

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISIL İŞLEM GÖRMÜŞ VE DOĞAL *ORNITHOGALUM UMBELLATUM*
EKSTRAKTLARININ FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE MULTI-
BİYOLOJİK FONKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : Aytül UZUN AKGEYİK

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : .../09/2023

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Emine YALÇIN

Ağustos 2023
GİRESUN

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISIL İŞLEM GÖRMÜŞ VE DOĞAL *ORNITHOGALUM UMBELLATUM*
EKSTRAKTLARININ FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE MULTI-
BİYOLOJİK FONKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Aytül UZUN AKGEYİK

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 29/08/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.
Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
Jüri Başkanı

Prof. Dr.
Emine YALÇIN
Üye

Prof. Dr.
Kürşad YAPAR
Üye

Doç. Dr.
Dilek ÇAVUŞOĞLU
Üye

Dr. Öğretim Üyesi
Fatih KUTLUER
Üye

Prof. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Aytül UZUN AKGEYİK

29/08/2023

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince gerekli tüm bilgi ve becerileri kazanmamda engin bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra manevi desteğini de eksik etmeyen, Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Emine YALÇIN'a; eğitimim süresince yapmış olduğum bilimsel çalışmalarında, tez çalışmamın her aşamasında eğitim alanındaki ve bilimsel alandaki kıymetli birikimlerini büyük bir fedakarlık ile paylaşan, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU'na teşekkür ederim. Çalışmalarım esnasında FTIR analizlerindeki desteğinden dolayı değerli hocam Dr.Öğr. Üyesi İbrahim Evren KIBRIZ'a, ICP-MS çalışmalarımı beraber yürüttüğüm Öğr.Gör.Dr. Emrah AKGEYİK'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLOLAR LİSTESİ.....	VI
ÖZET.....	VII
SUMMARY	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Isıl işlemin polifenoller üzerine etkisi	5
2.2. Isıl işlemin flavonoidler üzerine etkisi	7
2.3. Isıl işlemin karotenoidler üzerine etkisi	9
2.4. Isıl İşlemin biyolojik aktivite üzerine etkisi	10
2.5. <i>Ornigathalum umbellatum</i> L.....	13
2.6. Çalışmanın amacı	14
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1. Ekstraksiyon	15
3.2. İleri fitokimyasal analizler	17
3.2.1. LC-MS/MS analizi	18
3.2.2. ICP-MS analizi	18
3.2.3. FTIR analizi	19
3.3. Biyolojik aktivite	19
3.3.1. Anti-bakteriyel ve anti-fungal aktivite	20
3.3.2. Anti-proliferatif aktivite	20

3.3.3. Anti-mutajenik aktivite	21
3.3.4. MI ve KA preparatlarının hazırlanması	22
3.4. İstatiksel analiz	22
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	23
4.1. Ekstraksiyon verimliliği	23
4.2. ileri fitokimyasal analizler	24
4.2.1. LC-MS/MS analizi	24
4.2.2. ICP-MS analizi	28
4.2.3. FTIR analizi	32
4.3. biyolojik aktivite	34
4.3.1. Anti-bakteriyel ve anti-fungal aktivite	34
4.3.2. Anti-mutajenik aktivite	38
4.3.3. Anti-proliferatif aktivite	40
BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	44
EKLER	51
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

EV	: Ekstraksiyon verimliliği
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
ICP-MS	: İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi
KA	: Kromozomal anormallik
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi
MI	: Mitotik indeks
MN	: Mikronukleus
TFİ	: Total fenolik içerik

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Polifenolik bileşiklerin reaksiyonları ve fonksiyonları.....	6
Şekil 2.2. Flavonoidlerin ısı uygulaması sonucunda degradasyonu.....	8
Şekil 2.3. Isı maruziyetinde karoten degradasyonu sonucu oluşan bileşikler	10
Şekil 2.4. Uçucu yağların ısı maruziyetinde uğradığı reaksiyonlar	13
Şekil 3.1. <i>O. umbellatum</i> yapraklarının kurutulması, toz haline getirilmesi ve ısı işlem uygulanması.....	16
Şekil 3.2. Deneysel analizler ve incelenen parametreler.	17
Şekil 3.3. ICP-MS analizinde kullanılan koşullar ve cihazlar	19
Şekil 4.1. Farklı çözücülerle elde edilen ekstraksiyon verimliliği (EV) ve Total fenolik içerik (TFİ).....	24
Şekil 4.2. <i>O. umbellatum</i> ekstraktının LC-MS/MS analizine ait kromatogramlar.....	26
Şekil 4.3. Isıl işlem uygulaması sonrasında makro ve mikroelement düzeylerindeki azalma (%)	31
Şekil 4.4. FTIR analizleri.....	33
Şekil 4.5. Ham ve ısı işlem görmüş (İş-eks) ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi..	37
Şekil 4.6. NaN ₃ tarafından indüklenen MN ve kromozomal anormallikler.....	38
Şekil 4.7. Isıl işlemin anti-mutajenik aktivite üzerine etkisi.....	40

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1.	LC/MS analiz koşulları.....	18
Tablo 4.1.	Ham ve ısıtıl işlem görmüş ekstraktlarda fenolik madde dağılımı.....	27
Tablo 4.2.	Ham ve ısıtıl işlem görmüş <i>O. umbellatum</i> ekstraktlarının element düzeyleri	29
Tablo 4.3.	Haşlama suyu element düzeyi.....	31
Tablo 4.4.	Makromoleküllerin dalga boyları ve absorpsiyon bantları	32
Tablo 4.5.	<i>O. umbellatum</i> ekstraktının oluşturduğu inhibisyon zonları (mm).....	36
Tablo 4.6.	NaN ₃ tarafından indüklenen MN ve kromozomal hasar sıklığı üzerine doğal ve işlem görmüş ekstraktların etkisi.....	39
Tablo 4.7.	Ham ve ısıtıl işlem görmüş <i>O. umbellatum</i> ekstraktlarının anti-proliferatif aktivitesi	41

ISIL İŞLEM GÖRMÜŞ VE DOĞAL *ORNITHOGALUM UMBELLATUM* EKSTRAKTLARININ FİTOKİMYASAL İÇERİĞİNİN VE MULTİ-BİYOLOJİK FONKSİYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Bu çalışmada, Karadeniz bölgesinde yaygın olarak tüketilen *Ornithogalum umbellatum* L.'nin ham ve ısıtılmış ekstraktlarının fitokimyasal parmak izi ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Bitkinin besin olarak tüketilen soğan ve yaprak kısımları 35°C'de etüvde kurutulduktan sonra öğütülerek toz haline getirilmiştir. Isıl işlem için bitki 100°C'de 20 dakika kaynatılmıştır. Ham ve ısıtılmış ekstraktların fitokimyasal içeriklerindeki farklılıklar ICP-MS, LC-MS/MS ve FTIR analizi ile belirlenmiştir. Biyolojik aktivite, anti-mikrobiyal, anti-mutajenik ve anti-proliferatif aktivite testleri ile araştırılmıştır. *O. umbellatum* ekstraktının hem fitokimyasal içeriği hem de biyolojik aktivitesi üzerine ısıtılmanın etkisi araştırılmıştır. *O. umbellatum* ekstraktında major bileşikler olarak gallik asit, prokateuik asit ve kafeik asit bulunurken, minör oranlarda prokateuik aldehit, vanilin ve kaempferolün varlığı belirlenmiştir. Isıl işlem sonrası fenolik bileşik düzeylerinde önemli bir azalma olmuş ve gallik asit içeriği %92,6, prokateuik asit içeriği %90 ve kafeik asit içeriği %84,8 oranında azalmıştır. ICP-MS sonuçlarında ısıtılmış işlem sonrası makro ve mikro element düzeylerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Ekstraktın Cd, Ca, Ba, Cu ve Zn seviyeleri artarken; Na, Mg, K, Fe, U, Co seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır. Ekstraktın güçlü anti-mikrobiyal aktivitesinin ısı uygulaması sonrasında azaldığı tespit edilmiştir. Isı uygulaması sonrasında anti-mutajenik ve anti-proliferatif aktivitelerde de önemli azalmalar ve bazı kromozomal anormalliklere karşı aktivite kaybı gözlenmiştir. Ham ekstrakt, eşit olmayan kromatin dağılımına karşı %69,8 ile en güçlü anti-mutajenik etkiyi göstermiştir. Benzer şekilde köprüleri %56,1 oranında azaltan ekstraktın anti-mutajenik aktivitesi ısıtılmış işlem sonrası %0,74'e düşmüş ve anti-mutajenik aktivitesini kaybetmiştir. Doğal *O. umbellatum*'un biyolojik aktiviteleri, içerdiği majör bileşiklerle yakından ilişkilidir ve ısının etkisiyle bu bileşiklerin düzeylerindeki azalma aktiviteye de yansımıştır. Bitkilerin fitokimyasal içeriklerini araştırılan çalışmalar çok önemlidir. Fitokimyasal içerikle ilgili biyolojik aktiviteleri araştırılan çalışmalar daha dikkat çekicidir. Bu çalışmada bölgemizde gıda olarak tüketilen *O. umbellatum*'un fitokimyasal parmak izi belirlenmiş, biyolojik aktiviteleri içerdiği bileşiklerle ilişkilendirilmiş ve biyolojik aktivitenin ısıya duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Ornithogalum umbellatum*, fitokimyasal, LC-MS/MS, ICP-MS, FTIR, biyoaktivite

INVESTIGATION OF PHYTOCHEMICAL INGREDIENT AND MULTI-BIOLOGICAL FUNCTIONS OF HEAT-TREATED AND RAW *ORNITHOGALUM UMBELLATUM* EXTRACTS

SUMMARY

In this study, the phytochemical fingerprint and biological activities of raw and heat-treated extracts of *Ornithogalum umbellatum* L., which is widely consumed in the Black Sea region, were investigated. The bulb and leaf parts of the plant consumed as food were dried in an oven at 35°C and then ground into powder. For heat treatment, the plant was boiled at 100°C for 20 min. Differences in phytochemical contents of raw and heat-treated extracts were determined by ICP-MS, LC-MS/MS and FTIR analysis. Biological efficacy was investigated with anti-microbial, anti-mutagenic and anti-proliferative activity tests. In this way, the effect of heat treatment on both the phytochemical content and biological activity of the *O. umbellatum* extract was determined. Gallic acid, procateuic acid and caffeic acid were found as the main compounds in the *O. umbellatum* extract, while the presence of procateuic aldehyde, vanillin and kaempferol in minor proportions was determined. There was a significant decrease in phenolic compound levels after heat treatment and gallic acid content decreased by 92,6%, procateuic acid content by 90% and caffeic acid content by 84,8%. Significant differences were detected in macro and micro element levels after heat treatment in ICP-MS results. While Cd, Ca, Ba, Cu and Zn levels of the raw extract increased; Na, Mg, K, Fe, U, Co levels decreased significantly. The strong anti-microbial activity of extract decreased with the application of boiling. A significant decrease in anti-mutagenic and anti-proliferative activities and loss of activity against some chromosomal abnormalities were determined after boiling. The raw extract showed the strongest anti-mutagenic effect with 69,8% against the unequal distribution of chromatin. Similarly, the anti-mutagenic activity of the extract, which reduced the bridges by 56,1%, decreased to 0,74% after heat treatment and almost lost its anti-mutagenic activity. The biological activities of raw *O. umbellatum* are closely related to the major compounds it contains, and the decrease in the levels of these compounds with the effect of heat was reflected in the activity. Studies investigating the phytochemical contents of plants are very important. Studies investigating biological activities related to phytochemical content are more remarkable. In this study, the phytochemical fingerprint of *O. umbellatum*, which is consumed as food in our region, was determined, its biological activities were associated with the compounds it contained, and it was determined that the biological activity was heat sensitive.

Keywords: *Ornithogalum umbellatum*, phytochemical, LC-MS/MS, ICP-MS, FTIR, bioactivity

BÖLÜM 1.GİRİŞ

Ornithogalum (Hyacinthaceae, Ornithogaloideae) 200'den fazla türe sahiptir ve farklı iklim koşullarında yetişebilmektedir. *Ornithogalum* cinsine ait türler anatomik, morfolojik, ekolojik ve karyolojik açıdan da farklılık gösterebilmektedir. Bu cinse ait *Ornithogalum umbellatum* L., Carl Linnaeus tarafından tanımlanan önemli bir türdür. Dünyada ve ülkemizde *O. umbellatum* 'un yaprak, gövde ve kök gibi kısımları besin olarak tüketilmektedir. *Ornithogalum* türleri pek çok biyolojik aktiviteye sahiptir ve bu etkileri içerdiği aktif bileşenlerle yakından ilişkilidir. *O. umbellatum* türlerinin fitokimyasal içeriğinde gallik asit, sinnamik asit, klorojenik asit gibi fenolik bileşikler ile rutin, kuersetin, epikateşin gibi flavonoidler yer almaktadır. Yayılış gösterdiği ortama ve maruz kaldığı stres koşullarına göre *O. umbellatum* türlerinin fitokimyasal içeriği de değişkenlik göstermektedir. Düşük ışık yoğunluğu ve nitrojen seviyesine sahip orman habitatında yüksek fenolik madde üretimi, asitli topraklarda ve nemli ortamlarda ise yüksek oranda flavonoid üretimi gerçekleştirmektedir. Fitokimyasal içerikte saptanan bu farklılıklar *Ornithogalum* türlerinin buldukları ortama adaptasyonu süresince ürettiği sekonder metabolitlerdeki değişimlerden kaynaklanmaktadır. Bitkilerin sergilediği pek çok biyolojik aktivite sekonder metabolitlerin etkisi ile ortaya çıkmaktadır (Akgeyik ve ark., 2021; Petrovska, 2012). Sekonder metabolitler pigmentasyon ve ışık tutma (antosiyantinler, likopen), zararlılara ve hastalıklara karşı savunma (glukozinolatlar), ultraviyole ışığın neden olduğu oksidatif stresin önlenmesi (karotenoidler, antosiyantinler, flavonoller) dahil olmak üzere pek çok fonksiyona sahiptir. Sekonder metabolit içeren meyve ve sebzelerden zengin diyet özellikle kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve tip 2 diyabet gibi kronik hastalık riskinin azalmasını sağlamaktadır. Hastalık riskini azaltıcı etkileri sekonder metabolitlerin insanlarda detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu, bağışıklık sisteminin uyarılması, trombosit agregasyonunun azaltılması, lipid ve hormon metabolizmasının modülasyonu, anti-oksidan, anti-

bakteriyel, anti-mutajen ve anti-anjiyogenik etkiler, tümör başlangıcının azaltılması gibi tamamlayıcı ve pleiotropik mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Sekonder metabolitlerce zengin pek çok bitki hem besin olarak tüketilmekte hem de pek çok hastalığa karşı koruma amacıyla günlük diyeteye eklenmektedir (Lampe, 1999; Palermo ve ark., 2014).

Besin olarak tüketilen pek çok bitki çeşitli pişirme işlemlerine tabii tutularak tüketilmektedir. Gıdaların ısıtılma işlemine tabii tutulması biyolojik, fiziksel ve dokusal değişikliklere neden olmaktadır. Pişirme işlemi mikroorganizmaları yok ederek ve anti-beslenme faktörlerini etkisiz hale getirerek gıda güvenliği yanında sindirilebilirliği ve biyoyararlanımı da arttırmaktadır. Pişirme işleminin yararlı etkileri yanında, besin kalitesinin azalması, kimyasal reaksiyonlar sonucunda besin kaybı, akrilamid gibi istenmeyen bileşiklerin oluşumu, doku ve renk kaybı gibi zararlı etkileri de olabilmektedir (Van boekel ve ark., 2003). Son yıllarda gerçekleştirilen pek çok çalışmada besin olarak tüketilen bitkilerin kimyasal bileşimleri üzerine pişirmenin farklı etkileri olduğu bildirilmiştir. Özellikle pişirme sırasında uygulanan ısıtılma işlemi fitokimyasallar yapısında ciddi değişimlere neden olmaktadır. Bu değişimler bitkinin içerdiği aktif bileşenlerin kompozisyonuna, fitokimyasalın moleküler yapısına, ısıtılma işlemi şekline ve süresine göre değişmektedir (Palermo ve ark., 2014). Isıtılma işlemi sonucu bitkisel ürünlerde piroliz, maillard reaksiyonu veya karbonhidrat karamelizasyonu gibi çeşitli reaksiyonlara bağlı olarak fitokimyasal içerikte değişim gözlenmektedir. Özellikle fenolik bileşiklerin miktarında azalma ve kimyasal bağlarda kırılma sonucunda ara ürünlerin oluşması bu değişimlerdenidir. Yüksek moleküler ağırlıklı polifenollerin kimyasal bağlarının kırılması sonucu daha düşük moleküler ağırlıklı polifenoller oluşabilmektedir. Isıtılma uygulaması ile ekstraktlarda bulunan 3-p-kumaroilkinik asitteki bağların kırılmasıyla kinik asidin ortaya çıkması bu değişime bir örnektir. Bazı durumlarda bitkisel ekstrakttaki fenolik bileşiklerin ısı etkisi ile birbirine dönüşümü de gerçekleşebilmektedir. 5-O-caffeoylquinic asidin ısı etkisi ile 4-O-caffeoylquinic aside dönüşümü bu değişimin bir örneğidir (Maghsoudlou ve ark., 2019). Literatürde ısıtılma işlemi uygulamalarının fenolik içerikte azalmaya ve buna bağlı olarak bitkinin antioksidan kapasitesinde ve radikal giderme özelliklerinde gerilemeye neden olduğu

rapor edilmektedir (Abacan ve ark., 2017). Bazı çalışmalarda ise ısı işlem sonrasında oluşan yeni fenolik bileşiklerin etkisiyle antioksidan aktivitede artış gözlemlendiği rapor edilmektedir (Maghsoudlou ve ark., 2019). Literatür çalışmalarında gözlenen bu farklılıklar ısı etkisi ile ortaya çıkan yeni bileşiklerdeki ve bu bileşiklerin aktivitesindeki değişiklikler ile açıklanabilir.

Literatürde bitkisel ekstraktların fitokimyasal içeriğinin ve biyolojik fonksiyonlarının araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Dünyadaki ve Türkiye'deki zengin bitki çeşitliliği bu çalışmaları yetersiz kılmaktadır. Bir bitki türünün farklı iklim koşullarında ve stres altında ürettiği sekonder metabolitler değişkenlik göstermektedir ve bu durum farklı bölgelerden toplanan aynı türe ait bitki örneklerinin fitokimyasal ve biyolojik aktivite bakımından da farklılık göstermesine neden olmaktadır (Durhan ve ark., 2022). Besin olarak tüketilen bitkilerle gerçekleştirilen fitokimyasal analize dayalı çalışmalarda genellikle bitkinin ham hali kullanılmaktadır. Diyetle tüketilen pek çok bitkisel besin pişirme işlemlerine tabii tutulmakta ve uygulanan ısı işlem fitokimyasal içerikte değişime neden olmaktadır. Bu değişim biyolojik aktiviteye de yansımaktadır. Bu çalışmada literatürdeki bu eksiklikler göz önünde bulundurularak Karadeniz bölgesinde özellikle Giresun'da, Sakarca olarak bilinen ve soğanları ile toprak üstü kısımları pişirilerek gıda olarak tüketilen *Ornithogalum umbellatum*'un ham ve ısı işlem uygulanmış ekstraktlarının fitokimyasal içeriği ve çeşitli biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Isıl işlem uygulaması sonrasında kimyasal içerikte belirlenen değişikliklerin biyolojik aktivite üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. Ham ve ısı işlem uygulanmış *O. umbellatum* ekstraktlarının fitokimyasal analizi makro ve mikro element düzeyleri, makromoleküllerdeki biyokimyasal fonksiyonel gruplar ve fenolik bileşikler tespit edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda ileri kimyasal teknikler kullanılarak *O. umbellatum*'un kimyasal parmak izi oluşturulmuş ve ısı işlemin içerikte yarattığı değişimler tespit edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ham ve ısı işlem uygulanmış ekstraktların biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Bu amaçla ekstraktların anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-mutajenik, anti-proliferatif etkileri araştırılmış ve ısı işlemin bu aktiviteler üzerine etkisi de tespit edilmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bitkisel besinler insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir ve diyetle tüketilen sebzelelerinin çoğu, farklı pişirme işlemlerinden sonra tüketilmektedir. Pişirme sırasında mikrodalgada ısıtma, kızartma, buharda pişirme, fırınlama ve kavurma gibi çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Tüm bu yöntemlerde gıdalar ısıtma işlemi tabii tutulmakta ve ısıtmanın etkisi ile biyolojik, fiziksel ve kimyasal ve dokusal değişiklikler meydana gelmektedir. Isıtma işlemi uygulaması gıdaların mikroorganizmalardan arındırılmasını ve anti-beslenme faktörlerinin etkisiz hale getirilmesini sağlayarak gıda güvenliğini arttırmaktadır. Ayrıca ısıtma etkisi ile yiyeceklerin sindirilebilirliği ve besinlerin biyoyararlanımını da arttırmaktadır. Bu avantajların yanında ısıtma işlemi uygulamasının çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır. Gıda kalitesinde ve besleyici özelliğindeki azalma en önemli dezavantajlardandır. Akrilamid gibi yan ürünlerin oluşumu, doku kaybı ve renk değişimi de ısıtma işleminin yarattığı diğer olumsuzluklardır (Van Boekel ve ark., 2003; Palermo ve ark., 2014).

