

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FISTIK ÇAMI KABUĞUNDAN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN
BASINÇLI SICAK SU EKSTRAKSİYONU İLE KAZANILMASI**

Kübra DEMİRCİ

Yüksek Lisans Tezi

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2023

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**FISTIK ÇAMI KABUĞUNDAN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN
BASINÇLI SICAK SU EKSTRAKSİYONU İLE KAZANILMASI**

Tez Yazarı
Kübra DEMİRCİ

Danışman
Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI

ŞUBAT 2023
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Başlığı:	Fıstık Çamı Kabuğundan Biyoaktif Bileşenlerin Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu İle Kazanılması
Yazarı:	Kübra DEMİRCİ
İlk Teslim Tarihi:	28.12.2022
Savunma Tarihi:	03.02.2023

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman:	Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	<i>İmza</i> Onayladım
Başkan:	Doç. Dr. Ayşe BİÇER İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	Onayladım
Üye:	Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza

Prof. Dr. Burhan ERGEN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Fıstık Çamı Kabuğundan Biyoaktif Bileşenlerin Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu İle Kazanılması” Başlıklı Yüksek Lisans Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

03.02.2023

Kübra DEMİRCİ



ÖNSÖZ

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, Yüksek lisans eğitim sürecinde ve tez çalışmam boyunca her konuda bilgisini, tecrübesini ve sonsuz sabrını benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. M. Şaban TANYILDIZI'na teşekkürü bir borç bilirim. Deneysel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Kübra ŞİŞLIOĞLU'na ve Arş. Gör. Kübra KOÇAK'a teşekkür ederim.

Tez sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve motive eden arkadaşlarıma teşekkür ederim. Her konuda yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP) tarafından **MF.21.67** protokol numaralı proje ile desteklenmiştir.

Kübra DEMİRCİ
ELAZIĞ, 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyoaktif Bileşikler	3
2.1.1. Fenolik Bileşikler	3
2.1.2. Flavonoidler	4
2.2. Bitkilerin Antioksidan Potansiyeli.....	4
2.3. Bitkilerde Ekstraksiyon Yöntemleri	6
2.3.1. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu	11
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Materyal temini ve Örnek Hazırlama	24
3.2. Fıstık çamı Kabuğunda Temel Analizler	24
3.2.1. Uçucu madde ve Kül Tayini.....	25
3.2.2. Ekstraktif Maddelerin Belirlenmesi	26
3.2.3. Hemiselüloz Tayini	26
3.2.4. Lignin Tayini.....	27
3.2.5. Selüloz Tayini	28
3.3. Ekstrakta yapılan Analizler	28
3.3.1. Toplam Fenolik İçerik Tayini.....	28
3.3.2. Toplam Flavonoid Miktarı Tayini	29
3.3.3. Antioksidan Aktivite Tayini	30
3.4. Ekstraksiyon işlemleri	32
3.4.1. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu	32
3.4.2. Sokslet Ekstraksiyonu	33
3.4.3. Solvent Ekstraksiyonu	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. Fıstık çamı kabuğunun karakterizasyon sonuçları.....	35
4.2. Basınçlı Sıcak Su Sisteminde Biyoaktif Bileşenlerin Ekstraksiyonu	35
4.2.1. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Optimizasyonu	36
4.2.2. Toplam Flavonoid Madde İçeriğinin Optimizasyonu	41
4.2.3. Antioksidan Etkinin Optimizasyonu	45
4.2.4. Optimum şartlarda yapılan deneylerde biyoaktif bileşenlerin değişimi	49
5. SONUÇLAR.....	52
KAYNAKLAR	54

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

Fıstık Çamı Kabuğundan Biyoaktif Bileşenlerin Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu İle Kazanılması

Kübra DEMİRCİ

Yüksek Lisans Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Şubat 2023, Sayfa: xi + 59

Bu çalışmada basınçlı sıcak su ekstraksiyon sistemi (BSSE) kullanılarak fıstık çam ağacı kabuğundaki biyoaktif bileşiklerin elde edilmesi incelenmiştir. Çalışmada Aydın ili Çine yöresinden temin edilen ağaç kabukları kullanılmıştır. Fıstık çamı ağaç kabuklarının ucuğu madde ve kül tayini, lignin tayini, selüloz tayini yapılarak yapısal analizi belirlenmiştir. BSSE yöntemi ile fıstık çamı kabuğundaki biyoaktif bileşenlerin en yüksek elde edileceği ekstraksiyon şartları, merkezi kompozit dizayn (MKD) tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca, diğer araştırmacıların fıstık çamı ağaç kabuğunun farklı yöntemlerle yaptığı ekstraksiyon işlemleri tanımladığı optimum şartlarda laboratuvarımızda tekrarlanmıştır. Tanımlanan optimum ekstraksiyon koşullarında takip edilen biyoaktif bileşenlerin (fenolik bileşik, flavonoid madde ve antioksidan) sonuçları karşılaştırılmıştır. Deneysel tasarım sonucuna elde edilen matematiksel quadratik formdaki denklem çözümü ile en yüksek hedef bileşen için şartlar ortaya konulmuştur. BSSE ile yapılan ekstraksiyon işlemin sonucunda, birim gram katı madde başına ekstrakta bulunan maksimum toplam fenolik madde miktarı (182°C sıcaklık, 3,15 ml/dk akış hızı ve 17,4 W/W sıvı/katı oranında) 52,6 mg gallik asit olarak bulunmuştur. Flavonoid madde miktarı için optimum şartlar 99,5 °C sıcaklık, 0,82 ml/dk akış hızı ve 18,7 W/W sıvı/katı oranında belirlenmiş olup 124,3 mg Qe/ g-km elde edilmiştir. DPPH radikal süpürücü etki tayini için ise optimum şartlar, 99,5 °C sıcaklık, 2,5 ml/dk akış hızı ve 18,7 W/W sıvı/katı oranında belirlenmiş olup 472,1 mmol trol/g-km olarak elde edilmiştir. ABTS radikal süpürücü etki tayini için ise optimum şartlar, 99,5 °C sıcaklık, 3,83 ml/dk akış hızı ve 18,7 W/W sıvı/katı oranında belirlenmiş olup 542,3 mmol trol/g-km elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fıstık çamı (*Pinus pinea*) kabuğu, basınçlı sıcak su ekstraksiyonu, biyoaktif madde

ABSTRACT

Extraction of Bioactive Substances from Peanut Pine Bark by Pressurized Hot Water system

Kübra DEMİRCİ

Master's Thesis

FIRAT UNIVERSITY
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Bioengineering

February 2023, Pages: xi + 59

In this study, the extraction of bioactive compounds from the bark of peanut pine trees was investigated by using a pressurized hot water extraction system (PWE). In the study, tree shells obtained from Çine region in Aydın city were used. Volatile matter, ash, lignin and cellulose were determined in peanut pine bark. The extraction conditions in which the maximum bioactive components in the pine bark would be obtained with the BSSE method were investigated by using the Central Composite Design (CCD) technique. In addition, the extraction processes of peanut pine bark with different methods described by other researchers were repeated in our laboratory under their optimum conditions. The results of the bioactive components (phenolic compound, flavonoid substance and antioxidant) under the defined optimum extraction conditions were compared with the BSSE. With the solution of the quadratic equation obtained as a result of the experimental design, the conditions for the highest target bioactive component have been revealed. As a result of the extraction with BSSE, the maximum total amount of phenolic substances in the extract per gram solid matter (182°C temperature, 3,15 ml/min flow rate and 17,4 liquid/solid ratio) was 52,6 mg gallic acid found. Optimum conditions for the amount of flavonoid substance were determined at 99.5 °C temperature, 0.82 ml/min flow rate and 18,7 liquid/solid ratio and 124.3 mg Qc/g-km was obtained. The maximum of DPPH radical scavenging effect was determined at 99.5 °C temperature, 2.5 ml/min flow rate and 18.7 W/W liquid/solid ratio and it was obtained as 472.1 mmol trawl/g-km. For maximum ABTS radical scavenging effect determination, optimum conditions were determined at 99.5 °C temperature, 3.83 ml/min flow rate and 18.7 W/W liquid/solid ratio and 542.3 mmol trawl/g-km was obtained.

