucu Yağların Antimikrobiyel Özellikleri, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi), 9, 28-40.
- Guedes A C, Gião M S , Matias A A, Nunes A V M , Pintado M E, Duarte C M M, Malcata F X, 2013, Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophylls a, b and c, from a wild strain of *Scenedesmus obliquus* for use in food processing, 116, 478-482.
- Gül T, 2012 Farklı depolama süresi ve koşullarında Çemen (*trigonella foenum-graecum*), Kişniş (*coriandrum sativum*) ve Kekik (*thymus vulgaris*) uçucu yağlarının soya ve ayçiçeği tohum küspelerinin mikrobiyolojisi üzerine etkileri. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi 48s, Tekirdağ.

- Gölükçü M, Tokgöz H, Turgut D, 2017 Defne (*Laurus nobilis*) Uçucu Yağ Bileşimi Üzerine Distilasyon Süresinin Etkisi, Food And Health E-Issn: 2602-2834, 37-42.
- Koca İ, Bostancı Ş, Kafeinsiz Çay Üretimi, II. Rize Kalkınma Çay Sempozyumu, 2013, Rize, 12s.
- Kutlu N, Yeşilören G, İşci A, Şakıyan Ö, 2017, Konvansiyonel Ekstraksiyona Alternatif: Yeşil Teknolojiler, Gıda The Journal of Food Dergisi, 42, 514-526.
- Kutlular Ö, 2007, Bazı Adaçayı ve Kekik Türlerinin Uçucu Yağlarının Süper Isıtılmış Su İle Ekstraksiyonları ve GC-MS İle Karakterizasyonları, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 83s.
- Köse A, 1998, Kekik Yağının Yoğun Karbon Dioksit ile Ayrıştırılması, Boğaziçi Ü. Mühendislik Fakültesi-Yüksek Lisans Tezi, 164s, İstanbul.
- Özcan M M, J C Chalchat, 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. Bulg. J. Plant Physiol, 30, 68–73.
- Özcan M M, Chalchat J C 2008, Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. International Journal of Food Sciences and Nutrition 59, 691-698.
- Özcan M M, Chalchat J C, 2009, Chemical composition and antimicrobial properties of the essential oil of *Origanum saccatum* L., Journal of Food Safety, 29, 617-628.
- Öztaş E, Galip F, Murathan A, 2011, Süperkritik Akışkan Özütlemeyle Böğürtlen (Rubus Fruticosus) Doğal Antioksidan Tespiti, Gazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakülte Dergisi, 26, 801-805.
- Peter K V, 2000, Handbook of Herbs and Spices, Woodhead Publishing Limited, Volume 1, 319p, Abington.
- Peter K V, 2004, Handbook of Herbs and Spices, Woodhead Publishing Limited Volume 2, 366p, Abington.
- Pol I E, Smid E J, 1999, Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol, 29, 166-170.
- Porte A, Godoy R L O, 2008, Chemical composition of *Thymus vulgaris* L. (thyme)

- essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). J. Serb. Chem. Soc. 73, 307–310.
- Putra N R, Aziz A H A, Idham Z, Ruslan M S H, Yunus M A C, 2018, Diffusivity optimization of supercritical carbon dioxide extraction with co-solvent-ethanol from peanut skin, Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences, 14, 9-14.
- Sağdıç O, Özcan M, 2003, Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols, Food Control, 14, 141–143.
- Sağdıç O, Özkan G, Aksoy A, Yetim H, 2009, Bioactivities of essential oil and extract of *Thymus argaeus*, Turkish endemic wild thyme. Journal of Science Food Agriculture, 89, 791-795.
- Sağır Z Ö, 2016, Türkiye’ de Yetişen Endemik *Sideritis L.* Türlerinin (*Sideritis Pisdica* Boiss. Et Heldr. Apud Benth, S. Phrygia Bornm., S. Brevibracteata P.H. Davis) Fitokimyasal Analizleri, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Seaberg A C, Labbe R G, Shetty K, 2003, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Elite Clonal Extracts of Oregano (*Origanum vulgare*) Food Biotechnology, 17, 129–149.
- Shetty K. Labbe R G, 1998, Foodborne pathogens, health and role of dietary phytochemicals. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 7, 270–276.
- Şeker İ T, Hastaoğlu E, Saraç, G M, 2020, Farklı Aromatik Bitkilerle Marine Edilip Vakumlanarak Saklanan Dana Etlerinin Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Türk Turizm Araştırmaları Dergisi, 4, 2087-2101.
- Şimşek Ü G, Dalkılıç B, Ertaş O N, Güler T, Çiftçi M, 2005, Rasyona İlave Edilen Antibiyotik ve Kekik Yağının Etlik Piliçlerde Canlı Ağırlık, Karkas ve Etlerin Duyusal Özellikleri Üzerine Etkisi, Hayvancılık Araştırma Dergisi, 15, 9–15.
- Şengün İ Y, Öztürk B, 2018, Bitkisel Kaynaklı Bazı Doğal Antimikrobiyaller, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, C- Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji, 7, 256-276.

- Tural S, Turhan S, 2017, Antimicrobial and antioxidant properties of thyme (*Thymus vulgaris* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and laurel (*Lauris nobilis* L.) essential oils and their mixtures. *Gıda The Journal Of Food*, 42, 588-596.
- Ünal A, Kocabağlı N, 2014, Kekik Uçucu Yağının Ruminant Beslemede Kullanımı, *İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, 40, 121-130.
- Yaylı N, 2013, Uçucu Yağlar ve Tıbbi Kullanımları, 1. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi, Standardizasyonu Kongresi, Kimyagerler Derneği, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 29-31 Mart, 1-8.

İnternet Kaynakları

- 1) <http://www.aku.edu.tr>, 01.06.2020
- 2) <http://fenbil.aku.edu.tr>, 04.03.2020
- 3) <http://fenbildergi.aku.edu.tr>, 01.01.2020
- 4) <http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF679A66406202CCB01A2ABCEEAAF365E0>, 01.05.2020
- 5) <https://www.kulturportali.gov.tr/turkiye/hatay/kulturatlasi/defne-apollon-efsanesi>, 14.12.2020
- 6) <https://www.researchgate.net/publication/32519582>, 17.05.2020