Fitokimyasallar ısıtma işlemi uygulaması sonucunda yapısal değişikliğe uğrayan önemli bitkisel metabolitlerdir. Bitkisel gıdalarda doğal olarak oluşan; bitkilere koku, renk, aroma ve strese karşı dayanıklılık özellikleri sağlayan fitokimyasalların besleyici özelliği bulunmamaktadır. Bununla birlikte fonksiyonel gıda olarak değerlendirilmekte ve pek çok biyolojik aktivite sergilemektedirler. Bu bileşikler, detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu, bağışıklık sisteminin uyarılması, trombosit agregasyonunun azaltılması, lipid ve hormon metabolizmasının modülasyonu, anti-oksidan, anti-bakteriyel, anti-mutajen ve anti-anjiyogenik etkiler, tümör başlangıcının azaltılması ve apoptozun indüklenmesi gibi farklı aktivitelere sahiptir. Gıdaların ısıtma işlemi uygulanarak pişirilmesi sırasında fitokimyasalların yapısında kimyasal değişiklikler ve buna bağlı olarak biyolojik fonksiyonlarında artış ya da azalmalar gözlenmektedir. Tüm bu değişimler fitokimyasalın yapısına ve

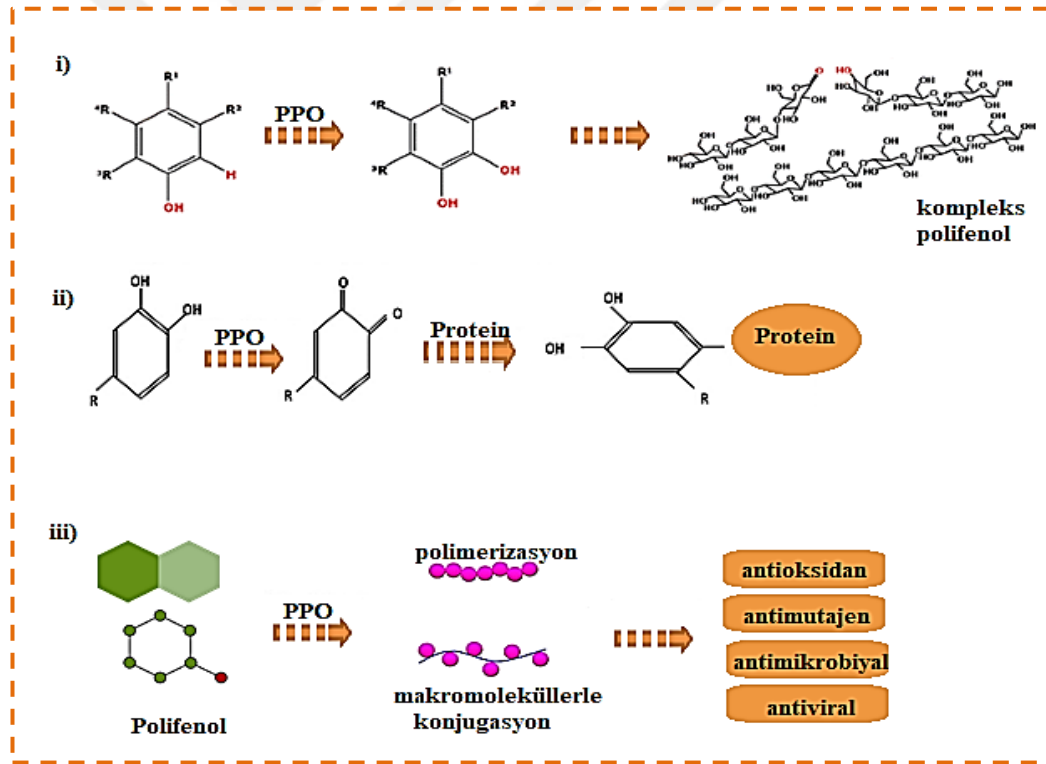
uygulanan ısıl işlemin türüne bağlı olarak değişmektedir. (Lampe, 1999; Palermo ve ark., 2014).

2.1. Isıl İşlemin Polifenoller Üzerine Etkisi

Bitkisel besinler yoğun miktarda fenolik bileşikler içermektedir ve bu nedenle bu bileşikler günlük diyetle bol bulunan bir fitokimyasallar grubudur. Kimyasal yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılabilen polifenoller fenolik asitler, stilbenler, lignanlar ve flavonoidler gibi başlıca gruplar içermektedir. Bitkisel gıdanın polifenolik bileşimi türlere göre hem nitelik hem de nicelik açısından değişkenlik göstermektedir. Bazı polifenoller yaygın olarak pek çok türde bulunabilirken, bazı gruplar belirli familyalar veya türlerle sınırlıdır. Bitkilerde fenolik bileşikler serbest formlarda olduğu kadar makromoleküllerle kovalent olarak bağlı veya hücre duvarı bileşenlerinde paketlenmiş halde de bulunabilmektedir. (Ross ve Kasum, 2002; Manach ve ark., 2004).

Gıdaların ısıl işleme tabii tutulması polifenollerin yapısında ve miktarında değişime neden olabilmektedir. Bazı literatür çalışmaları ısıl işleminin fenolik içerikte artışa neden olduğunu rapor ederken (Faller ve Fialho, 2009), bazı çalışmalarda azalma olduğu rapor edilmiştir (Manzocco ve ark., 2000). Isıl işlem sonrasında polifenollerin değişimi temel olarak üç mekanizma ile ilişkilendirilmektedir. Bu mekanizmalar fenollerin oksidatif bozunması (enzimatik esmerleşme gibi), konjugat formlardan serbest hale dönüşüm ve protein, tanen yada antosiyanin gibi bileşiklerle kompleks oluşumudur. Isıl işlem uygulaması ile oluşan reaksiyonun türü fenolik bileşiklerin düzeyindeki değişimi de belirlemektedir. Bu değişim sonrasında polifenol içeriğinde azalma ya da artışlar gözlenmektedir (Palermo ve ark., 2014). Genel olarak bitkisel besinlerde yüksek basınçlı kaynatma sonrasında fenolik içerikte genel bir artış rapor edilmektedir. Bu bulgular fenolik bileşiklerin proteinlerden ve hücre duvarı yapılarından ayrılarak serbest hale geçmesi ve polifenol oksidazların (PFO) inhibisyonu ile açıklanmaktadır (Stewart ve ark., 2000; Wachtel-Galor ve ark., 2008). PFO enzimi serbest fenolik bileşiklerin polimerizasyonunu katalize ederek, monomerlerin polimerleşmesini sağlarlar (Şekil 2.1i). Enzim aktivitesi sonucunda

oluşan kompleks yapı monomerlerden daha yüksek antioksidan kapasite sergilemektedir. Literatürde ferulik asitten üretilen kompleks polimerlerin monomerik yapıdan 15 kat daha fazla antioksidan kapasite sergilediği rapor edilmektedir (Mundo ve ark., 2016). PFO enzimleri polifenollerin protein gibi makromoleküllerle konjugasyonunu da katalize edebilmektedir (Şekil 2.1ii). Oluşan polifenol-protein kompleksleri pek çok özellik bakımından yüksek aktivite sergilemektedir (Sun ve ark., 2022). Hem polimerizasyon hem de konjugasyon reaksiyonları polifenollerin anti-oksidan, anti-mutajenik ve anti-mikrobiyal gibi özelliklerinin iyileşmesini sağlamaktadır (Şekil 2.1iii.). Isıl işlem sonrasında PFO enziminin denatürasyonu, bu reaksiyonların ve reaksiyonlar sonucunda güçlenen biyolojik aktivitenin de inhibisyonuna neden olarak besin kalitesinde azalmaya yol açabilir.



Şekil 2.1. Polifenolik bileşiklerin reaksiyonları ve fonksiyonları. PPO: polifenol oksidaz

Isıl işlem uygulaması polifenollerin dağılımında da değişikliğe yol açmaktadır. Kompleks polifenollerin parçalanması yeni ve düşük moleküler ağırlıklı yapıların oluşmasına neden olabilir. Isı etkisiyle ferulik asidin bir öncüsü olan kafeik asidin

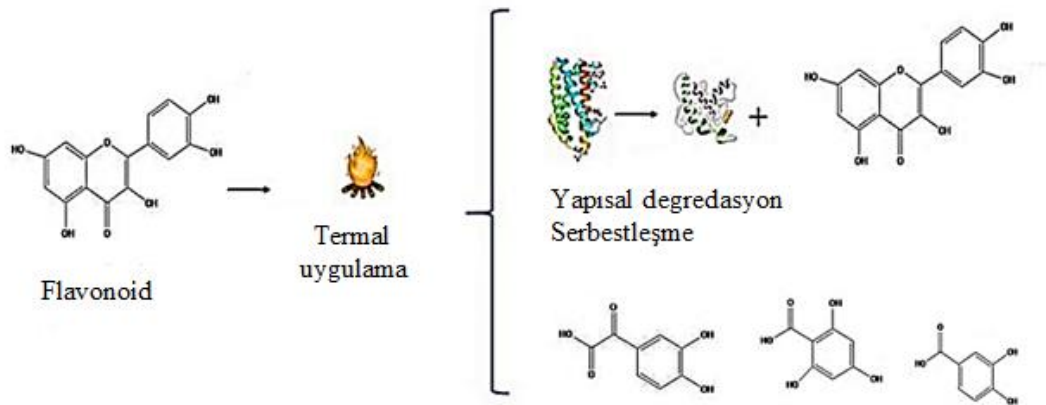
bozunması sonucunda rezene yağındaki ferulik asit miktarının artması polifenollerin dağılımında oluşan değişikliğe önemli bir örnektir (Rawson ve ark., 2013).

2.2. Isıl İşlemin Flavonoidler Üzerine Etkisi

Flavonoidler, bitki polifenollerinin en yaygın grubudur, renk ve lezzetin oluşması için de öncü moleküllerdir. Flavonoidler kimyasal yapılarına göre farklı gruplara ayrılmaktadır ve flavonlar, flavonoller, flavanonlar, kateşinler, antosiyanidinler ve izoflavonlar önemli alt sınıflardandır. Flavonoidler önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir ve anti-alerjik, anti-viral, anti-inflamatuar ve vazodilatör etkiler bu aktivitelerin başında gelmektedir. Flavonoidlerin en bilinen etkisi serbest radikal oluşumunu azaltma ve serbest radikalleri temizleme yeteneklerinden dolayı anti-oksidan aktiviteleridir. Bunun dışında prokarsinojenlerin üretiminden sorumlu olan belirli P₄₅₀ izozimlerinin aktivitelerini inhibe ederek anti-kanserojenik aktivite de sergilemektedirler. Karsinojenlerin detoksifikasyonunda görev alan metabolize edici enzimlerin indüklenmesini sağlayan flavonoidler pek çok farklı mekanizma ile kanserojenik etkileri inhibe etmektedir (Panche ve ark., 2016).

Aynı gruba ait flavonoid bileşikler, hidroksilasyon derecesi ve konumu gibi yapısal değişikliklere bağlı olarak farklı özellikler sergilemektedir. Yapıdaki bu farklılıklar, ısıl işleme karşı kararlılıklarında da önemli bir yere sahiptir. Glikozillenmiş flavonoidler, ısıl işleme karşı aglikon flavonoidlere göre daha dirençlidir. Flavonoidlerin çoğu doğada glikozitler ve diğer konjugatlar olarak bulunur ve çoğunluğu ısıya duyarlı bileşiklerdir. Bu nedenle, pişirme sırasındaki ısı maruziyeti yapılarında değişikliğe yol açmaktadır (Zhang ve ark., 2011; Perla ve ark., 2012). Pişirme esnasında bitkisel dokuda flavonoid kaybı oluşmakta ve bu durum çoğunlukla pişirme suyuna geçiş yoluyla meydana gelmektedir. Flavonoid glikozitler ısıl işlemde glukuronil türevlere kıyasla daha az etkilenmekte ve bitkisel dokudan ayrılarak pişirme suyuna geçmektedirler. Bu durum glukuronoidlerin sudaki yüksek çözünürlüğü ve dokudan suya hızlı geçişi ile açıklanabilir (Palermo ve ark., 2014). Antosiyaninler, çok sayıda meyve, sebze, tahıl ve çiçeklerin renklerinden sorumlu suda çözünür flavonoidlerin bir alt sınıfını temsil etmektedir. Bitkilerde tozlaşmada,

tohumların yayılmasında ve ayrıca fotosentez sırasında üretilen serbest radikallerin temizlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bitkinin meyve kabuğu gibi farklı dokularında ve epidermal hücrelerde üniform bir şekilde çözülmüş olarak bulunurlar (Stintzing ve Carle, 2004; Cheynier, 2005). Antosiyaninlerin yapısı ısı, pH, ışık gibi faktörlerden önemli derecede etkilenmektedir ve degrade olabilmektedir. Literatürde ısı işlem uygulamasının antosiyanin içeriğinde önemli değişimlere neden olduğu rapor edilmektedir. Bu değişimler ısı etkisiyle kimyasal bağların kırılması, immobilize olan antosiyaninlerin hücresel yapılardan ayrılarak pişirme suyuna geçmesi ve bileşiklerin yapısal farklılığa ve dönüşüme uğraması ile açıklanabilir (Palermo ve ark., 2014). Isı uygulaması hücre duvarlarında degradasyona neden olmakta ve bağlı formdaki flavonoidlerin hidrolizi gerçekleşmektedir. Isı etkisi ile flavonoid glikozitler de kimyasal bağların hidrolizi sonucunda aglikonlara dönüşmektedir (Gao ve ark., 2022). Bağlı formda ve konjuge halde bulunan flavonoidlerin serbest hale geçmesi miktarlarında da değişime neden olmaktadır. Isı etkisiyle serbestleşen flavonoidlerin degradasyonu ve yeni ürünlerin ortaya çıkması fitokimyasal içerikte ve biyolojik fonksiyonlarda ciddi değişimlere neden olmaktadır (Şekil 2.2.). Örneğin önemli bir flavonoid olan rutin termal bozunma sonrasında degrade olarak yeni ürünlere dönüşmektedir. 2 saatlik ısıtmadan sonra rutin bileşiklerinden protokateşik asit, rutin dimeri, kuersetin gibi yeni bileşikler ortaya çıkmaktadır (Chaaban ve ark., 2017).

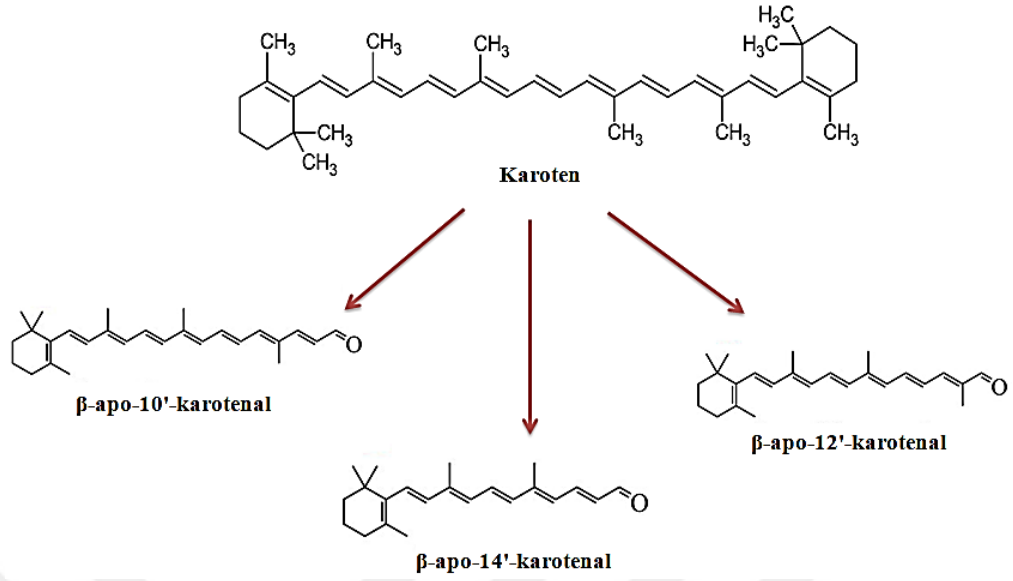


Şekil 2.2. Flavonoidlerin ısı uygulaması sonucunda degradasyonu (Gao ve ark., 2022)

2.3. Isıl İşlemin Karotenoidler Üzerine Etkisi

Karotenoidler doğada yaygın olarak bulunan izoprenoidlerdir ve tipik olarak meyve ve çiçeklerde pigment halinde bulunmaktadır. 650'den fazla karotenoid tanımlanmış ve doğal kaynaklardan izole edilmiştir. İnsanlar günlük diyetinde yaygın olarak bulunan β -karoten, lutein, likopen, α -karoten, β -kriptoksantin ve zeaksantin almaktadır. Karotenoidler özellikle sarı-turuncu meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Koyu yeşil yapraklı sebzelerde de bulunan karotenoidlerin parlak renkleri klorofil tarafından maskelenmektedir. Bitkilerde plastidlerde, yani kloroplastlarda ve kromoplastlarda lokalize olan karotenoidler, fotosentezde fotokoruyucu pigmentler ve membran stabilizatörleri olarak rol oynamaktadır (Maiani ve ark., 2009; Palermo ve ark., 2014). Karotenoidler, birbiri ardına dizilmiş izoprenoid birimlerinden oluşmuştur. Konjuge yapıda reaktif çift bağ içeren karotenoidler serbest radikalleri temizleyerek anti-oksidan aktivite sergilemektedir (Meléndez-Martínez ve ark., 2002).

Isı uygulaması fitokimyasal içerisindeki karotenoid miktarını azaltıcı ya da arttırıcı etki gösterebilir. Isı uygulamasının karotenoid miktarını arttırıcı etkisi genel olarak bitkisel dokulardan ekstraksiyonun hızlanması ile ilişkilidir. Isı etkisiyle hücre duvarının denatürasyonu, karotenoid-protein kompleksinin hidrolizi ile karotenoidlerin serbestleşmesini sağlayarak ekstraksiyonu da arttırmaktadır. Karotenoidlerde bulunan uzun konjuge karbon-karbon çift bağ zincirleri, ışık, oksijen, ısı ve asit maruziyetine karşı hassastır. Karotenoidlerin ısıya maruz kalması sonrasında derişimlerinde azalmalar da gözlenebilmekte ve bu azalma yapısal degradasyonla açıklanmaktadır. Isı sonucunda karotenoidler izomerizasyona da uğrayarak trans-form'dan cis formlara da dönüşebilmektedir (Imsic ve ark., 2010; Burmeister ve ark., 2011). Karotenlerin bozunması sonrasında farklı tiplerde yeni bileşikler oluşmaktadır. Genel olarak buharlaşan düşük moleküler ağırlıklı bileşikler ve uçucu kısmın ayrılmasından sonra geriye uçucu olmayan bileşikler kalmaktadır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Isı maruziyetinde karoten degradasyonu sonucu oluşan bileşikler

2.4. Isıl İşlemin Biyolojik Aktivite Üzerine Etkisi

Bitkiler farklı tipte fenolik bileşikler ve fitokimyasallar içermektedir. Bu bileşikler hücresel yapılara farklı kimyasal bağlar aracılığı ile bağlanmaktadır. Literatürde pişirme sırasında uygulanan ısının fitokimyasal içerikte azalmaya ya da artışa neden olduğunu rapor eden pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda gözlenen farklı bulgular fitokimyasalların supramoleküler yapılarının kırılması ile açıklanmaktadır. Bu kırılma sonucunda oluşan her bir yeni bileşik fitokimyasal içerikte ve biyolojik aktivitede değişime neden olmaktadır. Isı etkisi ile oluşan degrade ürünlerin yapısı ve fonksiyonu biyolojik aktivitedeki değişimin yönünü de belirlemektedir.

Bitkisel besinlerin içerdiği polifenoller çeşitli biyolojik ve farmakolojik aktivitelerin oluşumundan da sorumludur. Isı etkisiyle polifenollerin miktarında ve yapısında oluşan değişiklik biyolojik aktivitede de değişime neden olabilmektedir. En fazla değişim polifenollerin yüksek oranda sergilediği anti-oksidan aktivitede gözlenmektedir ve genel olarak bu değişimler üç kategoriye ayrılmaktadır. i. Isı etkisiyle degrade olan bileşiklerin daha düşük bir aktiviteye sahip olması nedeniyle

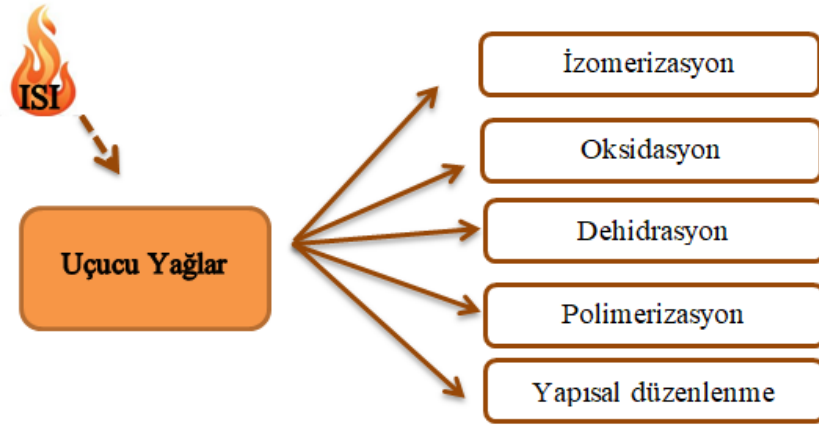
anti-oksidan aktivitede azalma gözlenmesi, ii. ısı etkisiyle yeni oluşan ara ürünlerin benzer etkiye sahip olması nedeniyle anti-oksidan aktivitenin sabit kalması, iii. yeni oluşan ürünlerin daha yüksek etkinlik göstermesi nedeniyle anti-oksidan aktivitenin artması ısı etkisiyle oluşan değişimlerdir (Chaaban ve ark., 2017). Sun ve ark. (2011) haşlama yöntemi ile ısı uygulanmış *Agaricus blazei* Murril. örneklerinde anti-oksidan aktivitenin azaldığını ve bu sonucu fenolik bileşiklerin türlerindeki ve nispi miktarlarındaki değişim ile ilişkilendirmişlerdir.