Keywords: Peanut pine (*Pinus pinea*) bark, extraction, pressurized hot water, bioactive component

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. CO ₂ faz diyagramı.....	10
Şekil.2.2. 300 bar basınç altında sıcaklık değişimiyle yoğunluk, dielektrik sabiti, ayrışma sabitinin değişimi	12
Şekil 2.3. Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu sistem şeması (Plaza ve Tuncer, 2015).....	13
Şekil 2.4. Web of Science veri tabanı değerleri.....	14
Şekil 2.5. Bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen biyoaktif bileşenlerin optimum sıcaklık değerleri..	15
Şekil 2.6. Bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen flavanoid için optimum sıcaklık değerleri.....	16
Şekil 2.7. Bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen Organik asitler için optimum sıcaklık değerleri.....	16
Şekil 2.8. Bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen karbondihratlar,esansiyel yağlar ve alkoloidler için optimum sıcaklık değerleri	17
Şekil 2.9. Fıstıkçamı ağacı (URL -1).....	19
Şekil 3.1. Fıstık çamı kabuğu öğütme öncesi ve öğütme sonrası	24
Şekil 3.2. Kül fırını.....	25
Şekil 3.3. Süzgeç kağıdında toplanan süzöntü.....	26
Şekil 3.4. Geri soğutuculu sistem.....	27
Şekil 3.5. Saf su ile yıkama işlemi	28
Şekil 3.6. Fıstık çamı kabuğunun toplam fenolik madde tayini	29
Şekil 3.7. Fıstık çamı kabuğunun toplam flavonoid madde tayini	30
Şekil 3.8. Fıstık çamı kabuğunun ABTS tayini	31
Şekil 3.9. Basınçlı sıcak su ekstraksiyon sistemi.....	32
Şekil 3.10. Sokslet ekstraksiyon düzeneği.....	33
Şekil 3.11. Solvent ekstraksiyonun gerçekleştirildiği sistem	34
Şekil 4.1. Toplam fenolik madde içeriğine ait teorik olarak hesaplanan sonuçlara karşı deneysel sonuçların dağılımı	39
Şekil 4.2. Ekstraktaki toplam fenolik madde miktarına su akış hızı ile kolon sıcaklığının eş zamanlı etkisi40	
Şekil 4.3. Ekstraktaki toplam fenolik madde miktarına sıvı/katı oranı ile kolon sıcaklığının eş zamanlı etkisi (a= mgGA/g KM, b= mg GA/g KM. ml).....	41
Şekil 4.4. Flavonoid miktarı için deneysel veriler ile teorik sonuçların değişimi.....	43
Şekil 4.5. Ekstraktaki flavonoid madde miktarına sıvı /katı oranı ile kolon sıcaklığının eş zamanlı etkisi (a= mgQe/g KM, b= mg Qe/g KM. ml)	44
Şekil 4.6. Ekstraktaki flavonoid madde miktarına sıvı /katı oranı ile akış debisinin eş zamanlı etkisi (a= mgQe/g KM, b= mg Qe/g KM. ml)	44

Şekil 4.7. Bağımsız değişkenlerin DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasite üzerine eş zamanlı etkisi.....	47
Şekil 4.8. Bağımsız değişkenlerin ABTS yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasite üzerine eş zamanlı etkisi.....	48



TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Sokslet ekstraksiyon parametreleri	33
Tablo 4.1. Fıstık çamı kabuğu kimyasal analiz sonuçları	35
Tablo 4.2. BSSE işleminde izlenen deneysel şablon ve elde edilen sonuçlar	36
Tablo 4.3. Matematiksel model ifadelerinin istatistiksel analiz sonuçları	37
Tablo 4.4. Toplam fenolik madde içeriğinin ANOVA test sonuçları	38
Tablo 4.5. İndirgenmiş ikinci dereceden model denklemin istatistiksel verileri	38
Tablo 4.6. Flavonoid içeriğinin ANOVA test sonuçları	42
Tablo 4.7. İndirgenmiş ikinci dereceden model denklemin istatistiksel verileri	42
Tablo 4.8. İndirgenmiş ikinci dereceden model denklemin istatistiksel verileri	45
Tablo 4.9. Antioksidan kapasite içeriği için önerilen modellerin ANOVA test sonuçları	46
Tablo 4.10. Model ifadelerden elde edilen optimum şartlardaki teorik ve deneysel sonuçlar	49
Tablo 4.11. Geleneksel yöntemlerle yapılan ekstraksiyon işleminden elde edilen sonuçlar.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ϵ_r	: Dielektrik sabiti
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
H_2SO_4	: Sülfürik asit
H_3O^+	: Hidronyum iyonu
K_w	: Ayrışma sabiti
Na_2CO_3	: Sodyum karbonat
$NaNO_2$	: Sodyum nitrit
$NaOH$	: Sodyum hidroksit
OH^-	: Hidroksit iyonu
P_c	: Kritik basınç
pH	: Potansiyel hidrojen
S-CO ₂	: Kritik karbondioksit
T_c	: Kritik sıcaklık
HCl	: Hidrojen klorür
M	: Molarite
Mmol	: Milimol
Trol	: Trolox eşdeğeri
GA	: Gallik asit
Qe	: Kuersetin
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
Nm	: Nanometre
UV	: Ultraviyole
M.Ö.	: Milattan önce
MKD	: Merkezi kompozit tasarım
mg	: Miligram
dk	: Dakika
Ha	: Hektar
m	: Metre
cm	: Santimetre
m ³	: Metre küp
mm ³	: Milimetre küp
sa	: Saat
K	: Kelvin
T	: Sıcaklık
mL	: Mililitre
°C	: Santigrat derece
MHz	: Megahertz
GHz	: Gigahertz
q	: Akış hızı
MPa	: Megapascal

Kısaltmalar

ASE	: Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
BHA	: Bütilleşmiş hidroksianisol
BHT	: Bütilleşmiş hidroksitoluen
GC	: Gaz kromatografisi
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
KKH	: Kroner kalp hastalığı
PHWE	: Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu
BBSE	: Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu
PLE	: Basınçlı çözgen ekstraksiyonu
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SF	: Süperkritik sıvı
SFE	: Süperkritik sıvı ekstraksiyonu
SWE	: Kritik altı su ekstraksiyonu
UAE	: Ultrasonik destekli ekstraksiyon
USP	: Birleşik devletler farmakopesi

1. GİRİŞ

İnsanların bitkileri tedavi amaçlı kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir (Güveloğlu, 2014). Bitkilere olan ilgi yeniçağda hızla gelişen kimya ve eczacılık bilimleri ile birlikte yerini büyük ölçüde sentetik, yarı sentetik ve kimyasal ilaçlara bıraksada (Güveloğlu, 2014), günümüzde biyoaktif bileşenlere olan ilginin artmasıyla birlikte biyoaktifleri elde etme yöntemleri gelişmekte ve farklı bitkisel kaynaklardan biyoaktifleri elde etme çalışmaları yapılmaktadır (Gönültaş ve Uçar, 2012). Biyoaktif bileşikler, canlılar tarafından üretilen, biyotik ve abiyotik aktivite gösteren kimyasal bileşiklerdir (Keskinkaya ve Akköz, 2018). Bu bileşikler, yaşlanmayı geciktirme, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve şeker hastalığı, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi kronik hastalıklara karşı koruma dahil olmak üzere çeşitli faydaları bilinmektedir (Martín ve Segura, 2019).

Biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunu optimize etmek için yıllar içinde metanol, heksan, kloroform, asetonitril, benzen ve etil alkol gibi farklı polaritelere sahip çeşitli organik çözücüler kullanılmıştır. Ancak bu çözücüler hem insanlar hem de çevre için yalnızca toksik olmakla kalmaz; özellikle endüstriyel ölçekte gerçekleştirildiklerinde pahalıdırlar. Daha yakın tarihli çalışmalarda, ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süper kritik sıvı ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve ultrason destekli ekstraksiyon gibi yeni ve daha basit teknikleri kullanmaya doğru ilerlemiştir. En temiz ve yeşil teknolojilerden biri, çözücü olarak sadece su kullanmaktır. Suyun çözücü özelliklerini geliştirmek için, basınçlı sıcak su ekstraksiyonundaki (BSSE) su, kendi kendine iyonlaşma, dielektrik sabiti, viskozite, yayılma, yoğunluk ve yüzey gerilimi gibi fiziko-kimyasal özelliklerini kolayca değiştirebilir. BSSE'nin ayrıca daha kısa ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon ajanının daha düşük maliyetleri ve çevre ile uyumlu olduğu bilinmektedir (Mohd Jusoh vd., 2019).

Çam kabuğu, çam ağacı gövdesinin %10-20'sini temsil ettiğinden, ağaç endüstrisinde bol miktarda bulunan bir kalıntıdır (Vieito vd., 2019; Braga vd., 2008). Günümüzde ağaç kabuğunun yarısından fazlası yakılıyor veya çöpe atılıyor; geri kalanı çoğunlukla testere/hamur değirmenlerinde ucuz bir enerji kaynağı olarak kullanılıyor. Bu durum her iki olayda da çevresel sorunlara yol açabiliyor (Vieito vd., 2019; Jablonsky vd., 2017). Fıstık çamı, toprak üstü biyokütlenin %7'sini temsil eden güçlü kahverengi kırmızımsı renkte kalın bir kabuğa sahiptir. *P. pinea* kabuğu, önemli miktarda tanen ve nispeten düşük polisakkarit ve lignin içeriği gösterir, bu da onu potansiyel bir polifenol kaynağı olarak çekici kılar (Miranda vd., 2017).

Bu yüksek lisans tez çalışmasında Fıstık çamı (*Pinus pinea*) kabuğundaki biyoaktif maddeler basınçlı sıcak su ekstraksiyonu sistemiyle ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyon parametrelerinin (sıcaklık, basınç, akış hızı ve katı/sıvı oranı) ekstrakt verimi, fenolik madde miktarı, flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Cevap

yüzey metodu ile etkili parametrelerin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra sokslet ekstraksiyon sistemi ve ultrason destekli ekstraksiyon sistemiyle fıstık çamı kabuğu ekstrakte edilmiş; elde edilen ekstraktların fenolik madde içeriği, flavonoid madde içeriği, antioksidan aktiviteleri incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Bitkilerde ikincil metabolit olarak üretilen ve besin maddesi olarak tüketildiğinde sağlık üzerinde birçok olumlu etkisi olan biyolojik mekanizmalarda oldukça önemli rolleri bulunan aktif maddeler bulunmaktadır. Bu başlıkta bu bileşenler ve türleri incelenmiştir.