Bitkisel ekstraktların sergilediği anti-oksidan aktivitenin bir göstergesi olan radikal süpürme aktiviteleri de ısı işleminden önemli derecede etkilenmektedir. Radikal süpürme aktivitesindeki değişiklikler anti-oksidan etkinliği de değiştirmektedir. Bu değişiklikler uygulanan ısı işlemi ve süresine bağlı olarak değişmektedir. Fitokimyasal yapıların ısı uygulaması sonrasında bozulması, yeni ürünlerin ortaya çıkması radikal süpürücü etkide artışlara ya da azalışlara yol açmaktadır. Artan aktivite, termal işlem sonrasında Maillard reaksiyon ürünleri gibi anti-oksidan özelliklere sahip bileşiklerin oluşumu ile açıklanabilmektedir. Azalan radikal süpürücü etkiler ise ısı ile oluşan fitokimyasalda kayıp ya da ısı etkisiyle degrade olan bileşiklerin daha düşük bir aktiviteye sahip olması ile ilişkilendirilebilir (Roy ve Urooj, 2013; Chaaban ve ark., 2017). Deyalage ve ark. (2021), *Wattakaka volubilis*'in radikal temizleme aktivitesinin ısı işlem uygulaması ile azaldığı, özellikle 170°C'lik ısı uygulaması sonrasında %28 oranında bir aktivite kaybı olduğunu rapor etmiştir. Aynı çalışmada *Gymnema lactiferum* örneklerinde yüksek ısının radikal giderme aktivitesini %124 oranında arttığı belirlenmiştir.

Zengin fitokimyasal içeriğe sahip bitkilerin ısı uygulaması sonrasında anti-inflamatuar aktivitelerinde de değişiklik gözlenmektedir. İnflamatuar etkinin gözlenmesinde lipooksijenazlar önemli bir fonksiyona sahiptir. Lipooksijenazlar, lökotrien biyosentezinde anahtar enzimdir ve arasıdonik asidin biyolojik olarak aktif lökotrienlere dönüştürülmesindeki ilk adımları katalize etmektedir. Lökotrienler, lökositler ve diğer lipooksijenaz ekspres eden hücreler tarafından lokal olarak inflamasyonun ve alerjik reaksiyonların güçlü araçları olarak kabul edilir. Lökotrien biyosentez inhibitörleri ve lökotrien reseptör antagonistleri çeşitli inflamatuvar

hastalıklarda terapötik potansiyele sahiptir (Steinhilber, 1999). Lipooksijenaz inhibisyonuna neden olan fitokimyasal bileşenler bitkinin anti-inflamatuar etki sergilemesini sağlamaktadır. Gunathilake ve ark. (2018) *O. zeylanica*, *P. edulis*, *C. Asiatica* ve *C. auriculata* türlerine ait yaprak ekstraktlarının haşlama sonrasında lipooksijenaz-inhibe edici özelliklerinin arttığını, *G. lactiferum* örneklerinin ise ısı uygulaması sonrasında daha düşük inhibisyon özelliği sergilediğini rapor etmiştir. Bu sonuç ısı uygulamasının LPO aktivitesi üzerine etkisinin bitki türüne ve bitkinin fitokimyasal içeriğine göre değiştiğini göstermektedir.

Zengin fitokimyasal içeriğe sahip bitkiler yüksek oranda anti-mikrobiyal aktivite sergilemektedir. Bu aktivitenin oluşumunda pek çok aktif bileşik rol almaktadır. Fitokimyasal içerikte bulunan uçucu yağlar anti-mikrobiyal etkinlikte önemli bir role sahiptir. Genel olarak uçucu yağlar mikroorganizmalarda sitoplazma koagülasyonu, protein hasarı ve lipid yapılarının degradasyonu yoluyla etkinlik sergilemektedirler. Bu yapılarda oluşan anormallikler bakterilerde zar permeabilitesinde değişime, sinyal yollarında bozulmaya ve enerji metabolizmasında dengesizliğe neden olmaktadır (Şengün ve Öztürk, 2018). Bitkisel ekstraktlarda bulunan uçucu yağların yapısı pişirme sırasında uygulanan ısı etkisiyle değişime uğramaktadır. Özellikle uçucu yağların yüksek anti-mikrobiyal etki sergilemesinde rol oynayan monoterpenler ısı etkisiyle çeşitli reaksiyonlara uğramaktadır. Terpenler yüksek sıcaklıklarda yeniden düzenlemelere uğrayarak farklı yapılara dönüşebilmektedir. Uçucu yağlar ve terpenlerin termal bozunması farklı reaksiyon grupları ile gerçekleşmektedir. Terpen yapısındaki çift bağların kırılması, epoksidasyon, dehidrojenasyon, izomerizasyon, alkollere, ketonlara ve aldehitlere alilik oksidasyon bu reaksiyonların başlıcalarıdır (Turek ve Stintzing, 2013) (Şekil 2.4.). Uçucu yağ düzeyindeki değişim bitki ekstraktının anti-mikrobiyal aktivitesinde de değişime neden olmaktadır. Khayyat (2020) linalyl asetat uçucu yağının *Microsporum canis* ve *Microsprum gallinna*'ya karşı etkinliğini araştırmış ve uçucu yağın degradasyonu ile oluşan epoksit türlerinin daha düşük, hidroepoksit türlerinin benzer düzeyde etkinlik sergilediğini belirlemişlerdir.



Şekil 2.4. Uçucu yağların ısı maruziyetinde uğradığı reaksiyonlar

Gallik asit antimikrobiyal etkinlikten sorumlu önemli bir fitokimyasal bileşiktir ve bakterilerde akış pompalarını, folat sentezini ve arginaz aktivitesini inhibe ederek etkinlik göstermektedir (Durhan ve ark., 2022). Gallik asit ısı maruziyeti sonrasında dekarboksilasyon ve karbanyon geçiş durumu yoluyla yapısal değişime uğramakta ve etkinliği de değişmektedir (Boles ve ark., 1988). Literatürde ısıya maruz kalan bitkisel materyallerin anti-bakteriyel etkinliğinin azaldığı ve bu durumun fitokimyasallardaki değişimle ilgili olduğu rapor edilmektedir (Moyo, 2016).

2.5. *Ornithogalum umbellatum* L.

Ornithogalum (Hyacinthaceae, Ornithogaloideae) cinsi 200'den fazla soğanlı tür içermektedir ve Türkiye florasında 54 türü kayıtlıdır. *Ornithogalum* türleri Avrupa, Asya ve Afrika'nın ılıman bölgelerinde yayılış göstermektedir. Bu cinse ait olan *Ornithogalum umbellatum* çok yıllık soğanlı bir bitkidir. Çayırlar, ormanlar, kayalık tepeler, yol kenarları, üzüm bağları, meyve bahçeleri, bahçe ve bağlar olmak üzere farklı habitatlarda yetişebilmektedir. (Rat ve ark., 2016, Yalçın ve ark., 2020). Çiçeklenme zamanı Nisan– Haziran aylarını kapsayan ilkbahardır. Türlerinin çoğu morfolojik, anatomik ve ekolojik düzeyde önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir. Literatürde kimyasal bileşimleri araştırılan *Ornithogalum* türleri zengin fitokimyasal içeriğe sahiptir ve türlerin ürettiği ikincil metabolitler tıbbi

kaynak olarak kullanılabilirdiği için büyük ilgi çekmektedir. Karadeniz Bölgesi'nde *O. sigmoideum*, *O. oligophyllum*, *O. platyphyllum* ve *O. umbellatum* türleri besin olarak tüketilmektedir. *Ornithogalum* türleri saponinler ve kolestan, kardenolid ve flavonoid glikozitler açısından zengindir. Kardenolid veya kolestan glikozitler oldukça toksik bileşikler olmasına rağmen, bu cinsten bazı bitkiler geleneksel şifacılar tarafından diyabet, kalp sorunları, hepatit ve hatta bazı kanser türleri dahil olmak üzere çeşitli tıbbi durumları tedavi etmek için kullanılmıştır. Bu türlerdeki bileşiklerin çoğu, özellikle flavonoidler ve fenolik bileşikler, çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. *Ornithogalum* türlerinin anti-mikrobiyal, anti-oksidan, sitostatik ve anti-tümör aktiviteler sergiledikleri bildirilmektedir. *O. umbellatum* sindirim sistemi ve prostatla ilgili hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. (Rat ve ark., 2016; Renda ve ark., 2019). Günlük diyetinde *O. umbellatum*'un soğan, yaprak, sap kısımları sebze olarak hem çiğ hem de pişmiş olarak yaygın olarak tüketilmekte ve uzun yıllardır yerel pazarlarda satılmaktadır (Yalçın ve ark., 2020).

2.6. Çalışmanın Amacı

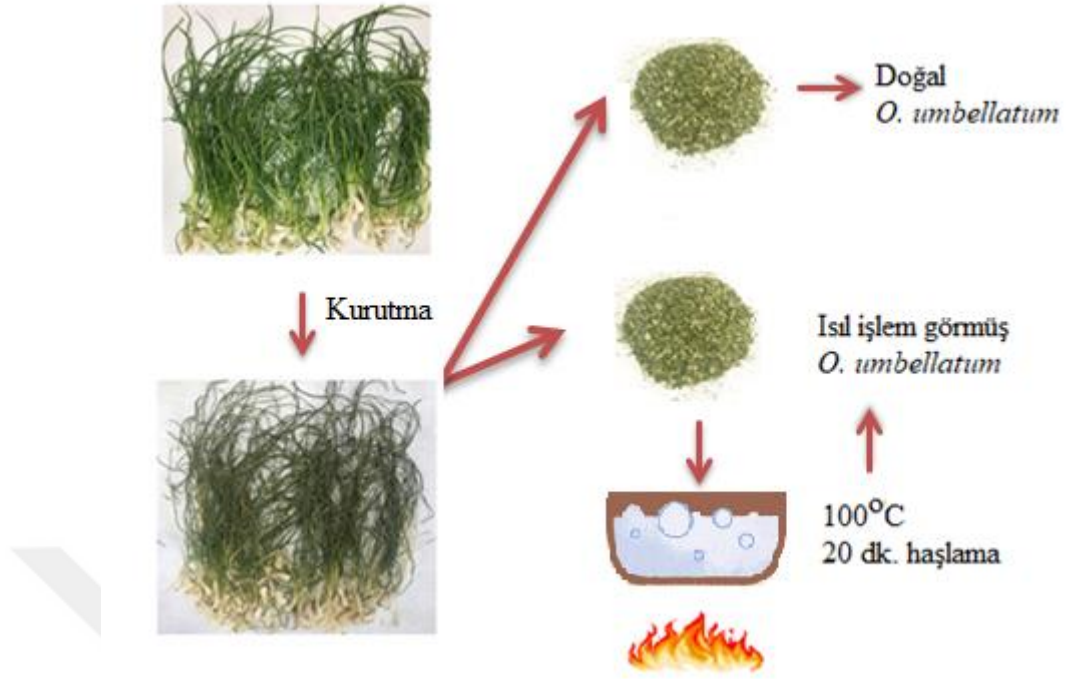
Bu çalışmada Giresun'da Sakarca olarak bilinen ve soğanları ile toprak üstü kısımları pişirilerek gıda olarak tüketilen *Ornithogalum umbellatum*'un ham ve ısıtılmış işlem uygulanmış ekstraktlarının fitokimyasal içeriği ve çeşitli biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. 100°C'de haşlama yoluyla ısıtılmış işlem uygulanmış ve herhangi bir işlem uygulanmamış iki bitki örneğinin fitokimyasal analizi indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve sıvı kromatografi-kütle spektrometresi/kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile araştırılmış ve ısıtılmış işlemin fitokimyasal içeriğe etkisi belirlenmiştir. ICP-MS ile makro ve mikro element düzeyleri, FTIR ile makromoleküllerdeki biyokimyasal fonksiyonel gruplar, LC/MS-MS ile fenolik bileşikler saptanmıştır. Bitkisel ekstraktların biyolojik aktiviteleri fitokimyasal içerikle yakından ilişkilidir. Bu çalışmada da *Ornithogalum umbellatum*'un anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-mutajenik, anti-proliferatif etkileri araştırılmış ve fitokimyasal içerikle ilişkilendirilmiştir. Isıtılmış işlemin biyolojik aktivite üzerine etkileri de araştırılarak kapsamlı bir çalışma gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada Karadeniz bölgesinde besin olarak tüketilen *O. umbellatum*'un fitokimyasal parmakizi ve biyolojik aktivitesi araştırılmıştır. Fitokimyasal içerik ICP-MS, LC-MS/MS ve FTIR analizleri ile araştırılmıştır. Biyolojik aktivite kapsamında anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-mutajenik ve anti-proliferatif etkiler araştırılmıştır. *O. umbellatum*'un gıda olarak tüketilmesinde çeşitli pişirme işlemleri uygulanmaktadır. Pişirme sırasında uygulanan ısı fitokimyasal içerikte ve biyolojik aktivitede değişimlere neden olmaktadır. Bu nedenle ısı işlem uygulanmış *O. umbellatum* örneklerinde de aynı analizler gerçekleştirilmiş ve ısının fitokimyasal içerik ve biyolojik aktivite üzerine etkisi de araştırılmıştır.

3.1. Ekstraksiyon

Karadeniz bölgesinde besin olarak tüketilen *O. umbellatum* Mayıs 2019'da Giresun'dan (40.560136, 38.436516) toplanmış ve Giresun Üniversitesi Botanik Bölümü'nde teşhisi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada bitkinin besin olarak tüketilen yumru kök ve yaprak kısımları kullanılmıştır. Hastalıklı ve solgun kısımları ayrılan bitkinin sağlam dokuları etüvde 35°C'de kurutulduktan sonra öğütücü kullanılarak toz haline getirilmiştir. Isı uygulaması için toz haline getirilmiş örnekler su içerisinde (1:5) 100 °C'de 20 dakika süre ile kaynatılmış ve etüvde kurutulmuştur (Şekil 2.1.). Kurutma işlemleri sonrasında ham ve ısı işlem görmüş örneklerle farklı çözücülerle ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır.



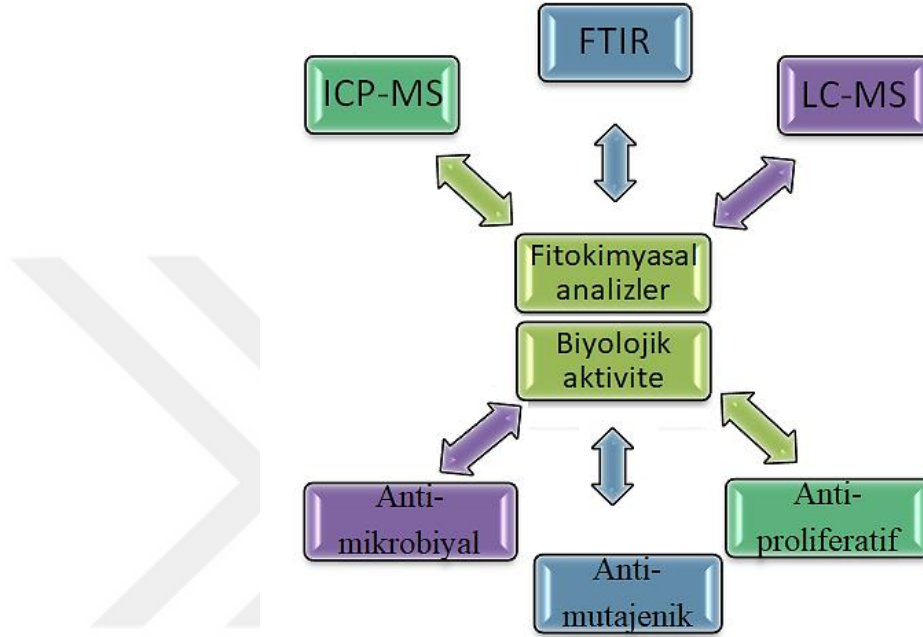
Şekil 3.1. *O. umbellatum* yapraklarının kurutulması, toz haline getirilmesi ve ısıl işlem uygulanması

Ekstraksiyon su, metanol ve kloroform olmak üzere üç farklı çözücü kullanılarak maserasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. 2 g yaprak 100 mL çözücü içinde çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında 24 saat ekstrakte edildikten sonra Whatman No:4 filtre kağıdı ile süzülmüştür. Elde edilen süzüntü 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant evaporatör ile buharlaştırılmış ve elde edilen ekstraktlar cam şişeler içerisinde +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Bakır Çilesizoğlu ve ark., 2022). Her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda ekstrakt verimliliği Eşitlik 1 kullanılarak belirlenmiştir.

Ekstrakt verimliliği (%): $\frac{\text{Elde edilen ekstrakt (g)}}{\text{Bitki miktarı (g)}} \times 100$	[1]
---	-----

Ekstraksiyon verimliliğinin saptanmasında ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı da dikkate alınmıştır ve toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemi ile belirlenmiştir (Durhan ve ark., 2021). Her bir çözücünden elde edilen 0,5 mL ekstrakta 2,5 mL Folin-Ciocaltaeu reaktifi (%10) ve 7,5 mL sodyum karbonat çözeltisi (%20) ilave edilmiştir. Çözeltiler 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Gallik asitin farklı derişimlerdeki standart çözeltileri ile aynı işlemler tekrar edilmiştir. Süre sonunda tüm çözeltilerin absorbanası 750 nm dalga boyunda

spektrofotometrik olarak ölçülmüş, toplam fenolik madde miktarı mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/gram ekstrakt olarak ifade edilmiştir. Maksimum verim elde edilen ekstrakt biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmıştır. Çalışma kapsamında incelenen parametreler Şekil 3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Deneysel analizler ve incelenen parametreler. ICP-MS: İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi, FTIR: Fourier dönüştürülmüş kızılötesi spektroskopisi, LC-MS: Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi

3.2. İleri Fitokimyasal Analizler

Ham ve ısıl işlem görmüş *O. umbellatum* örneklerinin fitokimyasal analizi LC-MS, FT-IR ve ICP-MS analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerden elde edilen verilerle ısıl işlemin fitokimyasal içerik üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

3.2.1. LC-MS/MS analizi

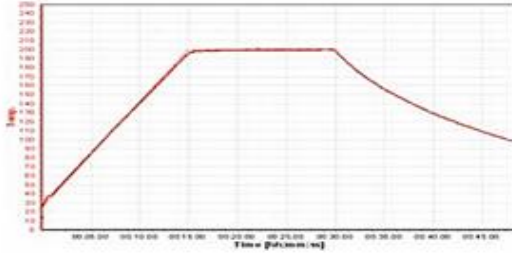
Ham ve ısıtılmış işlem görmüş 2 g örnek metanol:diklorometan (4:1) çözücüsü ile ultrasonik banyoda 120 dakika ekstrakte edilmiş, 0,45 µm şırınga filtreden geçirilerek süzölmüş ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. LC-MS analizi Hitit University- HÜBTUAM tarafından gerçekleştirilmiştir. Analiz koşulları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. LC-MS/MS analiz koşulları

Çözücü	A: %0,1 Formik asitli su		%B: Metanol
	Dakika	%A	%B
Solvent programı	0	100	0
	1	100	0
	22	5	95
	25	5	95
	30	0	100
Akış hızı	0,7 mL/dk		
Kolon fırın sıcaklığı	30°C		
Kolon	ODS Hypersil 4,6*250 mm kolon		
Enjeksiyon hacmi	20µL		

3.2.2. ICP-MS analizi

Ham ve ısıtılmış işlem görmüş bitki numuneleri (0,1 gr) ICP-MS analizi için mikrodalga çözümlendirme (Milestone D5, USA) cihazında yakılmıştır. Yakım için mikrodalga'nın teflon tüplerine aktarılan numune üzerine 5mL Suprapur nitrik Asit+2mL hidrojen sülfür ilave edilerek yakma işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.). Yakım sonrası örnek üzerine 50mL ultra saf su eklenmiş ve ICP-MS cihazı (Thermo Scientific ICAP QC, USA) ile analiz gerçekleştirilmiştir. Çalışma parametreleri radyofrekans gücü 1550 W, nebülizör gazı 0.96 L/dak, plazma gazı 0,88 L/dak, nebülizör basıncı 3,01 bar, bekleme süresi 0,01 ms olarak uygulanmıştır. 0,1 pbb-1500 ppb aralığında hazırlanan standartlar ile kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. Sonuçların doğruluğunu sağlamak için numunelerin ve standartların her ölçümü üç kez tekrarlanmıştır. ICP-MS analizleri Yozgat Bozok Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir.

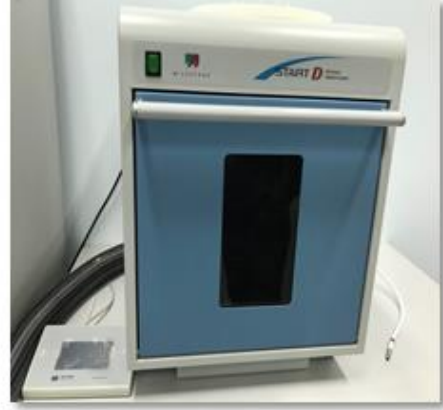


Step	Time	T1	T2 ⁽¹⁾	p ⁽²⁾	Power
1	00:15:00	200°C	110°C	45 bar	Max power*
2	00:15:00	200°C	110°C	45 bar	Max power*

^{(1), (2)} Optional sensors

Mikrodalga programı

Sıcaklık profili



Şekil 3.3. ICP-MS analizinde kullanılan koşullar ve cihazlar

3.2.3. FTIR analizi

Analizler FT-IR (Perkin ElmerFrontier FT-IR NIR and FIRSpectroscopy) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu cihaz pellet hazırlama basamağına ihtiyaç duyulmadan, katıdan direkt analize izin veren bir donanıma sahiptir. Ham ve ısıl işlem görmüş *O. umbellatum* numunelerinin FTIR grafikleri Spectra manager programıyla çizilmiştir. FTIR analizleri Yozgat Bozok Üniversitesi Kimya Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

3.3. Biyolojik Aktivite

O. umbellatum ekstraksiyonunda yüksek verimlilik elde edilen metanol ekstratı ile biyolojik aktivite analizleri gerçekleştirilmiştir. Metanol ekstraktının anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-mutajenik ve anti-proliferatif aktiviteleri araştırılmıştır. Önceki çalışmamızda *O.umbellatum* ham ekstraktının 20 mg/mL dozunda güçlü bir etkinlik sergilediği belirlenmiştir (Akgeyik ve ark., 2021). Bu çalışmada da 20 mg/mL

ekstrakt uygulamasının farklı mikroorganizma türlerine karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada bütünlük sağlamak adına anti-mutajenik ve anti-proliferatif aktivite çalışmalarında da aynı doz tercih edilmiştir.

3.3.1. Anti-bakteriyel ve anti-fungal aktivite

O. umbellatum ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için disk difüzyon testi kullanılmıştır. Ekstraktların *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Salmonella enteritidis* ATCC13076, *Bacillus subtilis* IMG22, *Bacillus cereus* ATCC14579, *Staphylococcus aureus* ATCC25923'e karşı antibakteriyel aktiviteleri test edilmiştir. Antifungal aktivite, *Candida tropicalis* ATCC13803 ve *Candida albicans* ATCC90028 türlerine karşı araştırılmıştır. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler, Mueller Hinton Broth ortamında 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edilmiş ve kültürden alınan 10^8 hücre/mL (0,5 McFarland) örnekler Mueller Hinton Agar petri kaplarına homojen bir şekilde ekilmiştir. Funguslar ilk olarak Potato Dextrose Broth besiyerinde 48 saat inkübe edilmiş ve kültürden alınan 10^6 CFU/mL (0,5 McFarland) örnekler homojen olarak Sabouraud Maltose Agar petri kaplarına ekilmiştir. Katı besiyeri yüzeylerine 6 mm çapında boş steril diskler yerleştirilmiş ve disklere 20 µL ekstrakt aktarılmıştır. Petri kapları 4°C'de 1 saat bekletilmiş, bakteriler için 37°C'de ve mantarlar için 27°C'de 24 saat inkübasyon uygulanmıştır. Antimikrobiyal aktivite, inkübasyon zonları (mm) ölçülerek belirlenmiştir. Nistatin ve Amikasin antibiyotikleri standart olarak kullanılmıştır (Efe ve ark., 2019).

3.3.2. Anti-proliferatif aktivite

O. umbellatum ekstraktlarının anti-proliferatif etkisi *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde Mitotik indeks (MI) oranlarındaki değişimler incelenerek belirlenmiştir. MI, hücre proliferasyonunun bir göstergesidir. Organizmalarda kontrol grubuna kıyasla MI değerinin %22'nin altına düşmesi letal bir etkiye işaret ederken, %50'nin altına düşmesi genellikle subletal etkiye işaret etmektedir. Mitotik indeksin inhibisyonu, hücre ölümü veya hücre çoğalma kinetiğinde gecikme ile ilişkilendirilmektedir. Anti-proliferatif aktivite tayini için dört farklı grup

oluşturulmuştur. Kontrol grubu distile su, pozitif kontrol grubu 20 mg/mL Glifosat ile, uygulama grupları 20 mg/mL ham ekstrakt ve ısıl işlem görmüş ekstrakt ile çimlendirilmiştir. Her bir grupta eşit büyüklükteki *Allium* bulbları 72 saat süre ile steril koşullarda çimlendirilmiştir. Çimlenme periyodu sonunda kök preparatları hazırlanmış ve mitotik hücreler incelenmiştir. Her grup için 5 slayt hazırlanmış, her slayttan 1000 hücre olmak üzere toplam 5000 hücre sayılmış ve MI yüzdeleri Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanmıştır (Durhan ve ark., 2022).

$$\text{Mitotik indeks (\%)} = \frac{\text{Bölünen hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı}} \times 100 \quad [3]$$

3.3.3. Anti-mutajenik aktivite

O. umbellatum ekstraktının anti-mutajenik aktivitesi kromozomal anormallik (KA) testi kullanılarak belirlenmiştir. KA analizi, *Allium testi* kullanılarak belirlenmiş ve bu amaçla altı farklı grup oluşturulmuştur. Grup I negatif kontrol olarak kabul edilmiş ve distile su ile çimlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak belirlenen Grup II güçlü bir mutajen olan sodyum azid (NaN_3) ile muamele edilmiştir. Tek başına ekstraktın potansiyel mutajenik etkisini belirlemek için oluşturulan Grup III ve Grup IV sırasıyla 20mg/mL ham ve ısıl işlem görmüş ekstrakt ile çimlendirilmiştir. 20 mg/mL NaN_3 +20 mg/mL ham ya da ısıl işlem görmüş ekstrakt uygulanan Grup V ve Grup VI'da ise pozitif mutajenin oluşturduğu kromozomal anaormalliklerdeki azalma incelenerek antimutajenik etki saptanmıştır (Durhan ve ark., 2022). %KA oluşumu ve %antimutajenik aktivite Eşitlik 4 ve 5 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ KA} = \frac{A}{B} \times 100 \quad [4]$$

$$\% \text{ Antimutajenite} = \frac{[(a-b)/(a-c)] \times 100}{1} \quad [5]$$

A: KA içeren hücre sayısını, B: total sayılan hücreyi, a: NaN_3 uygulanan gruba ait %KA, b: bitki ekstraktı+ NaN_3 uygulanan gruba ait %KA, c: kontrol grubuna ait %KA'yı ifade etmektedir.

3.3.4. MI ve KA preparatlarının hazırlanması

Anti-proliferatif ve anti-mutajenik aktivitelerin belirlenmesi için çimlenme süreleri sonunda her bir gruba ait kök ucu örnekleri toplanarak sabit preparatlar hazırlanmıştır. 1 cm uzunluğundaki kök uçları Clarke çözeltisi ile fikse edilmiş ve etanol serilerinden geçirilmiştir. Hidroliz amacıyla gerçekleştirilen 1 N HCl içerisinde 60°C’de 17 dakikalık inkübasyonu takiben örnekler 30 dakika boyunca % 45’lik asetik asitte bekletilmiştir. Son olarak asetokarmin ile 24 saat boyanan hücreler araştırma mikroskopunda incelenmiştir (Kuloğlu ve ark., 2022).

3.4. İstatiksel Analiz

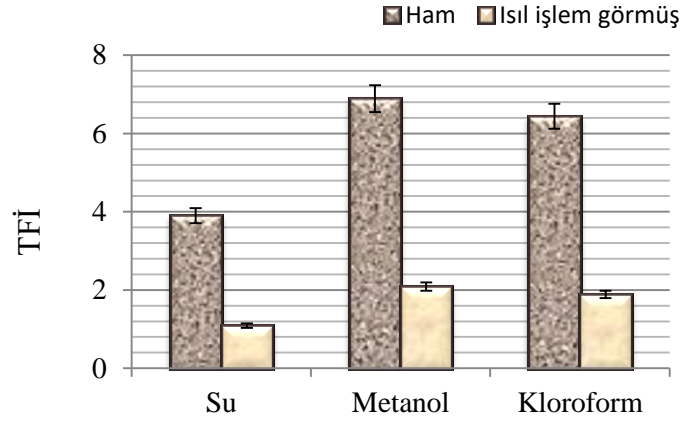
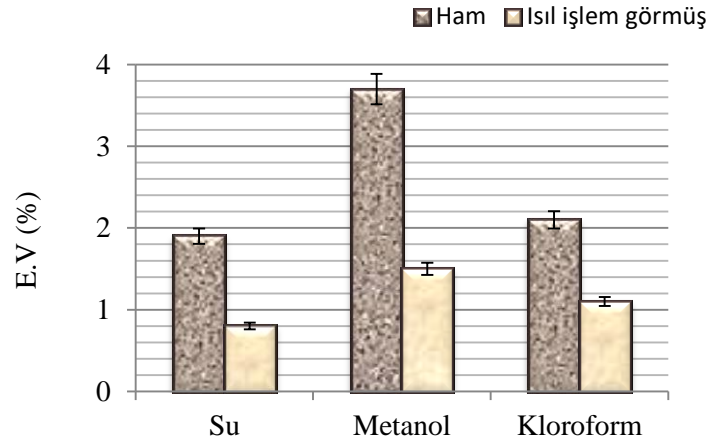
Analizler “IBM SPSS Statistics 22” paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler ortalama \pm SD (standart sapma) olarak verilmiştir. Ortalamalar arasındaki istatistiksel önem Duncan testi ve One-way ANOVA ile belirlenmiş, p değeri <0.05 olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Karadeniz bölgesinde besin olarak tüketilen *O. umbellatum*'un fitokimyasal içeriği ICP-MS, LC-MS ve FTIR analizleri ile araştırılmış, anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-mutajenik ve anti-proliferatif etkileri ile de biyolojik etkinliği incelenmiştir. Gıda olarak tüketilen bitkisel besinlerin pişirilmesi sırasında uygulanan ısı fitokimyasal içerikte ve buna bağlı olarak biyolojik aktivitede değişikliğe yol açmaktadır. Bu nedenle ısı işlem uygulanmış *O. umbellatum* örneklerinde de aynı analizler gerçekleştirilmiş ve ısının fitokimyasal içerik ve biyolojik aktivite üzerine etkisi de araştırılmıştır.

4.1. Ekstraksiyon Verimliliği

Ham ve ısı işlem görmüş bitki örnekleri su, metanol ve kloroform olmak üzere üç farklı çözücü kullanılarak maserasyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonrasında her bir çözücü için ekstraksiyon verimliliği ve toplam fenolik içerik araştırılmış, sonuçlar Şekil 4.1'de verilmiştir. Kullanılan çözücüler arasında en yüksek ekstraksiyon verimliliği %3,7 oranı ile metanol ekstraksiyonunda elde edilmiştir. Toplam fenolik içerik bakımından da metanol ekstraksiyonunda en yüksek verim elde edilmiş ve 6,89 mg GAE/g fenolik madde içeriği saptanmıştır. Isı uygulaması sonrasında hem ekstraksiyon verimliliğinde hem de total fenolik içerikte önemli azalmalar olduğu saptanmıştır. Metanol ekstraksiyonunda verimlilik ve fitokimyasal içerik su ve kloroform ekstraksiyonuna kıyasla daha yüksek düzeylerde tespit edildiği için diğer analizlerde metanol ekstraktı kullanılmıştır.



Şekil 4.1. Farklı çözücülerle elde edilen ekstraksiyon verimliliği (EV) ve Total fenolik içerik (TFİ) (mg GAE/g)

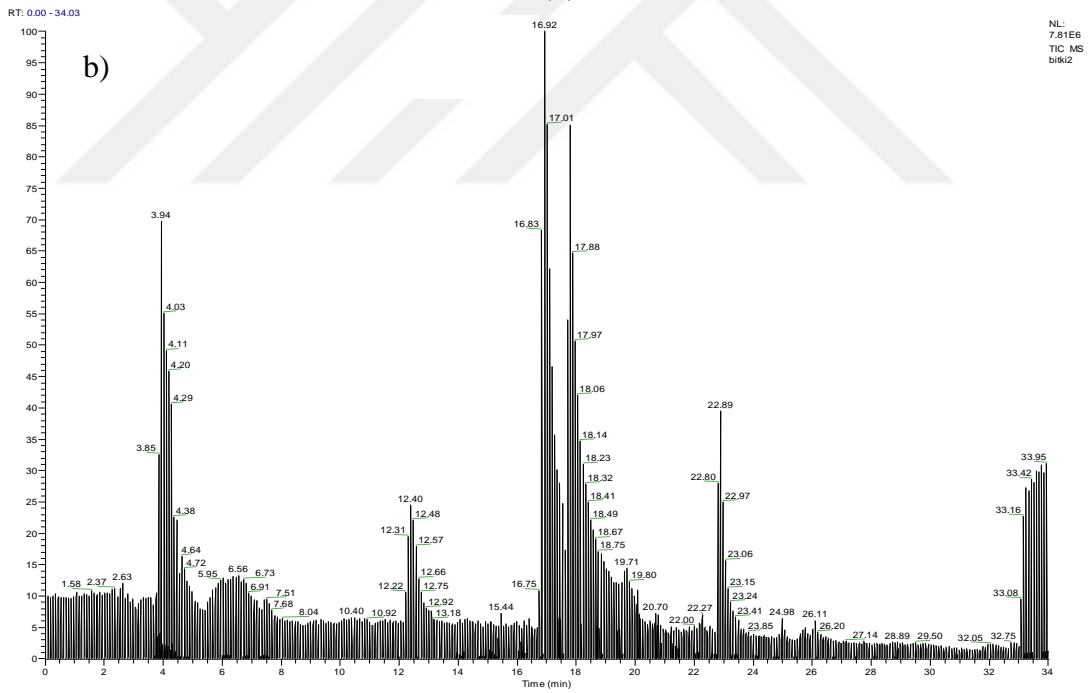
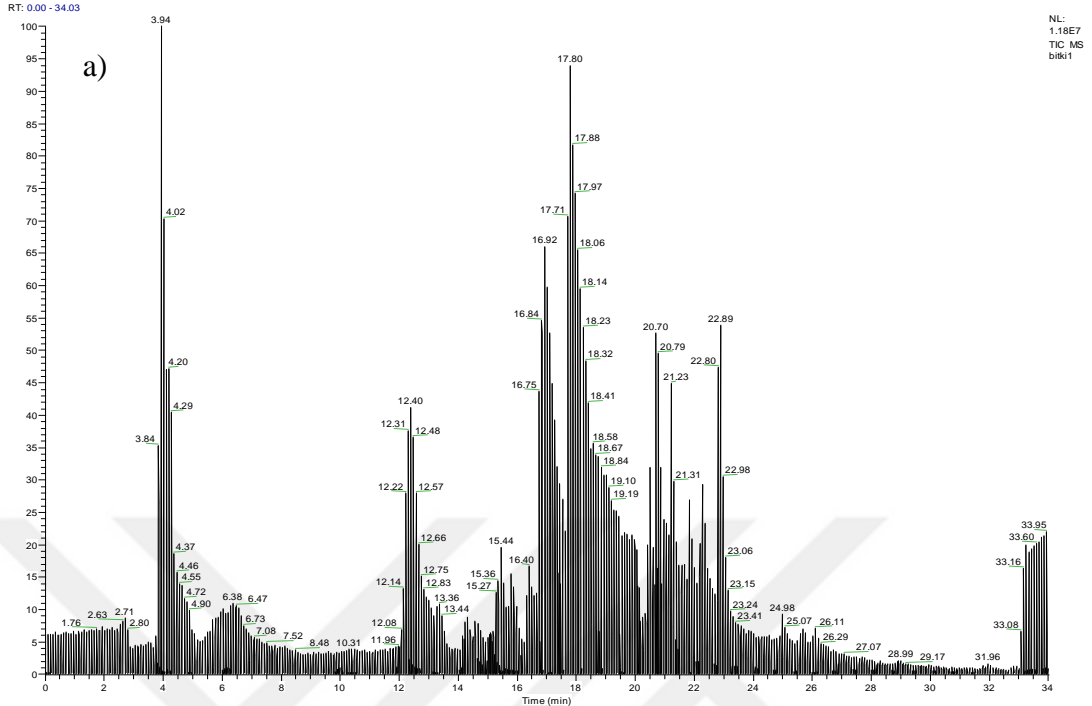
4.2. İleri Fitokimyasal Analizler

4.2.1. LC-MS/MS analizi

Ham ve ısıtılmış *O. umbellatum* ekstraktının içerdiği fenolik bileşikler ve bulunma oranlarını gösteren LC-MS kromatogramı Şekil 4.2.'de, bulunma oranları ve miktarları ise Tablo 4.1.'de verilmiştir. Daha önceki çalışmamızda 19 standart bileşik kullanılarak gerçekleştirilen analizde ham *O. umbellatum* ekstraktında toplam 6 fenolik bileşiğin varlığı tespit edilmiştir. Ham ekstraktta majör bileşik olarak gallik asit, prokateuik asit ve kafeik asit bulunurken minör oranda prokateuik aldehit, vanilin ve kaempferol varlığı tespit edilmiştir (Akgeyik ve ark., 2021). Isıl işlem sonrasında

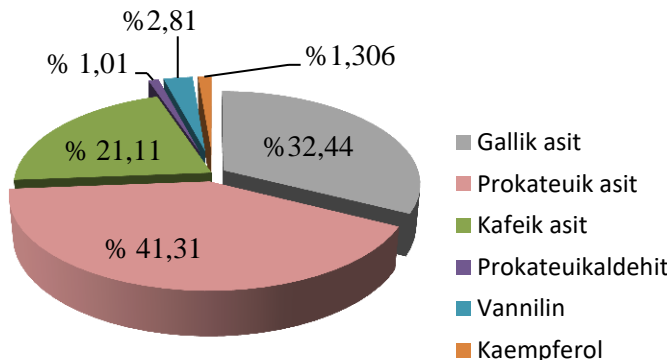
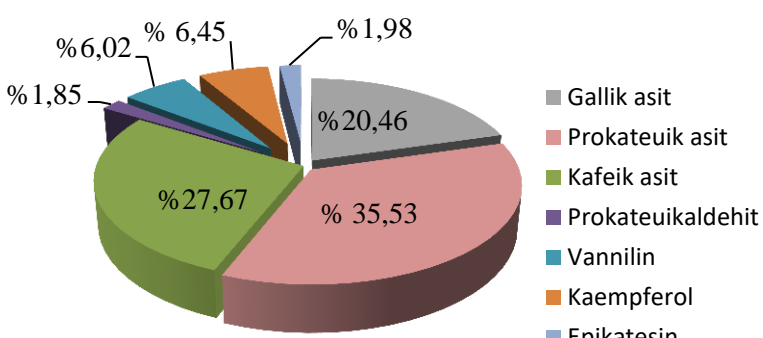
fenolik bileşik içeriğinde değişkenlik olduğu saptanmıştır. Ham ekstrakta benzer şekilde işlem görmüş ekstrakta gallik asit, prokateuik asit ve kafeik asit majör oranda bulunurken, prokateuik aldehit, epikateşin, vanillin ve kaempferol minör oranda tespit edilmiştir. Isıl işlem uygulaması *O. umbellatum* ekstraktının majör bileşenlerinden gallik asit içeriğinde %92,6; prokateuik asit içeriğinde %90; kafeik asit içeriğinde ise %84,8 azalmaya neden olmuştur. Benzer azalmalar minör bileşiklerde de saptanmıştır. Ham ekstraktan farklı olarak ısı uygulanan örneklerin içeriğinde epikateşin varlığı tespit edilmiş bu durum ise var olan fenolik bileşiklerin degradasyonu ile yeni bileşiklerin oluşması ile ilişkilendirilmiştir. Literatürde çeşitli ekolojik şartlarda yetişen *Ornithogalum* türlerinin fitokimyasal içeriği araştırılmıştır. Temiz (2021) Mersin (Türkiye)'de yayılış gösteren *O. lanceolatum* ekstraktının HPLC ile fitokimyasal analizini gerçekleştirmiş ve özellikle yaprak kısımlarının yoğun miktarda prokateuik asit, rutin, kuersetin ve gallik asit içerdiğini rapor etmiştir.

Ekstrakt içeriğinde saptanan aktif maddeler pek çok biyolojik aktivitenin oluşumundan sorumludur. Ham ve ısı işlem görmüş ekstratta maksimum düzeyde tespit edilen prokateuik asit serbest radikal oluşumunu inhibe ederek, hücrede oluşan serbest radikalleri süpürerek ve metal şelatlayıcı ajan görevi üstlenerek güçlü bir anti-oksidan aktivite sergilemektedir. Prokateuik asidin antioksidan aktivite yanında anti-mikrobiyal, anti-iflamatuar, anti-diyabetik, anti-ülser ve anti-viral etkinlikleri de literatürde rapor edilmektedir (Rice-Evans ve ark., 1996). Ekstrakta bulunan ikinci majör fenolik bileşik olan ve *O. umbellatum*'da tespit edilen tüm fenolikler arasında %32,44 bulunma oranına sahip olan gallik asit doğal bir bitkisel sekonder metabolittir. Anti-inflamatuar, anti-tümör, anti-oksidan, anti-mikrobiyal, anti-diyabetik ve anti-obezite gibi birçok belirgin farmakolojik etkiye sahip olan gallik asit düşük moleküler ağırlıklı bir tri-fenolik bileşiktir (Bai ve ark., 2021). Ham ve ısı uygulanan ekstraktlarda tespit edilen ve  majör bileşikten biri olan kafeik asit güçlü biyolojik aktivitelere sahiptir. Lipid peoksidasyonunu önleyerek, serbest radikalleri süpürerek ve endojen antioksidan enzim aktivitelerini arttırarak yüksek anti-oksidan rol sergilemektedir (Jamali ve ark., 2019). Ekstrakt içeriğinde saptanan fenolik maddelerin kümülatif etkilerinin bir sonucu olarak *O. umbellatum* ekstraktı da pek çok biyolojik aktivite sergilemektedir.