2.1. Biyoaktif Bileşikler

Bitkiler, büyümek ve gelişmek için farklı kimyasal yapılarda çeşitli ürünler üretir. Birincil metabolitler, fotosentez, translokasyon ve solunum gibi işlemler için gerekli kaynakları sağlar. Büyüme ve gelişmede doğrudan yer almayan birincil metabolitlerden türetilen ürünler, ikincil metabolitler olarak kabul edilir. Genel olarak ikincil metabolitler, birincil metabolitlerin ürünüdür ve metilasyon, glikosilasyon ve hidroksilasyon dahil olmak üzere biyosentez modifikasyonlarından üretilir (Twaij ve Hasan, 2022). İkincil metabolitler bitkinin büyümesinde, gelişmesinde, bitkiye özgü renk, koku, tat gibi özelliklerin kazandırılmasında; virüs, mantar, bakteri, böcekler gibi dış çevreden kaynaklı zararlılara karşı bitkinin korunmasında rol alan bileşikler olarak tanımlanabilir. Bu maddeler farklı kimyasal özelliklere ve yapıya sahiptirler. Yapılarındaki bu çeşitlilik nedeniyle biyoaktifler bileşikler yapılarına göre bazı alt gruplara ayrılmaktadırlar. Fenolik asitler, flavonoidler, karotenoidler bu alt gruplardan bazılarını oluşturmaktadır (Uyar ve Sürücüoğlu, 2010).

2.1.1. Fenolik Bileşikler

Bu bileşikler, bir veya daha fazla fenolik gruba bağlı mono- ve polisakaritler ile kombine halde bulunur. Ester veya metil esterler gibi türevler halinde bulunabilirler (Minatel vd., 2017). Fenolik bileşikler, bitkiler aleminde oldukça yaygındır ve bitkilerin en önemli ikincil metabolit gruplarından birini oluşturur (Roleira vd., 2018). Fenolik bileşikler fenolik asitler ve polifenoller olmak üzere iki başlıkta incelenebilir.

Fenolik bileşikler fizyolojik olaylar ve hücrel metabolizmalarda rol almaktadırlar. Bitkilerde duyuşal özellikler (renk, aroma, tat ve burukluk), yapı, tozlaşma, zararlılara ve avcılara karşı direnç, hasat ve büyümeden sonra tohumların çimlenme süreçleri, gelişme ve üreme gibi birçok fonksiyonda önemli görevleri vardır (Giada, 2013).

Yapılan birçok çalışmada fenolik bileşiklerin sağlık üzerine olumlu etkilerinin olduğu ortaya konulmuştur (Cavuldak vd., 2016). Fenolik bileşiklerinin antioksidan aktivitesine sahip olması, çeşitli hastalıkları önlemesi ve insan sağlığına olumlu etkilerinin görülmesi sonucunda gıda endüstrisinde kullanımı araştırılmaktadır. Ayrıca bazı durumlarda bu bileşikler farmakolojik özelliklerinden dolayı terapötik amaçlarla da kullanılabileceği incelenmekte çeşitli ürünler

geliştirilmektedir. Örneğin, timol gibi düşük moleküler ağırlıklı fenolik bileşikler, antiseptik ve antimikrobiyal etkileri nedeniyle kullanılmaktadır (Giada., 2013).

Fenolik bileşikler canlılar üzerinde antioksidatif, antimikrobiyal, antienflamatuvar ve antiviral özellikler gösterdiği bilinmektedir (Karabulut ve Yemiş, 2019). Ayrıca, bu bileşikler hücre döngüsünü durdurarak, kanserojen metabolizmasını ve ontogenez ekspresyonunu düzenleyerek, DNA bağlanmasını ve hücreyi inhibe ederek apoptozu indüklemelerine katkıda bulunur (Huang vd., 2010). Doğal kaynaklardan elde edilen fenolik bileşikler, kanserin önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Şifalı bitkilerden ve diyet bitkilerinden elde edilen fenolik bileşikler arasında fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, stilbenler, kurkuminoidler, kumarinler, lignanlar, kinonlar ve diğerleri bulunur. Fenolik bileşiklerin tıbbi ve/veya diyet molekülleri olarak kullanımı amacıyla moleküllerin tanımlanmasına, ekstraksiyonuna ve miktar tayinine odaklanan araştırmalarda önemli artışlar gözlenmektedir (Khoddami vd., 2013).

2.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler hem yenilebilir hem de yenmeyen bitkilerde bulunan yüksek oranda biyoaktif bileşiklerdir (Khoddami vd., 2013). Flavonoidler sekonder metabolitlerin en önemli üyelerindendir (Harborne, 1999). Değişken fenolik yapıya sahip bir grup doğal madde olan flavonoidler meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, ağaç kabuğunda, köklerde, gövdelerde, çiçeklerde, çay ve şarapta bulunur. Bu doğal ürünler, sağlık üzerindeki yararlı etkileri bilinmektedir ve bu bileşenleri izole etmek için çaba sarf edilmektedir. Flavonoidler artık çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Bu, temel hücresel enzim fonksiyonunu düzenleme kapasiteleri ile birlikte anti-oksidatif, anti-inflamatuvar, anti-mutajenik ve anti-kanserojen özelliklerine atfedilir. Flavonoidlerin çalışma mekanizmaları hakkındaki bilgiler hala tam olarak anlaşılamamakla birlikte bitki kökenli türevlerinin geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahip olduğu yüzyıllardır yaygın olarak bilinmektedir. Flavonoidler üzerine araştırma ve geliştirme faaliyetlerinin mevcut eğilimleri, flavonoidlerin izolasyonu, tanımlanması, karakterizasyonu ve işlevleri ve son olarak sağlık yararları üzerindeki uygulamaları yoğunlaşmaktadır (Panche vd., 2016).

2.2. Bitkilerin Antioksidan Potansiyeli

Antioksidanlar, serbest radikal reaksiyonlarını engelleyen veya sönmöleyen böylece hücresel hasarların önüne geçen moleküllerin genel ismidir (Nimse ve Pal, 2015). Antioksidan savunmalar türden türe farklılık gösterse de antioksidan savunmanın varlığı

evrenselidir. Antioksidanlar, hücre içi ve hücre dışı ortamda hem enzimatik hem de enzimatik olmayan formlarda bulunmaktadır.

Vücutta gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlar, çevremizde maruz kaldığımız maddeler ve yüksek diyetel ksenobiyotik seviyeler sonucunda reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) oluşur. ROS ve RNS türleri serbest radikaller, normal fizyolojinin ayrılmaz bir parçasıdır. Vücudun antioksidan savunma sistemindeki dengesizlik ve serbest radikal oluşumundan kaynaklanan oksidatif stres nedeniyle bu reaktif türlerin aşırı üretimi meydana gelebilir. Bu reaktif türler, biyomoleküllerle reaksiyona girerek hücrel hasara ve ölüme neden olabilir. Vücudumuzun hücrel bileşenleri oksidatif stres koşullarında değişir ve bu da çeşitli hastalık durumlarına neden olur. Bu durum, kanserler ve kardiyovasküler ve serebrovasküler sistemleri içeren kronik hastalıkların gelişmesine yol açabilir. Antioksidanlar hücrel savunmayı güçlendirerek etkili bir şekilde oksidatif stres nötralize edilebilir. Antioksidan içeren meyve ve sebzelerin tüketiminin bu hastalıklara karşı koruma sağladığı belirtilmektedir (Wong vd., 2005; Halliwell, 1989).

Antioksidanlar aktivitelere göre enzimatik ve enzimatik olmayan olarak sınıflandırılabilirler. Enzimatik antioksidanlar, serbest radikalleri parçalayarak ve uzaklaştırarak çalışır. Antioksidan enzimler, tehlikeli oksidatif ürünleri, bakır, çinko, mangan ve demir gibi kofaktörlerin varlığında çok aşamalı bir işlemle hidrojen peroksit (H_2O_2) ve ardından suya dönüştürür. Enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikal zincir reaksiyonlarını keserek çalışır. Enzimatik olmayan antioksidanlara örnek olarak C vitamini, E vitamini, bitki polifenoller, karotenoidler ve glutatyon verilebilir (Nimse ve Pal, 2015).

Antioksidanların fizyolojik sistemlerde önemli bir rol oynamasının yanı sıra, çoklu doymamış yağlarca zengin gıdaların raf ömrünü uzatmak amacıyla gıda endüstrisinde kullanılmaktadır. Gıdalarda bulunan bazı bileşenler kolayca oksitlenerek gıda kalitesinin bozulmasına dolayısıyla kötü tat ve renk oluşumuna, gıda kaybına neden olmaktadır. Gıdalara propil gallat, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve üçüncül bütillhidrokinon gibi sentetik antioksidanların eklenmesiyle lipid oksidasyonunu kontrol etmek gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, potansiyel sağlık riskleri ve sahip oldukları toksisiteleri nedeniyle sentetik antioksidanların kullanımı sorgulanmaktadır (Wong vd., 2005; Kalt ve Kappus, 1993).