Şekil 4.2. *O. umbellatum* ekstraktının LC-MS/MS analizine ait kromatogramlar. a) Ham ekstrakt (Akgeyik ve ark., 2021), b) ısıtılmış işlem görmüş ekstrakt

Tablo 4.1. Ham ve ısı işlem görmüş ekstraktlarda fenolik madde dağılımı

Fenolik madde	Miktar mg/kg	Bulunma oranı (%)
Ham ekstrakt		
Gallik asit	41,722	
Prokateuik asit	53,136	
Kafeik asit	27,162	
Prokateuik aldehit	1,305	
Vannilin	3,611	
Kaempferol	1,681	
		
Isıl işlem uygulanmış ekstrakt		
Gallik asit	3,046	
Prokateuik asit	5,290	
Kafeik asit	4,120	
Prokateuik aldehit	0,276	
Vannilin	0,897	
Kaempferol	0,961	
Epikateşin	0,295	
		

Isı işlem uygulaması ekstrakt içeriğinde bulunan fenolik bileşik miktarlarında azalmaya neden olmuştur. Bu azalma ısı işlem sonrasında fenolik bileşiklerin oksidatif bozunması ya da tanen, anthosiyanin gibi bileşiklerle kompleks oluşturması ile açıklanabilir. Bazı durumlarda kompleks fenolik bileşiklerin parçalanması yeni ve düşük moleküler ağırlıklı yapıları oluşmasına da neden olabilir. Ham ekstraktta bulunamayan epikateşinin ısı uygulanan ekstraktta tespiti bu duruma güzel bir örnektir. Literatürde *O. umbellatum*'un fitokimyasal içeriğini araştıran çalışmalar bulunmakla birlikte, ısı işlemin fenolik bileşik gibi fitokimyasal içerik üzerine etkisini araştıran çalışma bulunmamaktadır. Fakat besin olarak tüketilen pek çok bitkideki ısı uygulamalar sonucunda içerikteki değişimler rapor edilmiştir. Loizzo ve ark. (2013) *Capsicum annum*'da belirlenen 127,5 mg/g olan total fenolik içeriğin ısı

uygulamasý sonrasında azalarak 15 mg/g düzeyine gerilediğini rapor etmiştir. Sun ve ark. (2021) ısıl işlem uygulamasının *Solanum tuberosum* içeriğindeki gallik asit ve klorojenik asit miktarında azalmaya neden olduğunu rapor etmiştir. Literatürde ısıl işleminin fenolik içeriği azalttığını rapor eden çalışmalar kadar arttığını saptayan çalışmalarda mevcuttur. Faller ve Fiahlo (2009) bazı bitkisel ekstraktlarda ısıl işlemin fenolik içerikte artışa neden olduğunu ve bu artışın ısı etkisi ile hücre duvarına ya da proteinlere bağlı olan fenolik bileşiklerin daha verimli bir şekilde ekstraksiyonu ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir.

4.2.2. ICP-MS analizi

Ham ve ısıl işlem görmüş *O. umbellatum* ekstraktlarında ICP-MS analizi ile tespit edilen makro ve mikro elementlerin düzeyleri Tablo 4.2.'de verilmiştir. Ham *O. umbellatum* bitkisindeki element düzeyleri önceki çalışmamızda incelenmiş yüksek oranda K elementinin bulunduğu bunu sırayla Ca, Mg, Na, Fe, Zn elementlerinin izlediği tespit edilmiştir. ICP-MS analizi sonucunda K elementi 1836,135 ppm, Na 41,954 ppm, Ca ise 486,213 ppm düzeylerinde belirlenmiştir (Akgeyik ve ark., 2021). Literatürde farklı bölgelerde yetişen *O. umbellatum* ekstraktlarında analiz edilen K değerinin ortalama 2188,7 mg/kg - 2560 mg/kg aralığında, Ca değerinin 1280 mg/kg- 657,78 mg/kg aralığında bir konsantrasyonda bulunduğu rapor edilmektedir. Na elementinin araştırıldığı çalışmalarda ise 33,49 mg/kg-55 mg/kg aralığında bir konsantrasyonda bulunduğu tespit edilmiştir (şimşek ve ark., 2017; Güzelsoy ve ark., 2017). *O. umbellatum* ekstraktında Mg değeri bu çalışmada 167,365 ppm olarak tespit edilirken literatür çalışmalarında 195 mg/kg-179,64 mg/kg aralığında Mg varlığı rapor edilmiştir (şimşek ve ark., 2017; Güzelsoy ve ark., 2017). *O. umbellatum* ekstraktı ile ilgili gerçekleştirilen literatür çalışmalarında rapor edilen elementler benzerlik gösterirken elementlerin bulunma düzeyinde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu farklılıklar değişik ekolojik ortamlarda yetişen aynı türlerin ortama adaptasyonu süresince ürettiği fitokimyasal bileşikler ve geliştirdiği biyokimyasal reaksiyonlarla ilişkilendirilebilmektedir. Günlük diyetinde tüketilen bitkisel besinler çeşitli düzeyde makro ve mikro elementler içermektedir. Bunlar içerisinde makro elementler diğer tüm elementlere kıyasla yüksek oranda

bulunmaktadır. *O. umbellatum* ekstraktında yüksek oranda bulunan K elementi bitkilerde enzim aktivasyonu, fotosentez, stoma aktivitesi ve nişasta sentezi gibi pek çok metabolik yolda önemli bir role sahiptir (Johnson ve ark., 2022).

Tablo 4.2. Ham ve ısıl işlem görmüş *O. umbellatum* ekstraktlarının element düzeyleri

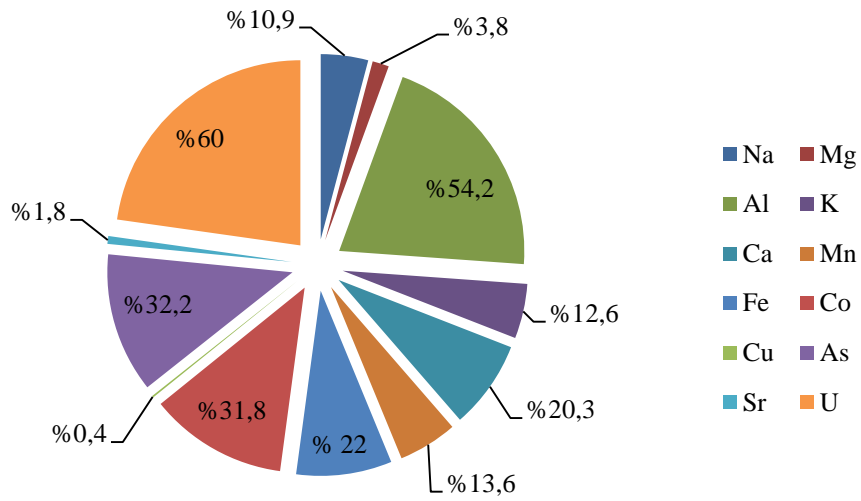
	Ham ekstrakt (ppm)			Isıl işlem görmüş ekstrakt (ppm)		
	Ortalama değer	SS	RSD	Ortalama değer	SS	RSD
²³ Na	41,954	0,249	0,59	37,378	0,261	0,70
²⁴ Mg	167,365	1,399	0,84	160,841	0,841	0,52
²⁷ Al	6,910	0,113	1,63	3,160	0,037	1,16
³⁹ K	1836,135	18,069	0,98	1603,878	18,637	1,16
⁴⁴ Ca	486,213	8,888	1,83	387,104	6,064	1,57
⁵⁵ Mn	2,238	0,024	1,07	1,932	0,023	1,16
⁵⁷ Fe	32,780	0,131	0,40	25,556	0,357	1,40
⁵⁹ Co	0,02855	0,001	3,57	0,01945	0,000	1,18
⁶³ Cu	0,299	0,009	3,03	0,298	0,016	5,38
⁶⁶ Zn	7,416	0,429	5,78	7,606	0,350	4,60
⁷⁵ As	0,00419	0,001	22,68	0,00284	0,001	20,84
⁸⁸ Sr	1,509	0,016	1,08	1,481	0,056	3,77
¹¹¹ Cd	0,063	0,003	4,66	0,065	0,002	2,87
¹³⁷ Ba	2,357	0,047	1,98	2,362	0,052	2,19
²³⁸ U	0,0024	0,000	4,68	0,00096	0,000	5,67

SS: Standart sapma, RSD: Bağıl standart sapma (%)

Bitkisel gıdaların tüketimi yoluyla insanlara ulaşan K ve Na elementi özellikle kalpte, kaslarda ve nöronlarda hücre zarı potansiyeli için gereklidir. Ca, kas kasılması, güçlü kemik ve diş oluşumu, kan pıhtılaşması, sinir uyarısı, iletim, kalp atışının düzenlenmesi ve hücrelerdeki sıvı dengesinde rol oynarken, Mg sinir ve kas fonksiyonunun korunmasında, bağışıklık sisteminin güçlenmesinde ve kan şekeri düzenlenmesi gibi pek çok biyokimyasal yollarda görev almaktadır. *O. umbellatum* ekstraktında tespit edilen bir element olan Fe ise oksijenin taşınması, deoksiribonükleik asit sentezi ve elektron taşınması dahil olmak üzere çok çeşitli metabolik süreçlere katıldığı için hemen hemen tüm canlı organizmalar için temel bir elementtir (Miles ve ark. 2001; Asia ve ark. 2010). Diğer elementler de insan dokularının büyük kısmının sağlıklı ve organize bir şekilde işleyebilmesine katkı sağlamaktadır ve bu kapsamda mikro/makroelementlerin günlük diyetinde yeterli düzeyde alınması oldukça önemlidir. ICP-MS analizi ile yüksek oranda makro/mikro element içeriğine sahip olduğu tespit edilen *O. umbellatum*'un besin olarak

tüketiminin insan sağlığı açısından faydalı olduğu söylenebilir. Makroelementlerle birlikte ham ekstrakt içeriğinde Co (0,029 ppm), Cu (0,299 ppm), As (0,004 ppm), Sr (1,509 ppm), Cd (0,063 ppm) ve U (0,002 ppm) gibi ağır ve radyoaktif elementlerin varlığı da saptanmıştır.

Isıl işlem uygulaması sonrasında makro ve mikroelement düzeylerinde önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Genel olarak ısıl işlem element düzeylerinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.3.). En belirgin azalma %54,2 oranla Al elementinde tespit edilmiştir. Literatürde de pişirme sırasında uygulanan ısıl işlemin element düzeylerinde değişime neden olduğunu rapor eden çalışmalar mevcuttur. Nnabugwu ve ark. (2017) ham ve haşlama yoluyla ısıl işlem uygulanmış *Anacardum occidentale* örneklerinde Cu, Fe, K, Ca, Mg ve Na düzeylerinde azalmalar olduğunu belirtmişlerdir. Isı uygulanmış örneklerde bazı element düzeylerinde azalma yerine artış olduğu da tespit edilmiştir. Isı uygulaması sonrasında Cd, Ca, Ba, Cu ve Zn düzeylerinde artış belirlenmiş ve bu artış hücrel makromoleküllere bağlı olarak bulunan elementlerin ısı etkisi ile serbestleşmesi ile ilişkilendirilmiştir. Isıl işlem sonrasında makro ve mikroelement düzeylerinde gözlenen değişimler farklı mekanizmalarla açıklanabilir. Na, Mg, Al, K, Mn, Fe, Co, As, Sr ve U düzeylerinde gözlenen azalmalar bitkisel dokudan haşlama suyuna geçiş ile açıklanabilir. Haşlama suyu element düzeyleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Haşlama suyunda analiz edilen bazı elementlerin düzeyi ısıl işlem sonrasında tespit edilen kayıp düzeyinden daha yüksektir. Bu durum hücrel makromoleküllere bağlı olarak bulunan elementlerin ısı etkisi ile serbestleşerek haşlama suyuna geçmesi ile açıklanabilir. Bazı elementlerde ise ısıl işlem sonrasında gözlenen kayıp düzeyi haşlama suyunda tespit edilene kıyasla daha düşüktür. Bu duruma en belirgin örnek Fe ölçümleridir. Ham ekstraktta 32,780 ppm oranında ölçülen Fe; haşlanmış ekstraktta 25,556 ppm Fe tespit edilmiş ve kayıp 7,224 ppm'dir. Buna rağmen haşlama suyunda Fe tespit edilememiştir. Bu sonuç ısıl işlem sonrasında kaybolan Fe'nin haşlama suyuna geçen organik bileşiklerle kompleks oluşturması ve analiz edilememesi ile açıklanabilir.



Şekil 4.3. Isıl işlem uygulaması sonrasında makro ve mikroelement düzeylerindeki azalma (%)

Tablo 4.3. Haşlama suyu element düzeyi

Haşlama suyu element düzeyi (ppb)			
	Ortalama	SS	RSD
²³ Na	8771,19	438,95	5,00
²⁴ Mg	14957,42	138,53	0,93
²⁷ Al	243,28	13,88	5,71
³⁹ K	103478,87	1217,64	1,18
⁴⁴ Ca	11518,67	729,74	6,34
⁵⁵ Mn	260,86	17,12	6,56
⁵⁷ Fe	N.D	N.D	N.D
⁵⁹ Co	7,01	0,47	6,66
⁶³ Cu	18,13	1,22	6,74
⁶⁶ Zn	4005,51	585,99	14,63
⁷⁵ As	0,85	0,75	87,90
⁸⁸ Sr	231,78	8,17	3,53
¹¹¹ Cd	32,12	1,73	5,38
¹³⁷ Ba	150,92	3,07	2,04
²³⁸ U	0,73	0,03	3,62

SS: Standart sapma, RSD: Bağıl standart sapma (%)

4.2.3. FTIR analizi

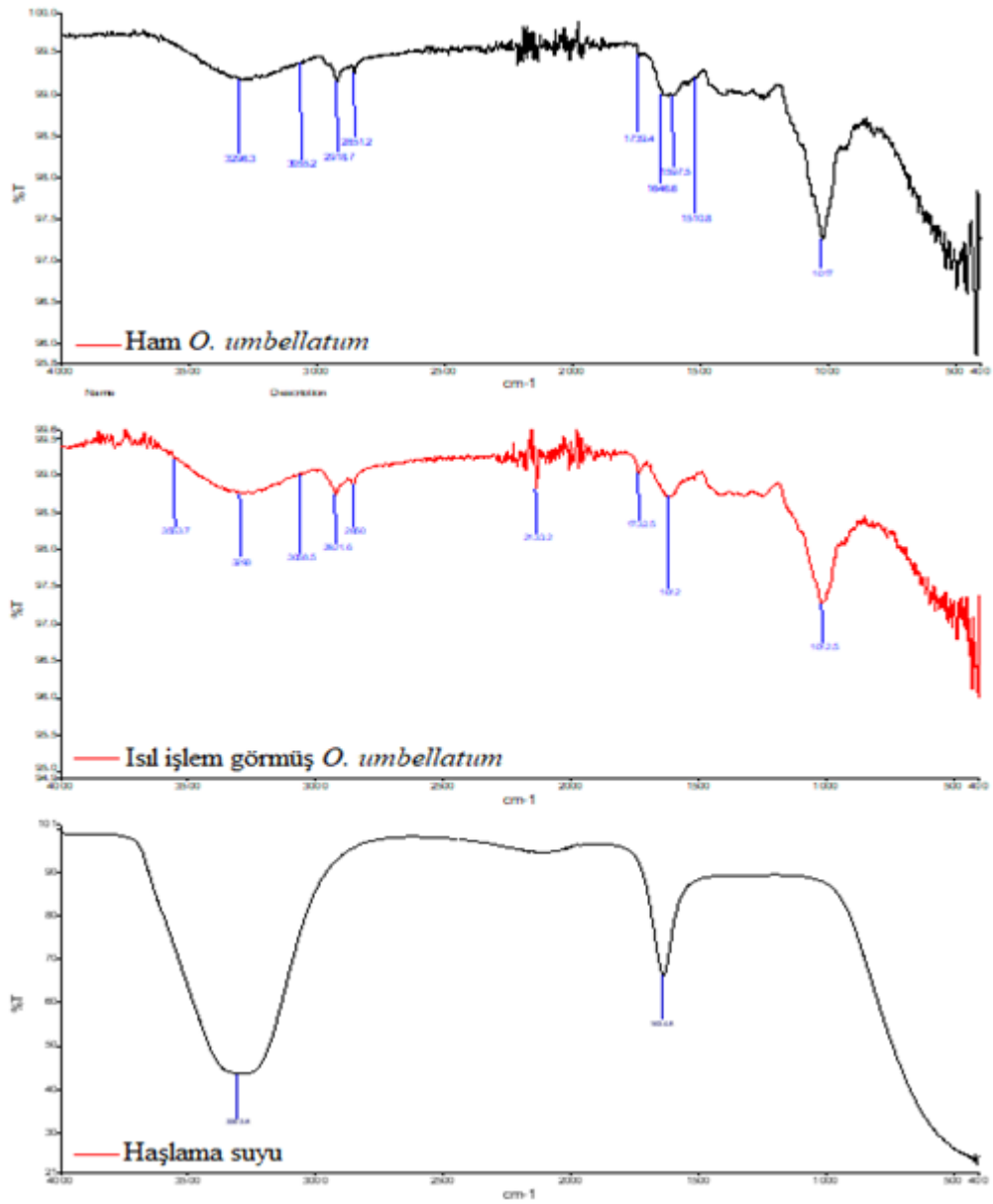
FTIR spektroskopisi, özellikle yağ asitleri, proteinler, polisakkaritler ve karbonhidratlar için bitki hücrelerinin biyokimyasal bileşimini belirleyebilen güçlü bir analitik tekniktir. Çeşitli ortamlar altında belirli noktalarda bitki dokuları veya hücrelerinde biyokimyasal bileşimin anlık görüntüsünü sağlayan bir analizdir. FTIR, biyokimyasal veya metabolik "parmak izi" olarak düşünülen fonksiyonel gruplar içindeki bağların titreşimlerine dayalı bir spektrum oluşturmaktadır. 4000 ila 400 cm^{-1} spektral aralığında kaydedilen FTIR spektroskopisi ile -OH, -NH ve -CH fonksiyonel gruplarını içeren organik bileşikler analiz edebilir, bitki örneklerinde biyokimyasal bileşimdeki değişimler değerlendirilebilmektedir. Bu değişimler pik genişliği, konumu ve absorpsiyonun yoğunluğu dikkate alınarak belirlenmektedir (Lahlali ve ark., 2017). Bitkilerdeki makromoleklerin fonksiyonel grupları ve titreşim sergilediği dalga boyları Tablo 4.4.'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Makromoleküllerin dalga boyları ve absorpsiyon bantları (Lahlali ve ark., 2017)

Dalga boyu (cm^{-1})	Absorpsiyon pik bölgesi	Bileşenler
3410	-OH grupları, NH gerilmesi	Proteinler (Amide A)
2927	C-H gerilmesi (asym.) CH_2 'nin	Lipit açıl zincirleri
1740	C=O gerilmesi: karbonil ester bileşikleri	Pektin
1650	-C=O- ve -C=N- gerilmesi	Proteinler (Amide I)
1548	N-H bükülmesi and C-N gerilmesi	Proteinler (Amide II)
1518	CH_2 ve CH_3 metilen zincir gerilmesi	Lignin
1246	C-O, - CH_2 - gerilmesi ve bükülme, P-O gerilmesi	Hemiselüloz
1151	C-O-C asimetrik gerilme	Selüloz
1061	C-O-C simetrik gerilmesi	Selüloz

Ham ve ısıtılmış işlem görmüş *O. umbellatum* örneklerine ait FTIR spektrumları Şekil 4.4.'te verilmiştir. Ham örneğe ait FTIR spektrumunda, 3296,3 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandı örnekte bulunan -OH ve NH gruplarının varlığını göstermektedir. Isıtılmış işlem görmüş örnekte aynı absorpsiyon bandı 3293 cm^{-1} 'de bulunmaktadır. Ham örnekte 3055,2 cm^{-1} 'de gözlenen aromatik -CH gruplarının gerilme titreşimleri ısı uygulaması sonrasında 3058,5 cm^{-1} absorpsiyon bantları olarak ortaya çıkmıştır. Alifatik C-H gerilimini gösteren absorpsiyon bantları ham örnekte 2918,7 cm^{-1} -

2851,2 cm⁻¹'de ısı uygulanan örneklerde 2921,6 cm⁻¹-2850 cm⁻¹'de gözlenmiştir. 1739,4 cm⁻¹ de bulunan C=O gerilmesi ısı uygulaması sonrasında 1732,5 cm⁻¹ bandında bulunmaktadır. 1700 cm⁻¹ ila 1600 cm⁻¹ cm arasındaki absorpsiyon bandı, amid gruplarının N-H bükülmesi, C=O esnemesi ile ilişkilidir. Ham örnekte gözlenen 1646,6 cm⁻¹ bandında beliren C=N pikleri ısı uygulanmış örnekte belirgin olarak gözlenmemiştir. Amid I bölgesindeki bant (1646cm⁻¹), proteinlerin sekonder yapısı hakkında daha fazla bilgi sağlamaktadır.



Şekil 4.4. FTIR analizleri

Doğal ve ısıtılmış örneklerin Amid I bölgesindeki band yoğunlukları arasında küçük değişimler gözlenmiş ve bu değişimler ısı etkisi ile proteinlerin sekonder yapısındaki değişimlerle ilişkilendirilmiştir. Buda ısı uygulaması sonucunda yapıda bulunan azot kaybını göstermektedir. Ham *O. umbellatum* örneğinde $1597,5\text{ cm}^{-1}$ - $1510,8\text{ cm}^{-1}$ bandında aromatik C=C gerilmesi, ısıtılmış örnekte 1612 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Ham örneklerde 1017 cm^{-1} bandında bulunan C-O gerilmesi ısıtılmış örnekte $1012,5\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmiştir. Isıtılan örneklerde 3400 cm^{-1} - 3800 cm^{-1} aralığında yeni bantlar gözlenmiş ve bu bantların proteinlerin -NH gerilimi (Amid A) ve -OH gruplarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

4.3. Biyolojik Aktivite

Ham ve ısıtılmış örneklerin biyolojik aktiviteleri anti-mikrobiyal, anti-mutajenik ve anti-proliferatif etkinlikleri araştırılarak belirlenmiştir. Önceki çalışmamızda *O.umbellatum* ham ekstraktının 20 mg/mL dozunda güçlü bir etkinlik sergilediği belirlenmiştir (Akgeyik ve ark., 2021). Bu çalışmada da 20 mg/mL ekstrakt uygulamasının farklı mikroorganizma türlerine karşı anti-mikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmada bütünlük sağlamak adına anti-mutajenik ve anti-proliferatif aktivite çalışmalarında da aynı doz tercih edilmiştir.