Mevcut risklerden kaçınmak amacıyla gıda korumada sentetik antioksidanlar yerine doğal kaynaklardan elde edilen antioksidan kullanımı araştırılmaktadır. Doğal antioksidanlar, gıda korumaya ilave olarak, vücutta oksidatif hasarın oluşmasını önlemeye yardımcı olması önemli bir artısı olarak karşımıza çıkmaktadır (Wong vd., 2005; Møller vd., 1999).

2.3. Bitkilerde Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon, bitkilerden biyoaktif bileşenlerin araştırmalarında nihai sonuç üzerinde önemli etkisi olan ilk aşamadır. Biyoaktif bileşikler, gıda katkı maddeleri, fonksiyonel gıdalar ve nutrasötiklerin üretiminde önemli bir rol oynayan, geniş çeşitlilikte işlevselliklere ve yapılara sahip geniş molekül havuzunu içermektedir. Ekstraksiyonun amacı, istenmeyen bileşiklerin geçişini en aza indirirken istenen bileşiklerin verimini en üst düzeye çıkarmaktır. Geleneksel olarak biyoaktif bileşenler, katı-sıvı ekstraksiyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bu bölümde öncelikle bu kimyasalların bitkilerden ekstraksiyonu için kullanılan yöntemler ele alınacak ve daha sonra elde edilen ekstraktın kalitesini etkileyen faktörler üzerinde durulacaktır.

Bitkiler, insanlar ve hayvanlar için temel besin kaynaklarından biri olmanın yanı sıra tarih boyunca birçok hastalığın tedavi kaynağı olarak kullanılmıştır. Bitkiler tarafından üretilen ve farklı birçok metabolizmada yer alan sekonder metabolitler zamanla insanların çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanabilecekleri ilaçlara dönüşmüştür (Kocabaş, 2017). Bu hastalıklar arasında basit yaralanmalardan mide ağrılarına, ateşli hastalıklardan yaşlanmaya kadar geniş bir yelpazeyi örnek verebiliriz. Geçen yüz yıllar içinde bitkiler tedavi amaçlı doğrudan kullanılıyordu ve bunların mekanizmalarına ve dozajlarına ilişkin bilgiler deneme yanılma yoluyla kararlaştırılıyordu. Üstelik bu bilgiler kulaktan dolma bilgi olarak nesilden bir sonraki nesile aktarılıyordu. Ancak günümüz teknolojisi ile artık aktif maddeler tanımlanıp saflaştırılabilmekte, etkileri ve dozajı belirlenebilmektedir (Kocabaş, 2017). Doğal yapısı, yerel kaynaklardan daha ucuza temin edilme kolaylığı, hazırlanma kolaylığı gibi sebeplerden dolayı ilaç kaynağı olarak bitkiler tüm dünyada popülerlik kazanmaktadır. Ayrıca sentetik ilaçların oluşturduğu yan etkiler ve ilaç direnci durumunda bitkisel kaynaklı ilaçlara ilgiyi artırmaktadır (Abubakar ve Haque, 2020). Biyoaktif bileşiklerin bitkilerdeki dağılımları konsantrasyonlarına göre değişiklik göstermekle birlikte bazıları düşük seviyede bulunurken polifenoller gibi bazı bileşikler daha yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. Hedeflenen bileşikler yeterli düzeyde elde etmek için, oldukça karmaşık bir matris içersinden maliyeti artıran büyük miktarlardan ürün kazanımı gereklidir (Sularia vd., 2020).

Kromatografik ve spektrometrik yöntemlerdeki gelişmeler, biyoaktif bileşenlerin saptanmasında önemli katkı sağlasa da, bu bileşenleri elde etmek için yapılan işlemlerin başarısı %60 oranında ekstraksiyon yönteminin başarısına bağlıdır. İhtiyaç duyulan biyoaktif bileşenlerin belirlenmesi ve üretilmesinde karşılaşılan zorluklar ekstraksiyon yöntemlerindeki yenilikler ve gelişmelerle aşılanacaktır (Sularia vd., 2020).

Biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılan geleneksel teknikler, sıvı-sıvı veya katı-sıvı ekstraksiyonu, Sokslet ekstraksiyonu, maserasyon ve hidrodistilasyon sayılabilir. Gelişmiş yöntemler arasında subkritik ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyonu, darbeli elektrik alan ekstraksiyonu

gibi yöntemler yer alır. Ekstraksiyon yöntemlerindeki yenilikler genel olarak matristeki bileşenlerin daha fazla ve yapısal olarak kararlı halde elde etmek için kullanılmaktadır. Bu amaçla fonksiyonel gıda üretimi veya nutrasötiklerin üretimi, ilaç etkin maddelerinin eldesi başta olmak üzere çok farklı amaçlar için ihtiyaç bileşenlerin elde edilmesine yönelik ekonomik ve yenilikçi yöntemler geliştirilmektedir.

Bitkisel ekstraksiyon işlemleri ekstraksiyon sıcaklığı, süresi, gibi farklı koşulların çeşitli çözücü türlerinde gerçekleştirilen deneysel bir uygulamadır. Ekstraksiyon yöntemlerinin belirlenmesi kullanılan bitkisel materyalin yapısı, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı, çözücü ve ayırma gücü, basınç gibi değişkenler yanında son ürünün kullanım amacına bağlıdır (Abubakar ve Haque, 2020). Ekstraksiyon yöntemini seçerken dikkat edilecek faktörler maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır:

- Isıtmaya karşı kararlılık: Isıya dayanıklı bitki materyali, sokslet ekstraksiyonu veya mikrodalga destekli ekstraksiyon kullanılarak ekstrakte edilirken, ısıya stabil olmayan bitki materyalleri maserasyon veya perkolasyon kullanılarak ekstrakte edilir.
- Çözücünün doğası: Ekstraksiyon çözücüsü su ise maserasyon uygun bir yöntemdir ancak uçucu çözücü süzme ve sokslet ekstraksiyonu için daha uygundur. Çözücünün türü kullanım amacıyla yakından ilişkilidir. Yüksek sıcaklığın kullanıldığı ekstraksiyon sistemlerinde ve çözücünün uzaklaştırılması gerektiği durumlarda istenmeyen bileşenlerin oluşması ve ilgili biyoaktif bileşenlerin bozuması neden olabilir.
- Ekstraksiyon süresi: Maserasyon uzun süre maruz kalmayı gerektiren bitki materyali için uygundur, oysa mikrodalga veya ultrason destekli ekstraksiyon gibi teknikler daha kısa bir süre için kullanılır.
- Gerekli son hacim: Tentürler gibi büyük hacimli ürünler maserasyon ile hazırlanırken konsantre ürünler süzülme veya Sokslet ekstraksiyonu ile üretilir. Modern yöntemlerle daha yoğun ekstrakt elde edilme imkanları vardır.
- Kullanım amacı: İnsan tarafından tüketilmesi amaçlanan ekstraktlar genellikle maserasyon ile hazırlanırken, farklı amaçlar için elde edilen ekstraktlar alternatif yöntemler kullanılarak hazırlanır (Azwanida, 2015; Majekodunmi, 2015). Ancak büyük miktarlarda çözücü kullanımı maliyet ve çevresel kaygılar bakımından maserasyon gibi geleneksel yöntemler tercih edilmeyebilir. Modern yöntemlerle belirlenen yasal sınırlar içerisinde farklı çözücü bulundurulmuş sistemler öne çıkmaktadır.

Bitkisel materyallerden biyoaktif maddelerin kazanılması amacıyla kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden başlıcaları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

Bitki materyalinin oda sıcaklığında genellikle organik bir çözücü içinde bekletilmesiyle aktif bileşenlerin kazanımı yöntemi maserasyon olarak bilinir. Bitkisel materyal kapalı bir kapta solventle temas halinde tutulurken ortam aralıklarla veya sürekli olarak karıştırılabilir. İşlem sonrasında katı ve sıvı süzülerek ayrılır. Bitkisel materyal daha sonra taze çözücü eklenerek başka bir ekstraksiyon aşamasına tabi tutulabilir. Bu adım, bitki materyalinden hedeflenen kimyasalların tamamen ekstraksiyonunu sağlamak için birkaç kez tekrarlanabilir. Bu yöntem çok zaman alan ve aşırı çözücü tüketen bir süreçtir. Tek bir ekstraksiyon işlemi saatlerden günlere kadar sürebilir ve bitki materyalinin tekrarlanan maserasyonunda haftalar sürebilir (Seidel, 2006). Zaman alıcı olmasına rağmen, oda sıcaklığında gerçekleştirildiği için ısıya duyarlı bileşikler için faydalı bir ekstraksiyon yöntemidir (Attard vd., 2020). Bu işlemin daha kısa sürelerde yüksek sıcaklıktaki suyla gerçekleştirilen ekstraksiyon yöntemi infüzyon olarak tanımlanmakta olup maserasyonun farklı bir türü olarak düşünülebilir.

Sokslet ekstraksiyonu katı veya yarı katı örneklerdeki organik bileşiklerin ekstraksiyonunda özel bir cihaz olan Sokslet ekstraktörü ile yapılmaktadır. 1879 yılında Franz von Sokslet tarafından geliştirilen yöntemdir. 1980'li yıllarda kullanımı yaygınlaşmış olup en eski ekstraksiyon yöntemlerinden biridir ve hala laboratuvarlarda kullanılmaya devam edilmektedir (Büyüktuncel, 2012).

Ekstraksiyon uygulanacak numune ekstraktöre yerleştirilir. Çözücü şişesine uygun çözücü katılır, ısıtma sistemi üzerine yerleştirilerek kaynama sıcaklığının üzerine kadar ısıtılmaktadır. Kaynayan çözücüde buharlaşma oluşur ve oluşan buharlar kondansatöre giderek burada yoğunlaşır. Yoğunlaşan çözücü numune katının üzerine damlayarak ıslatır. Ekstraksiyon bölmesindeki biriken çözücü zamanla tam doluma ulaşır ve sifon seviyesine gelir. Çözücü sifonunun üstüne çıktığında burada tam dolum seviyesine gelen çözücü, çözücü şişesine boşalır (Büyüktuncel, 2012).

Toplamda temel olarak 4 adımda gerçekleşen buharlaşma, yoğunlaşma, tam dolum, sifon basamaklarının döngüsüne riflaks denilmektedir ve bu döngü sürekli olarak tekrar eder (Kayan, 2009). Sokslet ekstraktöründe kullanılan solvent çözücüler, ekstrakte edilecek olan bileşenlere göre değişmektedir (Angela vd., 2009).

Sokslet ekstraksiyonunun düşük maliyeti, çok tecrübe gerektirmemesi, ekstraksiyondan sonra filtrasyona gerek duyulmaması gibi avantajlarının yanında, ekstraksiyon için gereken uzun zaman ve büyük miktarda çözücü kullanımı gibi dezavantajları da mevcuttur. Bu çözücü tüketimi sadece bertaraf edilme maliyeti değil, aynı zamanda ek çevresel problemlere de neden olmaktadır. Numuneler genellikle çözücü kaynama noktasında uzun süreler boyunca muamele edilir ve ısıya dayanıklı olmayan hedef bileşenlerin termal bozunmalarına neden olabilir (Luque de Castro ve Priego-Capote, 2010).

Ekstraksiyon için gerekli olan ısı enerjisi mikrodalga ile sağlanan modern teknikler arasında sayılan mikrodalga ekstraksiyon yöntemi hızlı, basit ve düşük maliyetli olmasıyla dikkat

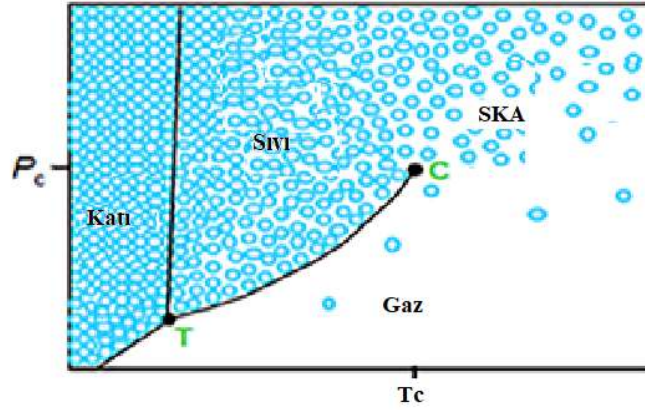
çekmektedir. Mikrodalgalar, 300 MHz ile 300 GHz arasındaki frekanslarda ve 1 cm ile 1 m arasındaki dalga boylarında meydana gelen elektromanyetik radyasyona sahip ekipmanlardır (Altemi vd., 2017). Mikrodalga teknolojisi 1940'ların ortalarından itibaren kullanılmaya başlanmış olup laboratuvarlarda kullanımları ise 1970'lere rastlamaktadır (Kılıç, 2008).

Ekstraksiyon için kullanılan çözücüler mikrodalgadan yayılan enerjiye duyarlı olan polar yapıda olmalıdır (Başer vd., 2010). Polar çözücü kullanıldığında, dipol dönüşü ve iyonların göçü meydana gelir, çözücü nüfuzunu artırır ve ekstraksiyon işlemine yardımcı olur. Polar olmayan çözücü kullanıldığında, salınan mikrodalga radyasyonu yalnızca küçük bir ısı üretecek ve ekstraksiyon işlemine yardımcı olmayacaktır (Abubakar ve Haque, 2020). Apolar çözücüler kullanılacaksa, çözücü ortamına elektromanyetik dalgaları absorbe edici özellikteki maddeyle kaplanmış karıştırıcı eklenmeli, bu sayede hem karıştırma hemde ısı transferi sağlanmalıdır (Başer, 2010). Başarılı bir mikrodalga ekstraksiyon işlemi için uygun ön işleme tabii tutulmuş bitki materyali, ekstraksiyonu yapılacak maddeye uygun solvent seçimi, uygulanan mikrodalga gücü dikkat edilmesi gereken noktalardır (Kılıç, 2008).

Mikrodalga ısıtması ile klasik yöntemlerle uygulanan ısı iletimi karşılaştırıldığında; Mikrodalga enerjisi iyonların iletimi ve dipol rotasyonu yoluyla gerçekleştiğinden ekstrakte edilecek numune hem homojen olarak hem de hızlı bir şekilde gerçekleşmiş olur. İyonik iletim, çözülmüş moleküllerin elektroforetik göçü ile ilgilidir. Çözeltinin bu göçe direnci ile sürtünme meydana gelir ve böylece ısınma gerçekleşmiş olur. Mikrodalgadan yayılan ısı enerjisi nedeniyle numunenin içindeki nem (yani hücredeki nem) ısınır buharlaşarak hücre duvarına basınç uygular, yüksek basınçla hücre duvarı parçalanmaktadır. Böylece numune bileşenleriyle çözücü karışmış olur. Kullanılan çözücünün dipol momenti ne kadar büyük ise çözücü o kadar çabuk ısınmaktadır (Büyüktuncel, 2012).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon kapalı ve açık sistem olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Kapalı sistem en yaygın olanıdır. Bu sistem kapalı bir kapla yapıldığından sıcaklık ve basınç kontrol edilebilmektedir. Açık sistem ise atmosferik basınç altında yapılmaktadır. Bu yöntemle düşük miktarda çözücü miktarı ve kısa ekstraksiyon süresiyle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar kolaylıkla ayrılabilirken tanenler ve antisianinler gibi bileşenler sıcaklık dolayısıyla bozulabilir (Abubakar ve Haque, 2020; Kılıç, 2008).

Bir madde kritik sıcaklık (T_c) ve kritik basınç (P_c) noktası üzerinde ise bu maddeye süperkritik sıvı denir. Bu noktadaki süperkritik akışkan hem sıvı hem de gaz özelliği taşımaktadır. Süperkritik akışkan birçok maddeyi çözebilmesi yönüyle sıvılara, yüksek difüzyon katsayısına sahip olmasıyla gazlara benzemektedir (Kılıç, 2008). Şekil 2.1'de süperkritik nokta için faz diyagramı görülmektedir.



Şekil 2.1. CO₂ faz diyagramı

Süperkritik akışkanların yüzey gerilimleri yoktur, difüzyon katsayıları yüksek, viskoziteleri düşük olduğundan gözenekli katılara etki etmesi kolaydır ve bitkiler içinde uygun bir ekstraksiyon yöntemidir (Kılıç, 2008). Süperkritik akışkanların çözme gücü temelde sıcaklık ve basınca bağlıdır ve birinin yüksek veya düşük olmasına göre çözme gücünde değişir (Zhang vd., 2018; Başer, 2010). Basınç ve sıcaklık değerlerinde küçük değişiklikler nedeniyle çözücü özellikleri kritik noktalarının yakınında önemli ölçüde değişir. Süper kritik karbondioksit (S-CO₂), düşük kritik sıcaklık (31°C), seçicilik, düşük maliyet, toksik olmama ve termal olarak kararsız bileşikler çıkarma yeteneği gibi avantajlar nedeniyle süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) yaygın olarak kullanılmaktadır. S-CO₂'nin düşük polaritesi, lipit ve uçucu yağ gibi polar olmayan doğal ürünlerin ekstraksiyonu için idealdir (Zhang vd., 2018).

Süperkritik akışkan basınç, sıcaklık ve akış hızının kontrolünü sağlayan bir cihazla üretilmektedir. Ekstraktın toplanması için uygun bir solvent veya katı-faz tuzağında gerçekleştirilmektedir. Ekstraksiyon için gerekli solvent miktarı 10-20 mL, gerekli süre ise 20-60 dakika arasındadır. Hem zaman hem de gerekli çözücü miktarının azlığından dolayı geleneksel yöntemlere göre avantajlıdır (Büyüktuncel, 2012).