4.3.1. Anti-bakteriyel ve anti-fungal aktivite

Ham ve ısıtılmış örneklerin *O. umbellatum* ekstraktının anti-mikrobiyal aktivitesi Tablo 4.5'te verilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizma türlerine karşı farklı derecelerde inhibisyon elde edilmiştir. Ham ekstraktın gram pozitif bakterilere karşı en yüksek etkinliği $21,9\pm 0,7\text{ mm}$ inhibisyon zonu ile *S. aureusa*'ya karşı, gram negatif bakterilerde ise $16,5\pm 0,3\text{ mm}$ inhibisyon zonu ile *P. aeruginosa*'ya karşı tespit edilmiştir. Ekstraktın tüm bakteriler üzerinde inhibisyon zonu oluşturması, geniş spektrumlu olduğuna işaret etmektedir. Bununla birlikte *O. umbellatum* ekstraktının gram negatiflere kıyasla gram pozitiflere karşı daha yüksek etkinlik sergilediği de belirlenmiştir. Bakterilere karşı oluşan bu seçicilik gram pozitif ve gram negatif

bakteriler arasındaki yapısal farklılıktan kaynaklanmaktadır. Gram negatif bakterilerde hücreyi çevreleyen çift zar, anti-mikrobiyal bileşiklere karşı oluşan direncin ana nedenidir. Tüm bakteriler bir iç zara sahipken gram negatif bakterilerin seçici özellikte bir dış zarı bulunmaktadır. Bu dış zar, pek çok bileşiğin hücre içerisine girmesini engelleyerek sidal etkilere karşı direnç sağlamaktadır. Gram pozitif bakterilerde bu seçici dış zar bulunmadığı için anti-mikrobiyal bileşikler bu bakterilerde daha yüksek etkinlik göstermektedir. Ayrıca gram pozitif bakterilerin hücre duvarı oldukça gözenekli bir yapıya sahipken gram negatiflerde hücre duvarı yüksek lipid içeriğine sahiptir ve anti-mikrobiallerin hücre içine geçişi dış zar proteinlerine bağlıdır (Breijyeh ve ark., 2020). Tüm bu yapısal farklılıklar Gram negatiflerin daha dirençli olmasını sağlamaktadır ve *O. umbellatum* ekstraktının gram-pozitifler üzerindeki yüksek etkinliğini de açıklamaktadır. Ham ekstrakt *C. tropicalis*'e karşı $15,4 \pm 0,5$ mm ve *C. albicans*'a karşı $16,2 \pm 0,3$ mm inhibisyon zonu oluşturmuştur. Ham ekstrakt bakterilere kıyasla funguslara karşı daha düşük anti-mikrobiyal etkinlik sergilemiştir. Bu durum fungusların özellikle kitin ve ergosterol bakımından zengin hücre duvarı ile yakından ilişkilidir. *Candida* türlerinin anti-mikrobiyal madde varlığında hücre duvarında kitin seviyelerini arttırarak direnç gelişimini arttırdığı da bilinmektedir (Walker ve ark., 2013).

Ham ekstraktın standart antibiyotiklerle kıyaslanabilir bu etkinliği içerdiği aktif bileşenlerle açıklanabilir. LC-MS analizi ile saptanan fenolik bileşikler anti-mikrobiyal aktivitenin ortaya çıkmasında önemli bir etkiye sahiptir. İçerikte major bileşik olarak saptanan prokateuik asit, bakterilerin çoğalması üzerinde inhibisyon etkisi göstermekte ve pek çok anti-mikrobiyal bileşiklerle sinerjistik etki göstererek inhibisyonu güçlendirmektedir (Jayaraman ve ark., 2010). LC-MS ile saptanan yüksek oranda bulunan gallik asit ise bakteriyel zarlarda bulunan protein yapıdaki akış pompalarını, arginaz aktivitesini ve folat sentezini inhibe ederek ekstraktın anti-mikrobiyal aktivitesine katkı sağlamaktadır (Pudlo ve ark., 2017). Major bileşikler kadar ekstrakt içeriğindeki minör bileşikler de bu etkinin güçlenmesini sağlamaktadır. Ekstraktta minör oranda saptanan vanilin bakteriyel membran bütünlüğünü bozarak hücre içerisindeki iyonlarının dışarı sızmasına neden olmakta ve hücre içi pH homeostazını engellemektedir (Fitzgerald ve ark., 2004). Ekstrakt

içeriğinde saptanan tüm aktif bileşenlerin kümülatif etkisi sonucunda güçlü bir anti-mikrobiyal aktivite ortaya çıkmaktadır. Farklı ekolojik ortamlarda yetişen *O. umbellatum*'un anti-mikrobiyal etkinliği bazı literatür çalışmaları ile de rapor edilmiştir. Demirkol ve ark. (2017) Ordu'da yayılış gösteren *O. umbellatum* bitkisine ait ekstraktların geniş spektrumlu bir aktivite sergilediğini, *Listeria monocytogenes*'e karşı herhangi bir etkinlik sergilemediğini rapor etmişlerdir. Yiğit ve ark. (2003) Erzincan bölgesinden topladıkları *O. umbellatum*'un *P.aeruginosa*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus*'a karşı herhangi bir etki göstermediğini rapor etmişlerdir. Literatür çalışmalarında rapor edilen bu farklılıklar değişik ekolojik şartlara karşı bitkinin adaptasyonu sürecinde ürettiği sekonder metabolitlerdeki ve düzeylerindeki farklılıklar ile açıklanabilir.

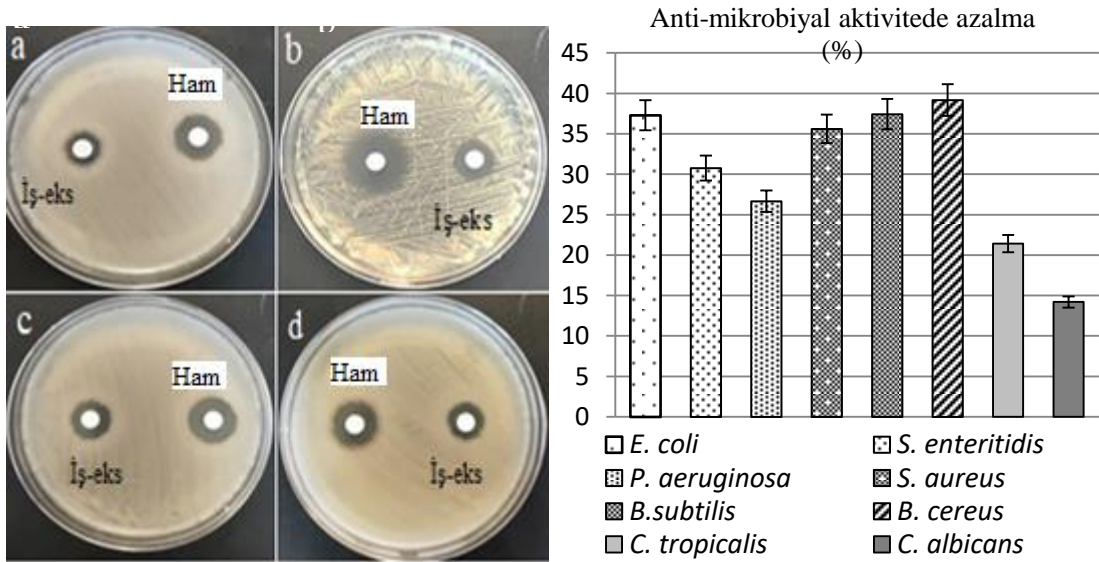
Tablo 4.5. *O. umbellatum* ekstraktının oluşturduğu inhibisyon zonları (mm)

	Mikroorganizma	Ham ekstrakt	Isıl işlem görmüş ekstrakt	Amikasin	Nistatine
Gram negatif	<i>E. coli</i>	12.6±0.4	7.90±0.1	17.9±0.7	ND
	<i>S. enteritidis</i>	11.7±0.3	8.10±0.2	16.5±0.4	ND
	<i>P. aeruginosa</i>	16.5±0.3	12.1±0.4	17.8±0.5	ND
Gram pozitif	<i>S. aureus</i>	21.9±0.7	14.1±0.6	22.5±0.8	ND
	<i>B.subtilis</i>	18.7±0.4	11.7±0.5	21.1±0.6	ND
	<i>B. cereus</i>	17.1±0.9	10.4±0.7	18.3±0.2	ND
Fungus	<i>C. tropicalis</i>	15.4±0.5	12.1±0.4	ND	16.9 ±0.4
	<i>C. albicans</i>	16.2±0.3	13.9±0.2	ND	17.8 ±0.2

Nistatine 30 µg/mL, Amikacin 30 µg/mL, ND: denenmedi

Piştirme sırasında uygulanan ısı işlemi besinlerin fitokimyasal içeriğinde değişimlere neden olmaktadır. LC-MS, ICP-MS ve FTIR analizlerinde ısı işlem uygulamasının *O. umbellatum*'un fitokimyasal içeriğinde değişimlere neden olduğu saptanmıştır. Bu değişimlerle beraber ısı uygulaması *O. umbellatum*'un anti-mikrobiyal aktivitesinde de değişime neden olmuştur. En yüksek inhibisyon zonunun gözlemlendiği *S. aureus*'ta ham ekstrakt 21,9 mm inhibisyon zonu oluştururken ısı işlem görmüş ekstrakt 14,1 mm zon oluşturabilmiştir. Isıl işlem bakterilere karşı elde edilen anti-mikrobiyal aktivitelerde değişen oranlarda azalmaya neden olmuştur. Test edilen tüm bakterilere karşı belirlenen antimikrobiyal aktivitedeki azalmalar Şekil 4.5'te verilmiştir. Anti-mikrobiyal aktivitede gözlenen bu azalma fitokimyasal içerikteki azalma ile doğrudan ilişkilidir. Major bileşenlerden olan ve anti-mikrobiyal etkinliğe sahip olan

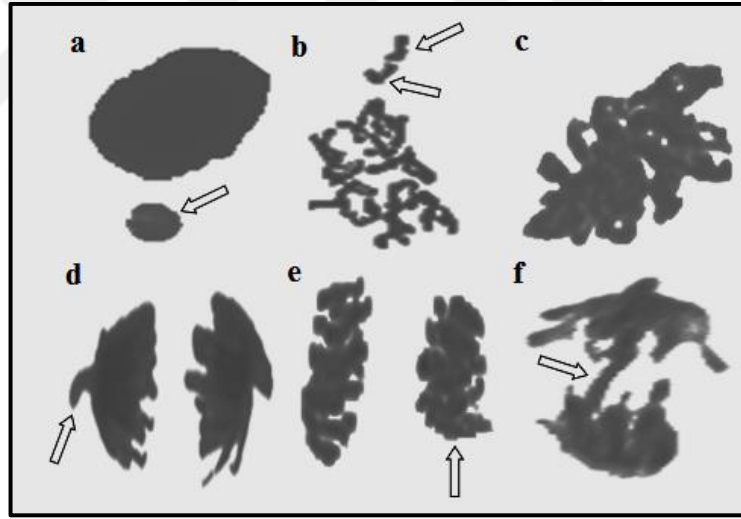
prokateuik asit ve gallik asit içeriğindeki değişimler anti-mikrobiyal aktivitedeki azalmanın en büyük nedenlerindendir. Ham ekstrakta prokateuik asit 53,136 mg/kg oranında bulunurken ısı işlem sonrasında miktarı 5,29 mg/kg olarak saptanmıştır. Benzer azalma gallik asitte de saptanmış ve 41,722 mg/kg olarak saptanan oranı ısı işlem sonrasında 3,046 mg/kg'a gerilemiştir. Fitokimyasal içerikte saptanan tüm fenolik bileşiklerde benzer azalmalar tespit edilmiş ve bu azalmalar anti-mikrobiyal aktiviteyi doğrudan etkilemiştir. Literatürde *O. umbellatum*'un fitokimyasal içeriği ve anti-mikrobiyal aktivitesi üzerine ısı işlemin etkisini araştıran bir çalışma bulunmamakla birlikte pek çok ekstraktın aktivitesinin ısı etkisiyle azaldığı rapor edilmektedir. Ginovyan (2017), *Hypericum alpestre* ekstraktının 60 dakika 60°C'lik ısı uygulaması sonrasında anti-mikrobiyal aktivitesini kaybettiğini gözlemlemişlerdir. Sah ve ark. (2012), 100°C'de uygulanan ısı işlemin farklı bitki ekstraktlarının anti-mikrobiyal aktivite üzerine etkisini araştırmışlar, ısı uygulaması sonrasında *K. pneumoniae*'ye karşı *Allium sativum* ekstraktının geliştirdiği inhibisyon zonununun 26mm'den 17mm'ye azaldığını, 20mm zon sergileyen *Zingiber officinale* ekstraktının anti-mikrobiyal aktivitesini tamamen kaybettiğini rapor etmişlerdir.



Şekil 4.5. Ham ve ısı işlem görmüş (İş-eks) ekstraktların anti-mikrobiyal aktivitesi. *P. aeruginosa* (a), *S. aureus* (b), *C. albicans* (c), *C. tropicalis* (d) ve aktivitedeki azalma oranları (%)

4.3.2. Anti-mutajenik aktivite

Ham ve ısıl işlem uygulanmış *O. umbellatum* ekstraktının anti-mutajenik aktivitesi Tablo 4.6.'da verilmiştir. Kontrol grubu ve sadece ekstrakt uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düşük düzeyde MN ve KA oluşumları dışında ($p>0.05$) herhangi bir anormallik gözlenmezken NaN_3 uygulanan grupta yüksek düzeyde fragment, yapışkan kromozom, vagrant kromozom, kromatinin eşit olmayan dağılımı, köprü ve MN oluşumları gözlenmiştir. NaN_3 uygulanan grupta kromozomal anormallikler arasında en yüksek düzeyde fragment anormallikleri saptanmıştır (Şekil 4.6). NaN_3 kimyasal bir mutajendir ve mutajenitesi azid bileşiğinin organik bir metabolitinin üretimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu metabolit çekirdeğe girerek, DNA ile etkileşerek, genomda mutasyonlara ve karasızlıklara neden olmaktadır (Srivastava ve ark., 2011).



Şekil 4.6. NaN_3 tarafından indüklenen MN ve kromozomal anormallikler. a: MN, b: fragment, c: yapışkan kromozom, d: vagrant kromozom, e: kromatinin eşit olmayan dağılımı, f: köprü)

Ekstraktların anti-mutajenik aktivitesi NaN_3 tarafından indüklenen MN ve kromozomal hasarların sıklığındaki azalma dikkate alınarak belirlenmiştir. Ham ekstrakt NaN_3 tarafından indüklenen anormalliklerde vagrant kromozom dışındaki tüm anormalliklerde %50 üzerinde gerilemeye neden olmuştur. Vagrant kromozomda %43,2 gerileme sağlayan ekstrakt en güçlü anti-mutajenik etkiyi

kromatin eşit olmayan dağılımında %69,8 olarak göstermiştir (Şekil 4.7.). Ekstrakt içeriğinde yoğun olarak saptanan gallik asit elektrofilik mutajenleri temizleyerek ve dış zar taşıyıcılarına bağlanıp mutajenlerin sitozele aktarımını engelleyerek anti-mutajenik aktivite sergilemektedir (Hour ve ark., 1999). LC-MS analizinde ekstrakt içeriğinde tespit edilen kafeik asidin hidroksil radikallerinin oluşumunu önleyerek ve serbest radikal üretimini baskılayarak anti-oksidatif aktivite yoluyla antimutajenik etki sergilediğini bildirmişlerdir (Abotaleb ve ark., 2020). Ekstrakt içeriğinde saptanan protokatekuik asitte önemli anti-mutajenik özelliğe sahiptir. Anter ve ark. (2011) protokatekuik asidin in vitro çalışmalarda anti-genotoksik potansiyele sahip olduğunu, Olvera-Garcia ve ark. (2008) ise protokatekuik asidin nitropiren mutajenitesini inhibe ederek anti-mutajenik aktivite sergilediğini rapor etmişlerdir.

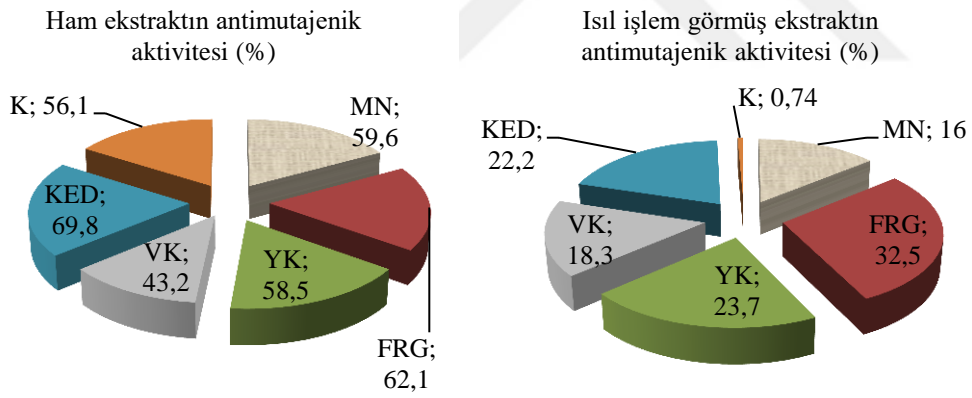
Tablo 4.6. NaN_3 tarafından indüklenen MN ve kromozomal hasar sıklığı üzerine doğal ve işlem görmüş ekstraktların etkisi

Hasarlar	Negatif kontrol	NaN_3 (Pozitif Kontrol)	Ham ekstrakt	Isıl işlem görmüş ekstrakt	Doğal ekstrakt + NaN_3	Isıl işlem görmüş ekstrakt + NaN_3
MN	0,20±0,42 ^d	82,80±8,66 ^a	0,00±0,00 ^d	0,20±0,42 ^d	33,40±8,07 ^c	69,50±6,54 ^b
FRG	0,31±0,17 ^d	83,50±10,68 ^a	0,00±0,00 ^d	0,32±0,16 ^d	31,60±6,45 ^b	56,30±6,17 ^c
YK	0,00±0,00 ^d	62,80±8,13 ^a	0,41±0,13 ^d	0,00±0,00 ^d	26,00±6,31 ^c	47,90±6,59 ^b
VK	0,00±0,00 ^d	51,80±9,87 ^a	0,55±0,19 ^d	0,00±0,00 ^d	29,40±7,37 ^c	42,30±6,65 ^b
KED	0,00±0,00 ^d	38,20±9,90 ^a	0,00±0,00 ^d	0,74±0,21 ^d	11,50±6,62 ^c	29,70±6,62 ^b
K	0,00±0,00 ^d	26,70±8,55 ^a	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	11,70±3,59 ^c	26,50±6,22 ^b

MN: mikronukleus, FRG: fragment, YK: yapışkan kromozom, VK: vagrant kromozom, KED: kromatinin eşit olmayan dağılımı, K: köprü. MN ve kromozomal hasarlar için her bir grupta 1.000 hücre sayılmıştır. Aynı satırda farklı harfler ^(a-d) ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Ekstrakta uygulanan ısı anti-mutajenik aktivitede önemli değişimlere neden olmuştur. Genel olarak tüm anormalliklere karşı ham ekstrakt tarafından sergilenen anti-mutajenik aktivitede önemli değişimler gözlenmiştir. Köprü oluşum sıklığı üzerine ısının etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunurken ($p>0,05$), tüm diğer anormalliklerdeki değişimler istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Ham ekstrakt köprü oluşumunu %56,1 azaltarak anti-mutajenik aktivite sergilerken, ısı işlem

uygulanmış ekstrakt köprü oluşumunu %0,74 oranında azaltmıştır. Kısaca ısı işlem ham ekstraktın köprü oluşumuna karşı sergilediği anti-mutajenik aktivitenin kaybolmasına neden olmuştur. Diğer anormalliklere karşı sergilenen anti-mutajenik aktivitede de ısı uygulaması sonrasında önemli azalmalar gözlenmiştir. Isıl işlem ham ekstraktın kromatinin eşit olmayan dağılımına karşı sergilediği anti-mutajenik aktiviteyi %68,2, MN oluşumlarına karşı gösterdiği anti-mutajenik aktiviteyi ise %73,1 azaltmıştır. Isıl işlemin anti-mutajenik aktiviteyi azaltıcı etkisi fitokimyasal içerikteki azalmalarla doğrudan ilişkilidir. İçerikte saptanan gallik asit, protokatekuik asit ve kafeik asit gibi majör bileşiklerin miktarındaki azalma anti-mutajenik aktiviteye de yansımıştır. Literatürde *O. umbellatum*'un anti-mutajenik aktivitesi üzerine ısı işlemin etkisini araştıran bir çalışma bulunmamakla birlikte pek çok ekstraktın aktivitesinin ısı etkisiyle azaldığı rapor edilmektedir. Wang ve ark. (2001) *Hericium erinaceus* ekstraktının anti-mutajenik aktivitesinin ısı işleminden sonra daha az anti-mutajenik etki sergilediğini ve anti-mutajenik aktivitenin ısıya duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir.



Şekil 4.7. Isıl işlemin anti-mutajenik aktivite üzerine etkisi. MN: mikronukleus, FRG: fragment, YK: yapışkan kromozom, VK: vagrant kromozom, KED: kromatinin eşit olmayan dağılımı, K: köprü.

4.3.3. Anti-proliferatif aktivite

Ham ve ısı işlem uygulanmış *O. umbellatum* ekstraktının anti-proliferatif aktivitesi Tablo 4.7.'de verilmiştir. Her bir grupta toplam 5000 hücre sayılmış ve profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhalarındaki hücreler bölünen hücre olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol grubunda toplam 245 hücre bölünme aşamasında

iken glifosat uygulması ile bu sayı 110'a gerilemiştir. Glifosat hücre bölünmesini durduran, hücre siklusu kontrol noktalarında anormalliğe neden olarak G₂/M geçiş noktasında etki gösteren bir bileşiktir (Marc ve ark., 2004). Hücre siklusu üzerindeki bu etkilerinden dolayı anti-proliferatif çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Ham ve ısıtılmış işlem uygulanmış *O. umbellatum* ekstraktlarında negatif kontrol grubuna kıyasla hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Ham ekstrakt bölünen hücre sayısını 245'den 196'ya azaltarak hücre proliferasyonunda %20 gerileme sağlamıştır. Hücre proliferasyonundaki bu azalma *O. umbellatum* ekstraktlarının anti-proliferatif etkisine işaret etmektedir. Pek çok fenolik bileşik hücre proliferasyonunu azaltıcı etkiye sahiptir. Ham ekstratta yoğun olarak bulunan gallik asit doza bağlı olarak artan bir anti-proliferatif aktivite sergileyen önemli bir bileşiktir (Pan ve ark., 2014). Kafeik asit ise mitokondri membran potansiyelinde değişimlere neden olarak anti-proliferatif aktivite sergilemektedir (Jaganathan, 2012). Ekstrakt içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerin kümülatif etkisi sonucunda ham ekstrakt anti-proliferatif aktivite sergilemektedir. Isıtılmış işlem sonrasında *O. umbellatum* ekstraktının anti-proliferatif aktivitesinde azalma gözlenmiş, ısıtılmış işlem uygulanmış ekstrakt negatif kontrole kıyasla hücre proliferasyonunda %7,6 gerilemeye neden olmuştur. Anti-proliferatif aktivitedeki bu azalma fenolik içerikteki azalma ile doğrudan ilişkilidir.

Tablo 4.7. Ham ve ısıtılmış işlem görmüş *O. umbellatum* ekstraktlarının anti-proliferatif aktivitesi

	Bölünen hücre sayısı*	İnterfazdaki hücre sayısı	MI (%)
Negatif kontrol	245	4755	4,90
Glifosat (Pozitif Kontrol)	110	4890	2,20
Ham ekstrakt	196	4804	3,92
Isıtılmış işlem görmüş ekstrakt	226	4774	4,52

*profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhalarındaki hücre sayısını göstermektedir.

Literatürde *O. umbellatum* ekstraktının anti-proliferatif aktivitesini araştıran bir çalışma bulunmamakla birlikte pek çok doğal bitki ekstraktının hücre proliferasyonu üzerine etkisini rapor eden çalışmalar mevcuttur. Frescura ve ark. (2012) *Luehea divaricata* yaprak ve kabuk ekstraktlarının *A. cepa*'da anti-proliferatif

etki sergilediğini yani hücre bölünmesini inhibe edebilen aktiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.



BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitkiler birçok biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahip doğal besinlerdir. Gıda olarak kullanılan birçok bitki türü çeşitli pişirme süreçlerine tabi tutularak tüketilmektedir. Gıdaların ısı işlemleri biyolojik, fiziksel ve dokusal değişikliklere, fitokimyasal içeriklerinde farklılıklara ve biyolojik aktivitelerde azalmaya veya artışa neden olmaktadır. Bitkisel ekstraktların fitokimyasal içeriklerini ve biyolojik aktivitelerini araştıran birçok çalışma olmasına rağmen, pişirme işlemi ile ekstraktların fitokimyasal içerikleri ve biyolojik aktivitelerindeki değişimleri araştıran çalışma sayısı istenilen düzeyde değildir. Özellikle pişirilerek tüketilen bitkilerle yapılan çalışmalarda ısının etkisi göz ardı edilmemelidir. Bu çalışmada, Giresun'da toprak altı ve üstü kısımları gıda olarak tüketilen *O. umbellatum*'un ham ve ısı işlem uygulanmış ekstraktlarının fitokimyasal parmak izi ve biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. Isıl işlem bitki içeriğindeki U, Al ve Co gibi metallerin derişiminde azalmaya neden olarak bir avantaj sağlarken, özellikle gallik asit gibi önemli fenolik bileşiklerin düzeyinde ciddi azalmalara neden olarak dezavantaj sağlamıştır. *O. umbellatum*'un hem ham hem de ısı işlem görmüş ekstraktının sitotoksik ve mutajenik etki göstermeden anti-oksidan, anti-mikrobiyal, anti-mutajenik ve anti-proliferatif etki sergilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte ısı işlem uygulaması sonrasında biyolojik aktivitelerde önemli kayıplar olduğu belirlenmiş ve bu kayıplar fenolik bileşikler dahil olmak üzere fitokimyasal içerikteki azalmalarla ilişkilendirilmiştir.

Bitkisel besinler günlük diyetimizin vazgeçilmez bir parçası olduğu için, fitokimyasalları korumak için en nazik pişirme yöntemleri ve bu yöntemlerin fitokimyasallar üzerindeki etkileri araştırılmalıdır. Diyabet, kanser ve alzheimer gibi kronik hastalıklardaki artışlara karşı önemli koruma sağlayan ve zengin fitokimyasal içeriğe sahip bitkisel besinler detaylı olarak araştırılmalı ve besin değerini koruyacak alternatif pişirme yöntemleri geliştirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abacan, S. F., Hurtada, W. A., & Devanadera, M. A. R. 2017. Effects of cooking time, temperature, and salt concentration on the phenolic content and antioxidant activity of selected edible mushrooms. *Int. Food Res. J.*, 24(5): 2028-2032.
- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. 2020. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the treatment of cancer. *Biomolecules*, 10(2): 221.
- Akgeyik, A. U., Yalçın, E., & Çavuşoğlu, K. 2021. *Ornithogalum umbellatum* L. ekstraktının fitokimyasal içerikle ilişkili antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi. *GBAD.*, 10(3): 188-200.
- Anter, J., Romero-Jiménez, M., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro- Pulido, M., Analla, M., Alonso-Moraga, Á., & Muñoz-Serrano, A. 2011. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *J. Med. Food.*, 14: 276–283.
- Asia, F., Gondal, S., Shahi, Z.A., Ahmad, H.K., & Khan, Z.I. 2010. Sodium, potassium and magnesium dynamics in soil- plant-animal continuum. *Pak. J. Bot.*, 42(4): 2411-2421.
- Bai, J., Zhang, Y., Tang, C., Hou, Y., Ai, X., Chen, X., Yi, Z., Xiaobo, W., & Meng, X. 2021. Gallic acid: pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. *Biomed. Pharm.*, 133: 110985.
- Bakır Çilesizoğlu, N., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K. & Sipahi Kuloğlu, S. 2022. Qualitative and quantitative phytochemical screening of *Nerium oleander* L. extracts associated with toxicity profile. *Sci. Rep.*, 12: 21421.
- Boles, J. S., Crerar, D. A., Grissom, G., & Key, T. C. 1988. Aqueous thermal degradation of gallic acid. *GCA.*, 52(2): 341-344.
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. 2020. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 25(6): 1340.
- Burmeister, A., Bondiek, S., Apel, L., Kuhne, C., Hillebrand, S., & Fleischmann, P. 2011. Comparison of carotenoid and anthocyanin profiles of raw and boiled *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja* tubers. *J. Food Compos. Anal.*, 24: 865–872.

- Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gerardin, C., Paris, C., ... & Ghoul, M. 2017. Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids. *J. Food Process. Preserv.*, 41(5): 13203.
- Cheyrier, V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 223–229.
- Demirkol, M., Çelik, Ö.F., & Tarakçı, Z. 2017. Ordu ilinde yetişen sakarca (*Ornithogalum umbellatum*) bitkisinin antibakteriyel aktivitesi ve toplam fenolik madde içeriği. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Derg.*, 7(2): 312-318.
- Deyalage, S. T., Wickramasinghe, I., Amarasinghe, N., & Thilakarathna, G. 2021. Influence of cooking methods on antioxidant activities of selected leafy vegetables *Gymnema lactiferum*, *Wattakaka volubilis*, and *Argyrea populifolia* in Sri Lanka. *Int. J. Food Sci.*, 2021: 1-8.
- Durhan, B., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., & Acar, A. 2021. Phytochemical screening and radical scavenging activity of green coffee bean extract: multiple-protective efficacy against Bisphenol A. *Gaziosmanpasa J. Sci. Res.*, 10(3): 256-275.
- Durhan, B., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., & Acar, A. 2022. Molecular docking assisted biological functions and phytochemical screening of *Amaranthus lividus* L. extract. *Sci. Rep.*, 12(1): 1-16.
- Efe, E., Yalcin, E., & Cavusoglu, K. 2019. Antimutagenic and multi-biological activities of *Smilax excelsa* L. fruit extract. *Cumhuriyet Sci. J.*, 40(2): 440-446.
- Faller, A.L.K. & Fialho, E. 2009. The antioxidant capacity and polyphenol content of organic and conventional retail vegetables after domestic cooking. *Food Res. Int.*, 42: 210–215.
- Fitzgerald, D.J., Stratford, M., Gasson, M.J., Ueckert, J., Bos, A., & Nabad, A. 2004. mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *J. Appl. Microbiol.*, 97(1): 104-113.
- Frescura, V. D. S., Laughinghouse IV, H. D., & Tedesco, S. B. 2012. Antiproliferative effect of the tree and medicinal species *Luehea divaricata* on the *Allium cepa* cell cycle. *Caryologia*, 65(1): 27-33.
- Gao, Y., Xia, W., Shao, P., Wu, W., Chen, H., Fang, X., ... & Gao, H. 2022. Impact of thermal processing on dietary flavonoids. *Curr. Opin. Food*, 100915.
- Ginovyan, M. M. 2017. Effect of heat treatment on antimicrobial activity of crude extracts of some Armenian herbs. *Proceedings of the YSU B: Chem. Biol. Sci.*, 51(243): 113-117.

- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., & Rupasinghe, H. P. V. 2018. Influence of boiling, steaming and frying of selected leafy vegetables on the in vitro anti-inflammation associated biological activities. *Plants*, 7(1): 22.
- Güzelsoy, N. A., Uçurum, O., Tokat, E., Tan, A., Ay, S. T. & Özbek, K. 2017. Nutritional properties of some wild edible plant species in Turkey. *Anadolu J. AARI.*, 27(2): 39-45.
- Hour, T.C., Liang, Y.C., Chu, I.S., Lin, J.K. 1999. Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts, (-)epigallocatechin-3-gallate, gallic acid and caffeine. *Food Chem. Toxicol.*, 37: 569–579.
- Imsic, M., Winkler, S., Tomkins, B., & Jones, R. 2010. Effect of storage and cooking on beta-carotene isomers in carrots (*Daucus carota* L. cv. ‘Stefano’). *J. Agric. Food Chem.*, 58 : 5109–5113.
- Jaganathan, S. K. 2012. Growth inhibition by caffeic acid, one of the phenolic constituents of honey, in HCT 15 colon cancer cells. *Sci. World J.*, 2-8.
- Jamali, N., Mostafavi-Pour, Z., Zal, F., Kasraeian, M., Poordast, T., Ramezani, F., & Zare, R. 2019. combination effect of caffeine and caffeic acid treatment on the oxidant status of ectopic endometrial cells separated from patients with endometriosis. *Iranian J. Med. Sci.*, 44(4): 315.
- Jayaraman, P., Sakharkar, M.K., Lim, C.C., Tang, T.H., & Sakharkar, K.R. 2010. activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Int. J. Biol. Sci.*, 6(6): 556–568.
- Johnson, R., Vishwakarma, K., Hossen, M. S., Kumar, V., Shackira, A. M., Puthur, J. T., ... & Hasanuzzaman, M. 2022. Potassium in plants: Growth regulation, signaling, and environmental stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.*, 172: 56-69.
- Khayyat, S. 2020. Thermal, photo-oxidation and antimicrobial studies of linalyl acetate as a major ingredient of lavender essential oil. *Arabian J. Chem.*, 13(1): 1575-1581.
- Kuloğlu, S. S., Yalçın, E., Çavuşoğlu, K., & Acar, A. 2022. Dose-dependent toxicity profile and genotoxicity mechanism of lithium carbonate. *Sci. Rep.*, 12(1): 1-12.
- Lahlali, R., Song, T., Chu, M., Yu, F., Kumar, S., Karunakaran, C., & Peng, G. 2017. Evaluating changes in cell-wall components associated with clubroot resistance using fourier transform infrared spectroscopy and RT-PCR. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(10): 2058.
- Lampe, J.W. 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70:475–490.

- Loizzo, M. R., Pugliese, A., Bonesi, M., De Luca, D., O'Brien, N., Menichini, F., & Tundis, R. 2013. Influence of drying and cooking process on the phytochemical content, antioxidant and hypoglycaemic properties of two bell *Capsicum annum* L. cultivars. *Food Chem. Toxicol.*, 53: 392-401.
- Maghsoudlou, Y., Asghari Ghajari, M., & Tavasoli, S. 2019. Effects of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of quince fruit and its tisane's sensory properties. *JFST.*, 56(5): 2365-2372.
- Maiani, G., Caston, M.J.P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodon, I.G., Bysted, A., ... & Ulrich, S. 2009. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, 53: 194–218.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., & Jimenez, L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79: 727–747.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., & Lerici, C.R. 2000. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. *Trends Food Sci. Technol.*, 11: 340–346.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., & Bellé, R. 2004. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol. Cell*, 96(3): 245-249.
- Meléndez-Martínez, A. J., Mandić, A. I., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G. I. A., Brnčić, M., ... & O'Brien, N. 2022. A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: Status quo, applications, patents, and research needs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 62(8): 1999-2049.
- Miles, P.H., Wilkinson, N.S., & McDowell, L.R. 2001. *Analysis of Minerals for Animal Nutrition Research*, 3rd ed., Gainesville, USA.
- Moyo, S. 2016. Effects of cooking and drying on the total phenolic, total flavonoid content, antioxidant and antibacterial activity of *Cleome gynandra* (Spider Plant). I International Conference on Advances in Science, Engineering, Technology and Natural Resources (ICASETNR-16) Parys (South Africa).
- Nnabugwu, A. E., Uchenna, A. P., Uchenna, I. C., & Kelechukwu, D. M. 2017. Impact of various cooking methods on the micronutrient compositions of selected legumes in Eastern Nigeria. *Int. J. Biol. Res.*, 5(1): 10-14.
- Olvera-García, V., Castaño-Tostado, E., Rezendiz-Lopez, R.I., Reynoso-Camacho, R., González de Mejía, E., Elizondo, G., & Loarca-Piña, G. 2008. *Hibiscus sabdariffa* L. extracts inhibit the mutagenicity in microsuspension assay and the proliferation of HeLa cells. *J. Food Sci.*, 73: 75–81.
- Palermo, M., Pellegrini, N., & Fogliano, V. 2014. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, 94(6): 1057-1070.

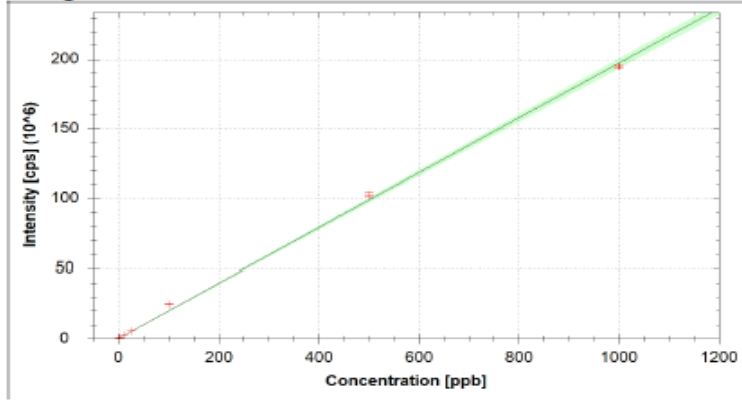
- Pan, J., Yin, D., Ma, L., Zhao, Y., Zhao, J., & Guo, L. 2014. Dimer and tetramer of gallic acid: facile synthesis, antioxidant and antiproliferative activities. *Lett. Drug Des. Discov.*, 11(1): 27-32.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.*, 5.
- Perla, V., Holm, D.G., & Jayanty, S.S. 2012. Effects of cooking methods on polyphenols, pigments and antioxidant activity in potato tubers. *LWT–Food Sci. Technol.*, 45: 161–171.
- Petrovska, B.B. 2012. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.*, 6(11)
- Pudlo, M., Demougeot, C., & Girard-Thernier, C. 2017. Arginase inhibitors: a rational approach over one century. *Med. Res. Rev.*, 37: 475–513.
- Rat, M. M., Gavaric, N. S., Kladar, N. V., Andric, A. M., Anackov, G. T., & Bozin, B. N. 2016. The phenolics of the *Ornithogalum umbellatum* L.(Hyacinthaceae): phytochemical and ecological characterization. *Chem. Biodivers.*, 13(11): 1551-1558.
- Rawson, A., Hossain, M.B., Patras, A., Tuohy, M., & Brunton, N. 2013. Effect of boiling and roasting on the polyacetylene and polyphenol content of fennel (*Foeniculum vulgare*) bulb. *Food Res. Int.*, 50: 513–518.
- Renda, G., Özel, A., Turumtay, E. A., Barut, B., Korkmaz, B., Ayvaz, M. Ç., & Demir, A. 2019. Comparison of phenolic profiles and antioxidant activity of three *Ornithogalum* L. species. *TJB.*, 44(3): 299-306.
- Rice-Evans, C.A, Miller, N.J., & Paganga, G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 20: 933-956.
- Ross, J.A., & Kasum, C.M. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Ann. Rev. Nutr.*, 22: 19–34.
- Roy L. G., & Urooj A. 2013. Antioxidant potency, pH and heat stability of selected plant extracts. *J. Food Biochem.*, 37(3): 336–342.
- Sah, P., Al-Tamimi, B., Al-Nassri, N., & Al-Mamari, R. 2012. Effect of temperature on antibiotic properties of garlic (*Allium sativum* L.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *AJB.*, 11(95): 16192-16195.
- Sánchez-Mundo, M. L., Escobedo-Crisantes, V. M., Mendoza-Arvizu, S., & Jaramillo-Flores, M. E. 2016. Polymerization of phenolic compounds by

- polyphenol oxidase from bell pepper with increase in their antioxidant capacity. *CyTA-J. Food*, 14(4): 594-603.
- Srivastava, P., Marker, S., Pandey, P., & Tiwari, D. K. 2011. Mutagenic effects of sodium azide on the growth and yield characteristics in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *AJPSKY.*, 10(3): 190-201.
- Sun, L., Zhuang, Y., & Bai, X. 2011. Effects of boiling and microwaving treatments on nutritional characteristics and antioxidant activities of *Agaricus blazei* Murril. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 46(6): 1209-1215.
- Sun, X., Sarteshnizi, R. A., & Udenigwe, C. C. 2022. Recent advances in protein–polyphenol interactions focusing on structural properties related to antioxidant activities. *Curr. Opin. Food Sci.*, 45: 100840.
- Sun, Q., Du, M., Navarre, D. A., & Zhu, M. 2021. Effect of cooking methods on bioactivity of polyphenols in purple potatoes. *Antioxidants*, 10(8): 1176.
- Steinhilber, D. 1999. 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited. *Curr. Med. Chem.*, 6(1): 71-86
- Stewart, A.J., Bozonnet, S., Mullen, W., Jenkins, G.I., Lean, M.E.J. & Crozier, A. 2000. Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2663–2669.
- Stintzing, F.C. & Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanidins and betalains in plants, foods, and in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, 15: 19–38.
- Şengün, İ.Y. 2018. Öztürk, B. Bitkisel kaynaklı bazı doğal antimikrobialer. *Anadolu Ün. Bil. Tek. Derg.-C.*, 7(2): 256-276, 2018.
- Şimşek, A., Şimşek A., Demirkol, M., & Turan, E. 2017. Macro, Trace and toxic element of 4 different edible wild plants from Karadeniz region. *Int. J. Sec. Met.*, 4(3): 225-237.
- Temiz, M. A. 2021. Investigation of phenolic composition, antioxidant capacity, and antidiabetic effect of *Ornithogalum lanceolatum* L.: An in vitro study. *IJSM.*, 8(2): 94-103.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. 2013. Stability of essential oils: a review. *CRFSFS.*, 12(1): 40-53.
- Van Boekel, M., Fogliano, V., Pellegrini, N., Stanton, C., Scholz, G., Lalljie, S., ...& Gerhard, E. 2003. A review on the beneficial aspects of food processing. *Nutr. Food Res.*, 54: 1215–1247.

- Yalçın, C., Yılmaz Sarıaltın, S., & Polat, D. 2020. Quantification of phenolic and flavonoid contents and some biological activities of *Ornithogalum sigmoideum* Freyn & Sint. J. Pharm. Res., 24(4).
- Yiğit, N., Yiğit, D., Özgen, U., Kandemir, A., & Ayyıldız, A. 2003. Bazı bitki ekstraktlarının (*Laurocerasus officinalis*, *Rhododendron luteum*, *Rhododendron pontificum*, *Sambucus ebulus*, *Muscari fennifolium*, *Muscari masmeganus*, *Ornithogalum sphaerocarpum*, *Ornithogalum umbellatum*, *Mentha longifolia*, *Prangos ferulacea*, *Galium verum*, *Salvia limbata*, *Artemisia austriaca*) antibakteriyel aktiviteleri üzerine bir araştırma. Turk. Mikrobiyol. Cem. Derg., 33: 269-272.
- Zhang, J., Ji, R., Hu, Y., Chen, J., & Ye, X. 2011. Effect of three cooking methods on nutrient components and antioxidant capacities of bamboo shoot (*Phyllostachys praecox* C.D. Chu et C.S. Chao). J. Zhejiang Univ.–Sci. B., 12: 752–759.
- Wachtel-Galor, S., Wong, K.W., & Benzie, I.F.F. 2008. The effect of cooking on *Brassica* vegetables. Food Chem., 110: 706–710.
- Walker, L.A., Gow, N.A., & Munro, C.A. 2013. Elevated chitin content reduces the susceptibility of *Candida* species to caspofungin. Antimicrob. Agents Chemother., 57: 146–154.
- Wang, J. C., Hu, S. H., Lee, W. L., & Tsai, L. Y. 2001. Antimutagenicity of extracts of *Hericium erinaceus*. KJMS., 17(5): 230-238.