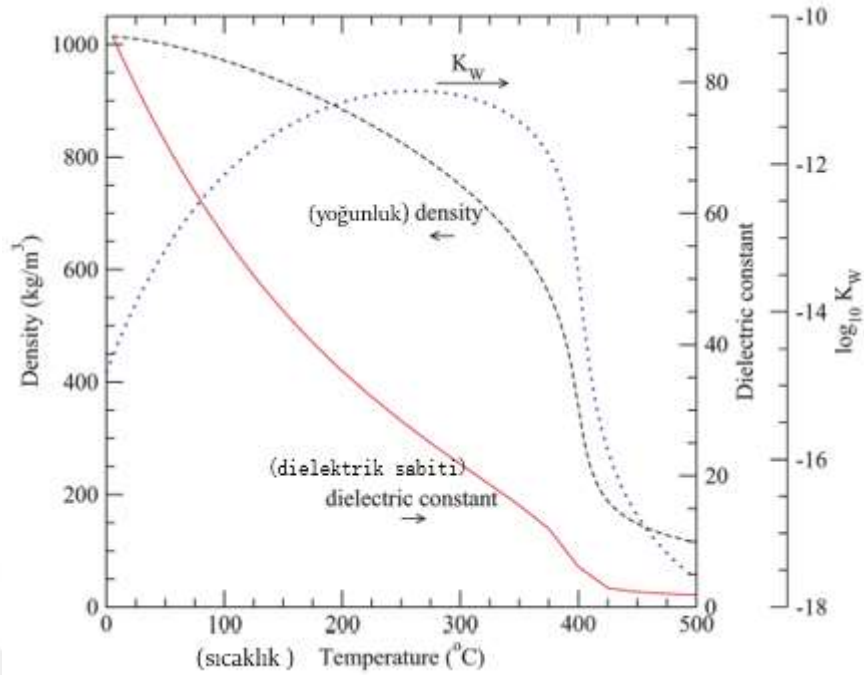
Çözücü içerisinde kavitasyon üreten ultrasonik etkileşim, istenen maddenin çözünmesini, sıvı faza difüzyonunu ve ayrıca ısı transferini artırır, bu durum ekstraksiyon verimine olumlu katkı sağlamaktadır (Zhang vd., 2018). 20 KHz'den daha yüksek bir frekansta ses enerjisi uygulaması olan ultrasonik etki bitki hücrelerini parçalayarak çözücü penetrasyonu için katı yüzey alanını da artırmaktadır. Bu yöntemde, bitki materyali önce kurutulmalı, ince öğütülmeli ve uygun şekilde elenmelidir. Yüksek ses enerjisi uygulandığından düşük sıcaklıklarda kısa sürede küçük hacimler içerisinde yüksek verimle istenilen bileşenleri kazanımını sağlamaktadır. Bununla birlikte uygulanan yüksek ses enerjisi serbest radikal oluşturarak biyoaktif bileşen yapılarında bozunmalara neden olmaktadır (Azwanida, 2015; Pandey vd., 2014).

2.3.1. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu

Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu (BSSE) suyun kritik noktasından daha düşük sıcaklık, basınç şartlarında gerçekleştirilen ve ekstraksiyon çözücüsü olarak bu şartlarda sıvı formda suyun kullanıldığı ekstraksiyon tekniğidir. BSSE'nin analitik kimyada kullanımı, 1990'ların ortalarında Hawthorne ve meslektaşlarının çevresel analiz çalışmalarıyla başlamıştır. BSSE kritik altı su ekstraksiyonu, aşırı ısıtılmış su ekstraksiyonu, çözücü olarak su ile hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu olarak da adlandırılmaktadır (Plaza ve Turner, 2015; Hawthorne vd., 1994; Yang vd., 1995). Çözücü olarak suyun kullanılması, hızlı ve konsantre ürünlerin eldesine imkan sağlayan yeşil teknolojiler başlığına değerlendirilen BSSE farklı işletme şartlarıyla araştırmacıların dikkatini çeken bir yöntemdir (Ko vd., 2020).

Su, başka hiçbir çözücüde bulunmayan kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptir (Plaza ve Turner, 2015). Oda sıcaklığında su, 1.0×10^{-14} olan ayrışma sabiti (K_{su}) ile tanımlandığı gibi hidronyum iyonu (H_3O^+) ve hidroksit iyonu (OH^-) olarak ayrışan polar bir sıvıdır. Bu ayrışma genellikle “suyun kendi kendine iyonlaşması” olarak tanımlanır. Ayrıca su, 20°C’de 80° nispilek son derece yüksek bir bağıl statik geçirgenliğe (ϵ_r , dielektrik sabiti olarak da adlandırılır) sahiptir. Yani havada elektrik ile yüklenmiş iki küre arasındaki çekme ya da itme, suyun içinde 80 kez daha fazladır.

Suyun dipol momentinin küçük olmasına karşılık dielektrik sabitinin büyük olmasının nedeni, su moleküllerinin hidrojen bağlarıyla büyük polimerler meydana getirebilmesidir. Suyun evrensel bir çözücü olarak adlandırılmasının nedeni yüksek dielektrik sabiti olarak ifade edilebilir. İyonlar arasındaki elektrostatik etkileşim yüksek dielektrik sabitine sahip çözeltilerde daha azdır. Bu, suyun diğer moleküllerle elektrostatik bağlar oluşturduğu ve böylece onu çevreleyen iyonlar arasındaki moleküller arası etkileşimi azalttığı veya ortadan kaldırdığı anlamına gelir (Plaza ve Turner, 2015). Suyun özelliklerinin sıcaklıkla değişimi Şekil 2.2’de görülmektedir.

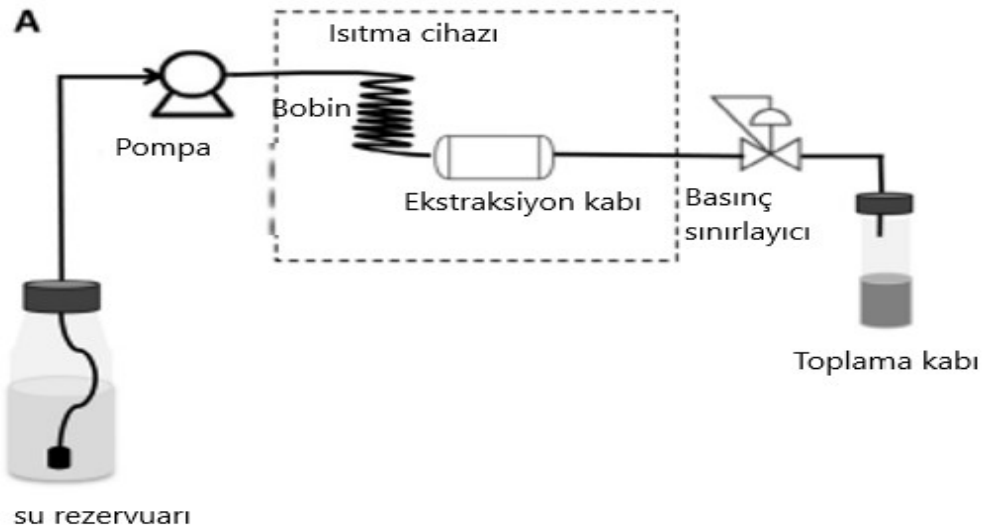


Şekil.2.2. 300 bar basınç altında sıcaklık değişimiyle yoğunluk, dielektrik sabiti, ayrışma sabitinin değişimi ((Sularia vd., 2020)

Suyun çok iyi bir çözücü olması iyonlar veya polar moleküller için geçerlidir. Apolar moleküller çözmede iyi değildir. Suyu yüksek sıcaklık ve basınç altında yapılan ekstraksiyonda ilginç ve uygulanabilir bir çözücü yapan şey, sıcaklığın artmasıyla suyun kimyasal ve fiziksel özelliklerinin büyük ölçüde değişmesidir (Plaza ve Tuncer, 2015; Brunner, 2014). Yüksek sıcaklıktaki sıvı su, suyu daha az polar bir çözücü haline getirmektedir. Örneğin, 200–275°C arasındaki sıcaklıklarda sıvı yapıda suyun dielektrik sabiti, ortam koşullarında metanol ve etanolün sahip olduğu dielektrik sabiti değerine yaklaşmaktadır (Plaza ve Tuncer, 2015). Bu durum ise farklı yapıdaki bileşenlerin bitkisel materyallerde kazanılmasına imkân sağlamaktadır.

BSSE'yi yürütmek için ihtiyaç duyulan donanım karmaşık değildir. İki tür işletim şekli vardır: dinamik (sürekli akış) sistemler ve statik (kesikli, parti) sistemler (Plaza ve Tuncer, 2015; Liu vd., 2014). Her iki durumda da ekstraksiyon sisteminde kullanılacak su, analitlerin oksidasyonunu önlemek için oksijen içermemelidir. Suyun gazdan arındırılması için yaygın olarak kullanılan yöntemler, ultrasonik işlem (sonikasyon) veya inert gazla (He, N₂) süpürmedir. Oksijen gazının çoğunun sudan uzaklaştırılmasını sağlamak için sonikasyonla en az 60 dakika yeterlidir (Plaza ve Tuncer, 2015; Liu vd., 2014). BSSE işlemi için bir yüksek basınç pompasına, bir ekstraksiyon kabına, bir ısıtma sistemine, bir geri basınç vanasına ve bir toplama şişesine ihtiyaç vardır. Şekil 2.3'te dinamik yöntemde bulunan ekipmanların şematik gösterimi verilmiştir. Sistemde kullanılan pompa eski bir HPLC pompası olabilir, çünkü ekstraksiyonlarda kullanılan akış hızlarının kesinliği genellikle kromatografideki kadar kritik değildir. Pompa, gazı giderilmiş

suyu ekstraksiyon kolonundan basınç sınırlayıcı aracılığıyla toplama şişesine iletir. Pompa, ekstraksiyon işlemi sırasında suyu sıvı halde tutmak için gerekli basıncı (3,5–20 MPa) sağlayabilmelidir. Suyun ısıtılması ya bir fırın (örneğin eski bir GC fırını) ya da bir ısı eşanjörü, ısıtma bandı veya ısıtma ceketli ile yapılır. Genellikle paslanmaz çelikten yapılan boru, ayarlanan sıcaklığın aynı zamanda suyun ekstraksiyon kabına girmeden önceki sıcaklığı olmasını sağlamak için ısıtma cihazının içine sarılır. Ekstraksiyon kabı genellikle paslanmaz çelikten yapılır ve numune kayıplarını ve boruların tıkanmasını önlemek için her iki uçta fritlere sahip olmalıdır. Orta dereceli sıcaklıklar ve basınçlar kullanılırsa (yani, 100–200°C ve 5-10 MPa'lık biyoaktif bileşikler için tipik ekstraksiyon koşulları), ekstraksiyon kabı olarak boş bir HPLC kolonu kullanılabilir. Bununla birlikte, kritik noktaya yakın sıcaklıklar kullanılacaksa (yani, 250°C'nin üzerinde 374°C'ye doğru), kabın korozyonunu önlemek için, çıkarma kabı korozyona dayanıklı bir metal alaşımdan (örn. Hastelloy) olmalıdır. Ekstraksiyon kabı içindeki basıncı kontrol etmek ve ekstraksiyon kabının çıkışında suyun kaynama etkilerini önlemek için basınç kısıtlaması gereklidir. Basınç sınırlayıcı, bir iğneli valf, bir geri basınç regülatörü, ince bir kılcal boru olabilir veya yukarı akışta yeterli basıncı sağlamaya yetecek kadar küçük bir çıkış sağlayan, sıkıştırılmış bir ucu olan basit boru kullanılabilir.

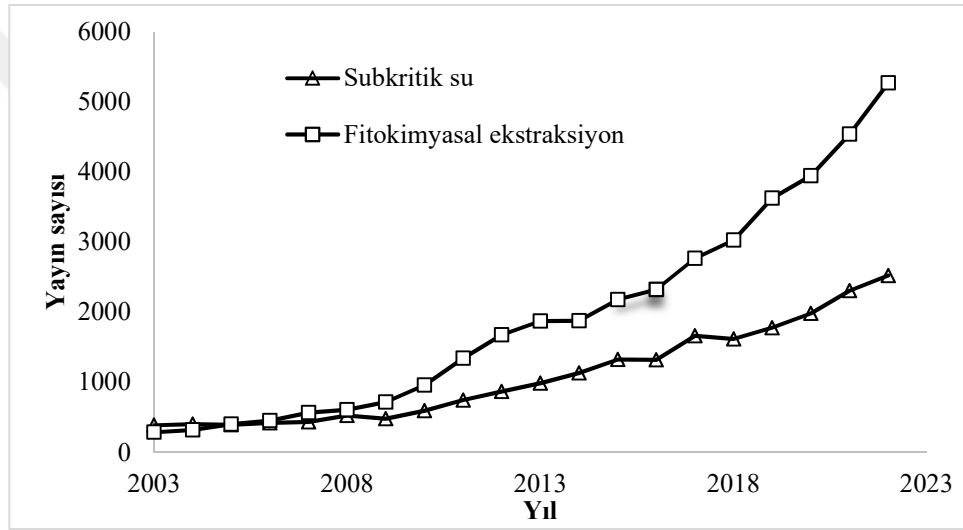


Şekil 2.3. Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu sistem şeması (Plaza ve Tuncer, 2015)

BSSE'de suyun kullanılmasından dolayı tıbbi aromatik bitkiler yanında sebze ve meyve ekstraktlarının gıda veya fitoterapide kullanılabilmesi en büyük avantajıdır. Diğer bir avantaj, BSSE'den sonra sıvı atık bertarafına gerek olmamasıdır. Organik çözücülerle karşılaştırıldığında, basınçlı sıcak su ekstraksiyonu sadece ekoloji, ekonomi ve güvenlik açısından değil aynı zamanda

çözücünün yoğunluğunun, iyon içeriğinin ve dielektrik sabitinin sıcaklığa göre ayarlanabilir olması yöntemin önemli bir avantajıdır (Cheng vd., 2021).

Fenolik veya flavonoidler gibi biyoaktif bileşenlerin ekstrakte etmek için organik bir çözücünün kullanılmasını gerektirmeyen, çevre dostu ve verimli alternatif bir ekstraksiyon yöntemidir. BSSE, çevresel risklere sahip organik çözücülere ihtiyaç duymadan yüksek biyolojik aktiviteye sahip ekstraktların eldesine imkan sağlayabilir (Ko vd., 2020). Çevre dostu teknolojilerin kullanımının öneminin giderek anlaşıldığı günümüzde biyoaktif maddelerin kazanılması için hızlı bir yöntem olup biyoaktif bileşiklerin üretimi için faydalı bir teknoloji olacağı öngörülmektedir (Ko vd., 2020). Web of Science veri tabanında subkritik su ve fitokimyasal ekstraksiyon işlemleriyle ilgili yapılan araştırmaların değişimi Şekil 2.4’de görülmektedir.



Şekil 2.4. Web of Science veri tabanı değerleri

Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonunda Verimliliği Etkileyen Sebepler

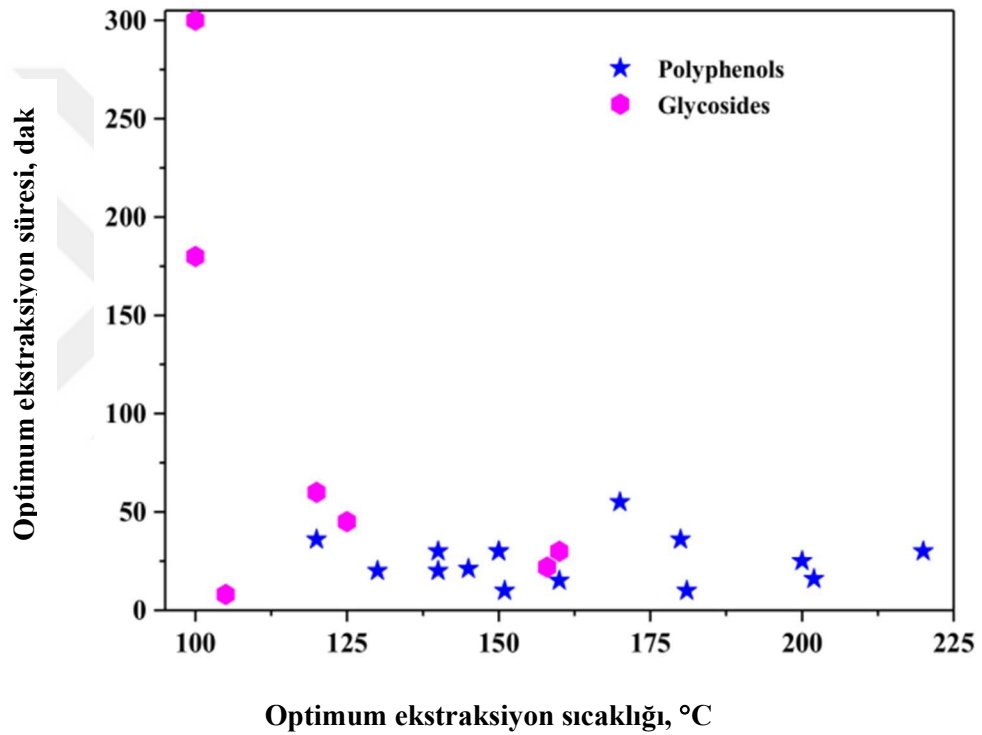
Sıcaklık, partikül boyutu ve ekstraksiyon akış hızı BSSE'yi etkileyen ana parametreler olmakla birlikte, analitin türü, ekstraksiyon kabı özellikleri ve ısı kaynağı ve ilave çözücülerin kullanımı da önemlidir. Bunların yanında matris ve diğer etkilerin bir rol oynamasına rağmen BSSE'de ekstraksiyon koşulları (yüksek sıcaklık) nedeniyle bunların etkileri daha sınırlı olmaktadır.