EK. 1. Mg ve Na elementlerine ait kalibrasyon grafikleri

24Mg



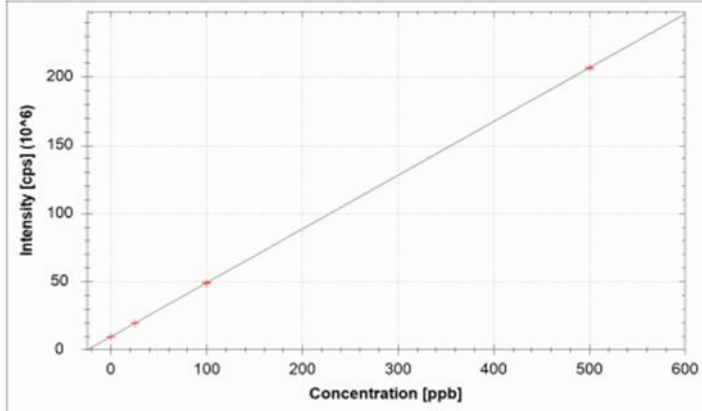
$$f(x) = 196923.6461 \cdot x + 271072.8256$$

$$R^2 = 0.9988$$

$$\text{BEC} = 1.377 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.0581 \text{ ppb}$$

23Na



$$f(x) = 394163.4023 \cdot x + 9631281.1941$$

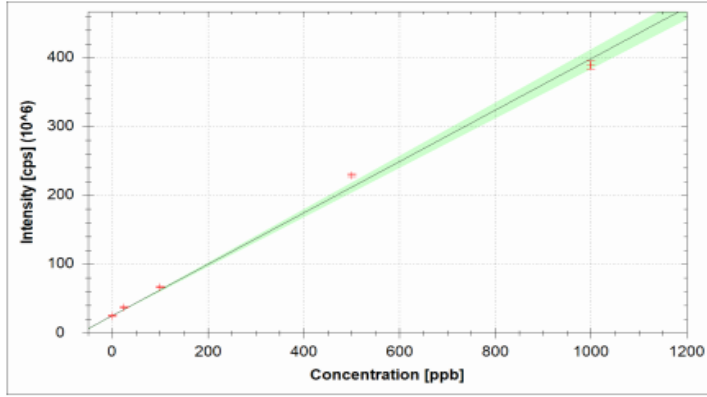
$$R^2 = 1.0000$$

$$\text{BEC} = 24.435 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.7607 \text{ ppb}$$

EK. 2. K ve Fe elementlerine ait kalibrasyon grafikleri

39K



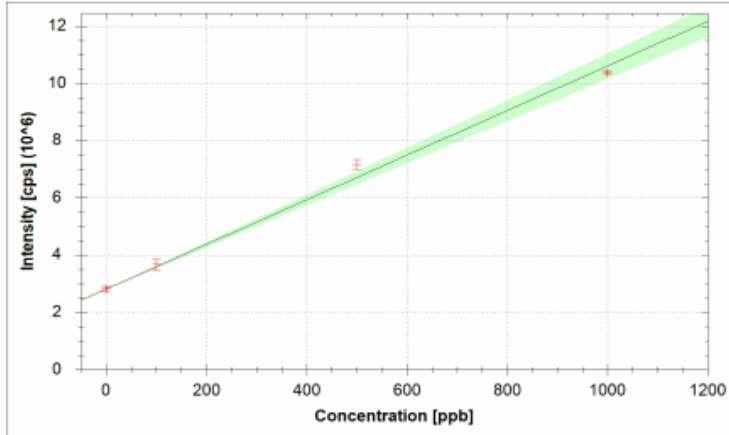
$$f(x) = 373017.8438 \cdot x + 25145851.7724$$

$$R^2 = 0.9958$$

$$\text{BEC} = 67.412 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 3.3258 \text{ ppb}$$

57Fe



$$f(x) = 7793.0499 \cdot x + 2815913.3026$$

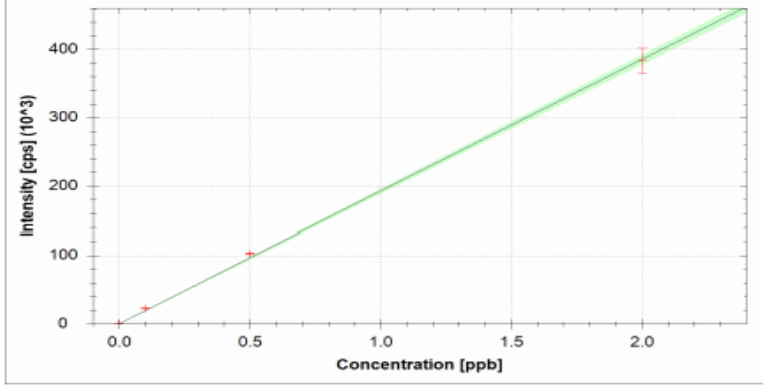
$$R^2 = 0.9927$$

$$\text{BEC} = 361.336 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 39.8940 \text{ ppb}$$

EK. 3. U ve Zn elementlerine ait kalibrasyon grafikleri

238U



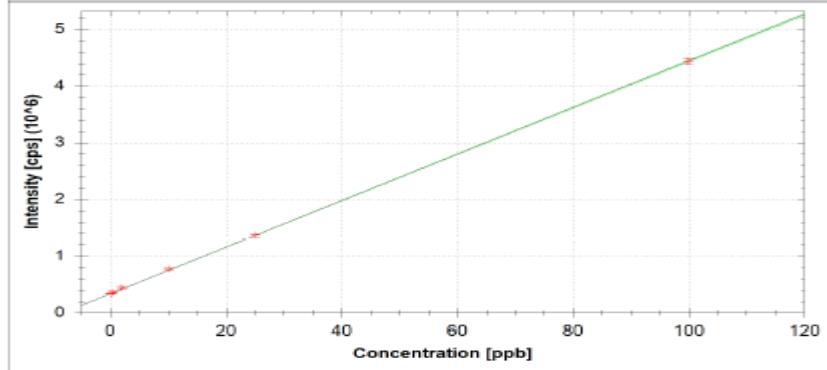
$$f(x) = 192582.8969 \cdot x + 186.6687$$

$$R^2 = 0.9994$$

$$\text{BEC} = 0.001 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.0007 \text{ ppb}$$

66Zn



$$f(x) = 41099.1835 \cdot x + 335448.2979$$

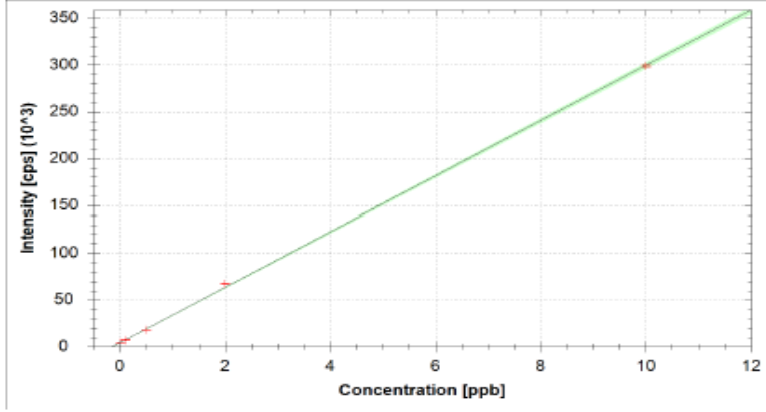
$$R^2 = 0.9999$$

$$\text{BEC} = 8.162 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.3230 \text{ ppb}$$

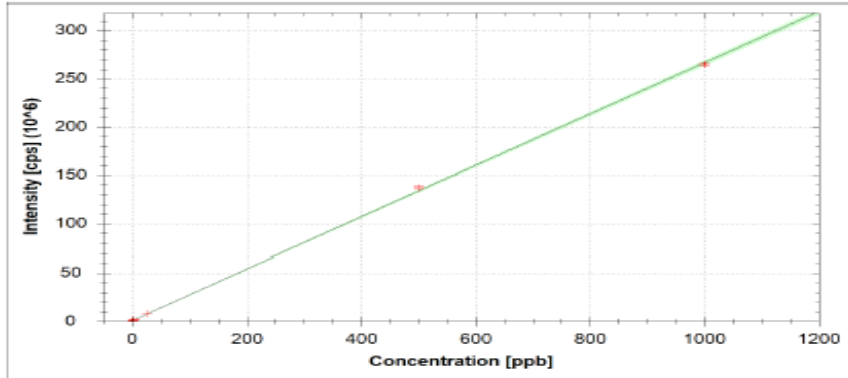
EK. 4. As ve Al elementlerine ait kalibrasyon grafikleri

75As



$$f(x) = 29536.6230 \cdot x + 4420.8056$$
$$R^2 = 0.9997$$
$$\text{BEC} = 0.150 \text{ ppb}$$
$$\text{LoD} = 0.0233 \text{ ppb}$$

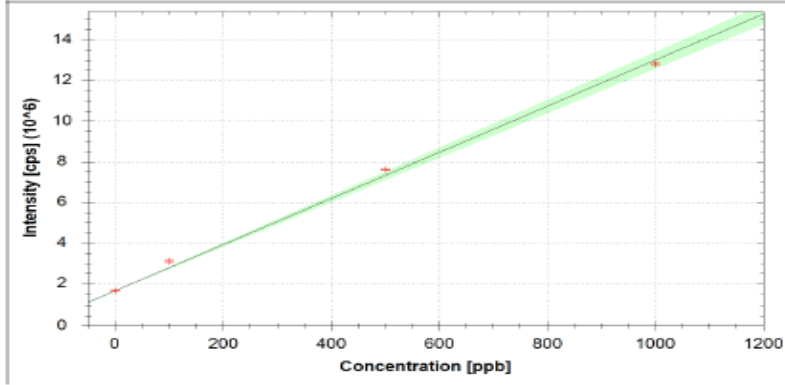
27Al



$$f(x) = 265704.6840 \cdot x + 1039181.9563$$
$$R^2 = 0.9998$$
$$\text{BEC} = 3.911 \text{ ppb}$$
$$\text{LoD} = 1.5832 \text{ ppb}$$

EK. 5. Ca ve Co elementlerine ait kalibrasyon grafikleri

44Ca



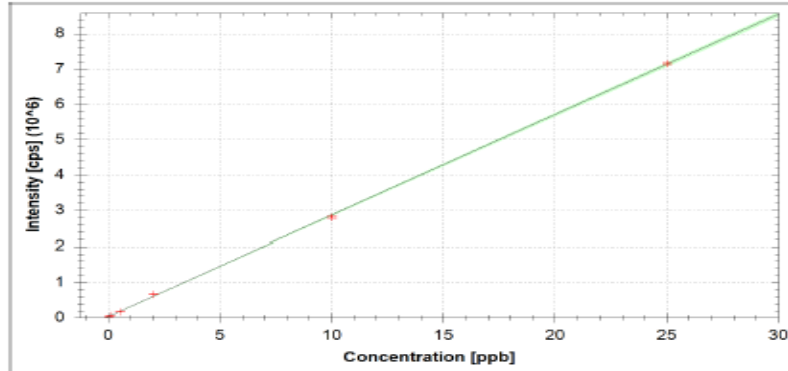
$$f(x) = 11359.0361 \cdot x + 1643265.3336$$

$$R^2 = 0.9971$$

$$\text{BEC} = 144.666 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 12.8948 \text{ ppb}$$

59Co



$$f(x) = 283974.0134 \cdot x + 36102.2781$$

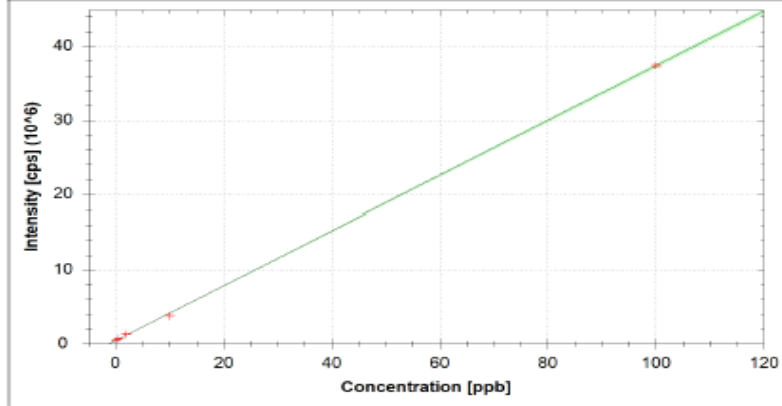
$$R^2 = 0.9998$$

$$\text{BEC} = 0.127 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.0067 \text{ ppb}$$

EK. 6. Mn ve Cu elementlerine ait kalibrasyon grafikleri

55Mn



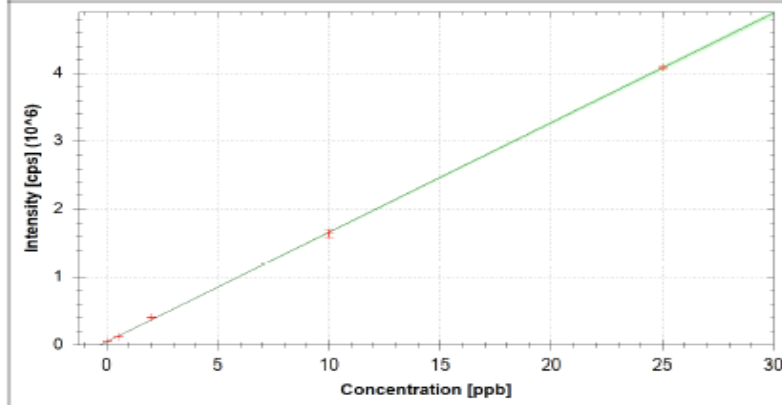
$$f(x) = 368983.9806 \cdot x + 466421.8544$$

$$R^2 = 0.9999$$

$$\text{BEC} = 1.264 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.1681 \text{ ppb}$$

63Cu



$$f(x) = 161266.8849 \cdot x + 47557.3400$$

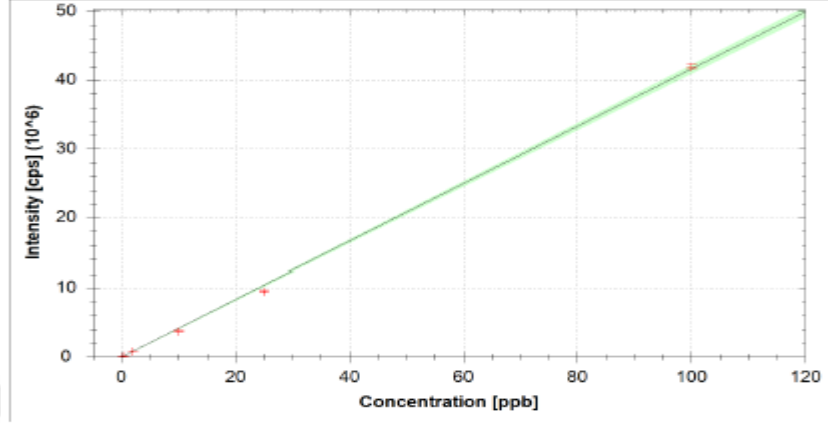
$$R^2 = 0.9998$$

$$\text{BEC} = 0.295 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.0224 \text{ ppb}$$

EK. 7. Sr ve Cd elementlerine ait kalibrasyon grafikleri

88Sr



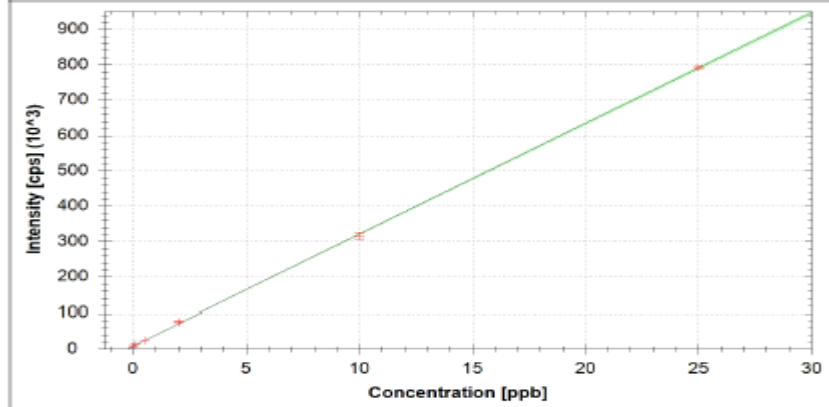
$$f(x) = 415977.8817 \cdot x + 14118.0445$$

$$R^2 = 0.9992$$

$$\text{BEC} = 0.034 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.0013 \text{ ppb}$$

111Cd



$$f(x) = 31315.1925 \cdot x + 7932.5509$$

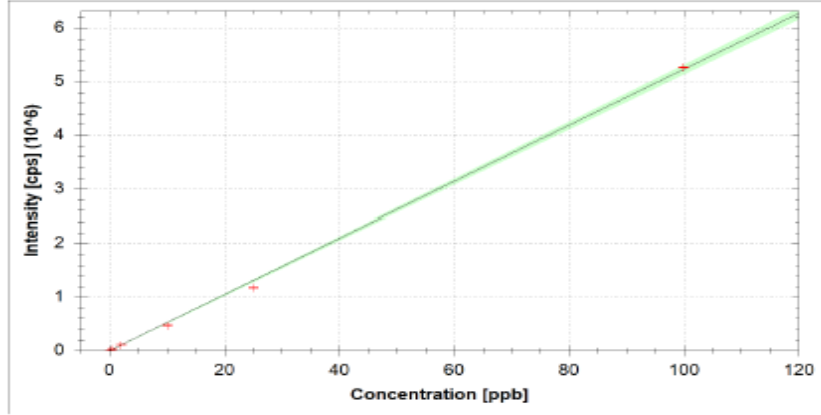
$$R^2 = 0.9998$$

$$\text{BEC} = 0.253 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.0176 \text{ ppb}$$

EK. 8. Ba elementine ait kalibrasyon grafikleri

¹³⁷Ba



$$f(x) = 52281.0574 \cdot x + 2100.1884$$

$$R^2 = 0.9990$$

$$\text{BEC} = 0.040 \text{ ppb}$$

$$\text{LoD} = 0.0141 \text{ ppb}$$

EK. 9. Fenolik bileşiklerin SRM iyon ve enerjileri

Parent	Product	CE	Polarity	Name	Parent	Product	CE	Polarity	Name
137,14	65,51	35	-	Salisilik Asit	303,0	126,2	23	--	Taksifolin
	93,26	18	--			285,5	15	--	
609,37	300,6	38	--	Rutin	228,98	107,2	22	+	Rezveratrol
	301,7	34	--			135,1	14	+	
137,9	66,6	38	--	p_Hidroksi Benzoik Asit	289,2	203,9	22	--	Kateşin
	94,6	17	--			245,7	17	--	
300,9	229,7	28	--	Ellagic Asit	291,5	123,3	15	+	Epikateşin
153,808	110,4	17	-	Protekaseuik asit		139,3	16	+	
	92,5	27	-		136,9	92,25	25	--	protekateuik aldehit
163,9	94,3	33	--	p-Kumarik Asit		108,2	25	--	
	120,2	17	--		150,91	92,3	23	--	Vannilin
539,1	275,8	22	--	Oleuropelin		136,1	16	--	
	377,5	16	--		359,18	134,3	44	--	Rozmarinik Asit
169,7	80,5	25	--	Gallik Asit		162,2	20	--	
	126,2	16	--		183,07	77,3	23	+	Siringic asit
179,7	135,2	27	--	Kafeik Asit		123,2	13	+	
	136,2	18	--		193,35	134,1	17	--	Ferulik Asit
301,11	151,1	24	--	Kuersetin		178,00	15	--	
	179,1	20	--		286,97	153,00	33	+	Kaempherol
				165,00		28	+		

EK. 10. LC-MS/MS kalibrasyon grafiği verileri

	Denklem	R ²	Linear Range
Gallik Asit	$Y = -16964.4 + 234497 * X$	0.9982	0,25-5 ppm
Prokateuik Asit	$Y = -28378.6 + 232816 * X$	0.9993	0,25-5 ppm
Prokateuik Aldehit	$Y = 90660.4 + 2.85956e+006 * X$	0.9984	0,25-5 ppm
Kateşin	$Y = -2.11473e+006 + 3.20689e+007 * X$	0.9970	0,25-5 ppm
Epikateşin	$Y = -2.33356e+006 + 3.4355e+007 * X$	0.9973	0,25-5 ppm
Kafeik Asit	$Y = -80096.6 + 2.239e+006 * X$	0.9959	0,25-5 ppm
Vannilin	$Y = -281187 + 2.22788e+006 * X$	0.9993	0,25-5 ppm
Taxifolin	$Y = 47858.4 + 5.31659e+006 * X$	0.9955	0,25-5 ppm
p_kumarik Asit	$Y = -15928.6 + 265401 * X$	0.9983	0,25-5 ppm
Ferulik Asit	$Y = 1.73171e+007 * X$	0.9982	0,25-5 ppm
Rozmarinik Asit	$Y = -597782 + 6.80108e+006 * X$	0.9977	0,25-5 ppm
4_OH_Benzoik Asit	$Y = 1.00232e+006 + 9.692e+006 * X$	0.9951	0,25-5 ppm
Oleuropein	$Y = -300895 + 8.57721e+006 * X$	0.9969	0,25-5 ppm
Salisilik Asit	$Y = 98316 + 1.08858e+007 * X$	0.9968	0,25-5 ppm
Rutin	$Y = -6.24149e+006 + 1.18077e+008 * X$	0.9968	0,25-5 ppm
Rezveratrol	$Y = -987487 + 1.89813e+007 * X$	0.9992	0,25-5 ppm
Ellagic Asit	$Y = -77482.6 + 4.44093e+006 * X$	0.9958	0,25-5 ppm
Kuersetin	$Y = -2.23688e+006 + 1.91417e+007 * X$	0.9990	0,25-5 ppm
Kaempferol	$Y = -7.30245e+006 + 4.80734e+007 * X$	0.9999	0,25-5 ppm

ÖZGEÇMİŞ

Aytül UZUN AKGEYİK 2008 yılında başladığı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2012 yılında bitirdi. 2016 yılında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalından mezun oldu. 2019 yılında Yozgat Bozok Üniversitesi'ne Öğretim görevlisi olarak atandı. 2017 yılında kayıtladığı Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalındaki Doktora eğitimini ise Ağustos 2023 yılında bitirdi.