a. Sıcaklık

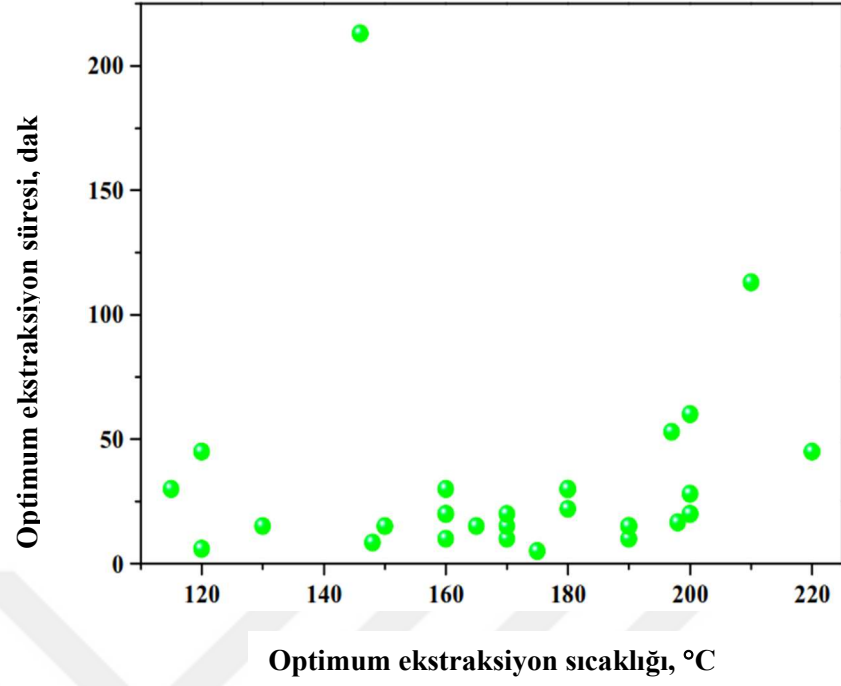
BSSE verimlerini etkileyen en önemli parametrelerden biri ekstraksiyon sıcaklığıdır. Sıcaklık arttıkça, geçirgenlikte belirgin ve sistematik bir azalma, difüzyon hızında bir artış ve viskozite ve yüzey geriliminde bir azalma olur. Su sıcaklığındaki bu değişim sonucunda analitin imkân veren en yüksek sıcaklığında ekstraksiyon işlemini yapmak uygun olacaktır. Ekstraksiyon sıcaklığının belirli bir değerin üzerine çıkarılmasının biyoaktif bileşenlerin bozulmasına, kimyasal

reaksiyonlara yol açtığı bilinmelidir. Ancak sıcaklığın artmasıyla istenmeyen bileşenlerinde ekstrakta geçecektir. İzin verilen maksimum ekstraksiyon sıcaklığı, farklı bitki materyalleri için deneysel olarak elde edilmelidir. Uçucu yağların ekstraksiyonu ile ilgili olarak, 125 ile 175°C arasındaki sıcaklıkların en iyi koşul olacağı gösterilmiştir (Plaza ve Turner, 2015; Gil-Ramírez vd., 2012; Lindahl vd., 2010; Jentzer, 2015).

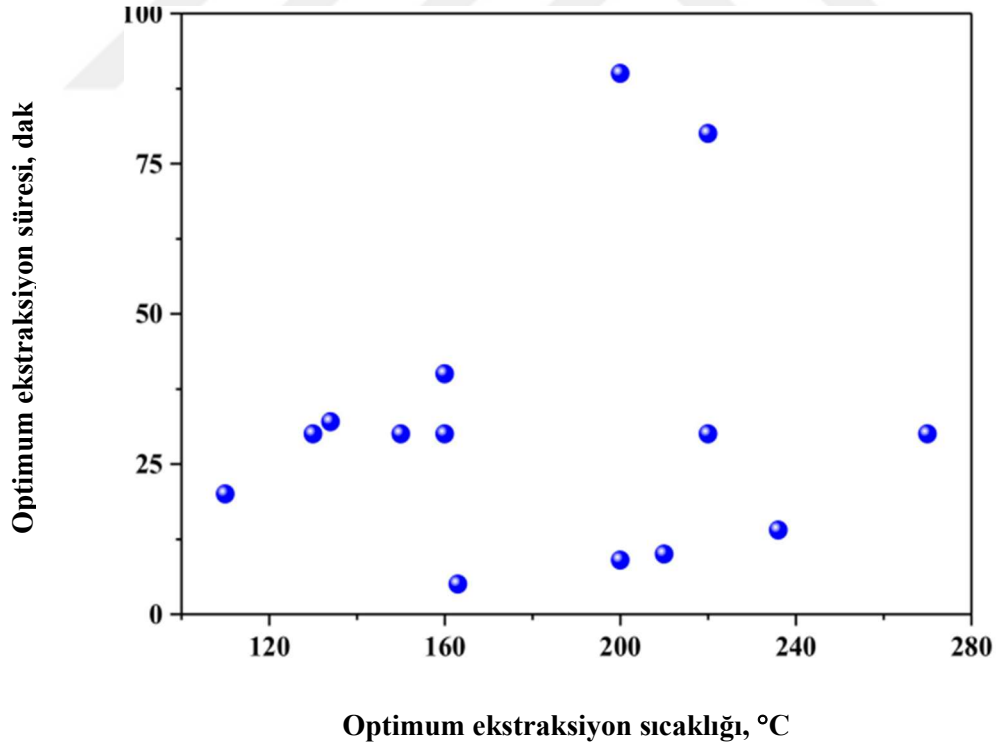
Şekil 2.5, Şekil 2.6, Şekil 2.7 ve Şekil 2.8’de bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen biyoaktif bileşenlerin optimum sıcaklık değerleri grafik olarak verilmiştir. Optimum ekstraksiyon sıcaklığı analit türüne bağlı olarak kısmen değişmekle birlikte 100-200 °C arasında olduğu görülmektedir.



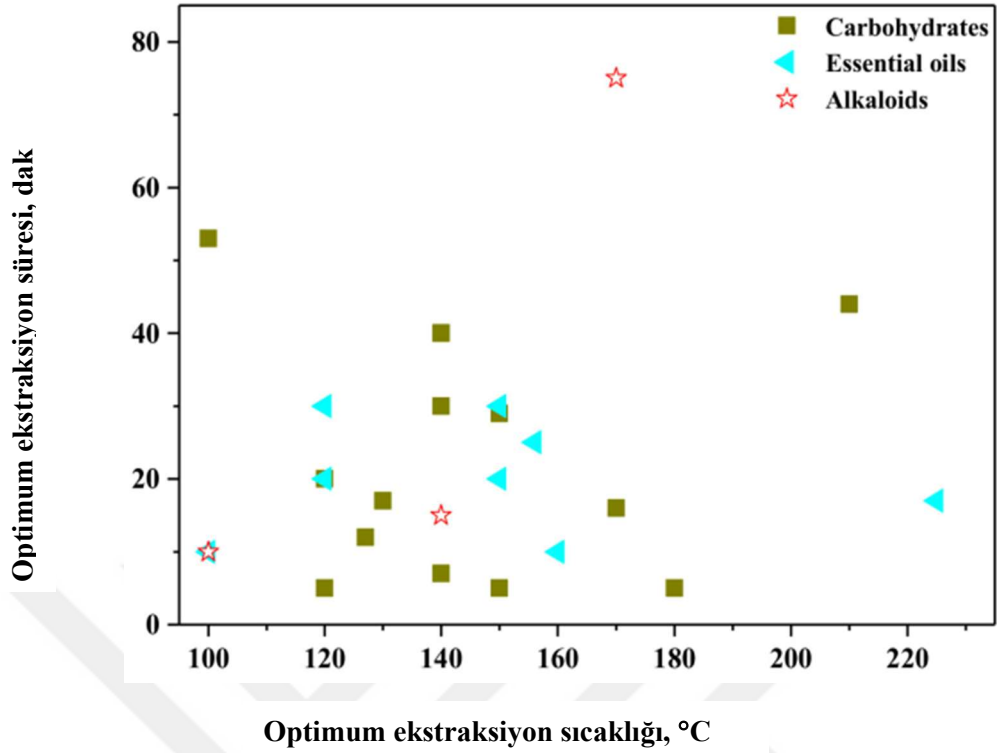
Şekil 2.5. Bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen biyoaktif bileşenlerin optimum sıcaklık değerleri



Şekil 2.6. Bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen flavanoid için optimum sıcaklık değerleri



Şekil 2.7. Bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen Organik asitler için optimum sıcaklık değerleri



Şekil 2.8. Bitkisel kaynaklardan BSSE ile elde edilen karbondihratlar,esansiyel yağlar ve alkaloidler için optimum sıcaklık değerleri

b. Akış hızı ve ekstraksiyon süresi

BSSE sırasında kimyasal reaksiyonları en aza indirmenin bir yolu, ekstraksiyon işleminin yeterince yüksek bir akış hızına sahip sürekli bir akış sistemi kullanmaktır. Daha yüksek bir akış hızı, yalnızca analitlerin yüksek sıcaklıktaki suda kalma süresini azaltmakla kalmayacak, aynı zamanda kinetik çözücü içindeki çözünürlük sınırlıysa analitlerin ekstraksiyon hızını da artıracaktır. Bununla birlikte, çok yüksek bir akış hızında geçen çözücü ekstraktın gereksiz seyreltmesine yol açacaktır ve daha sonraki aşamada konsantre edilmesi gerektirebilir (Plaza ve Turner, 2015).

c. Tanecik boyutu

Numunenin partikül boyutu ekstraksiyon kinetiğini etkiler, çünkü küçük partikül boyutu numune ile çözücü arasındaki temas yüzeyinin artmasına neden olur. Partikül boyutu, kanal oluşturma etkilerinden (yani partiküllerin aglomerasyonundan) kaçınırken temas yüzeyini en üst düzeye çıkarmak için uygun olmalıdır. Bazı uygulamalarda, ekstraksiyon verimini maksimize etmek için numunenin ve ekstraktanın tek tip dağılımını desteklemek için ekstraksiyon kabındaki numuneye dispersantlar (örneğin cam boncuklar) eklenir. Çok küçük tanecik boyutu sürekli sistemlerde kolon basınç düşmesini ve tasarımsal problemler oluşturabilmektedir. Homojen bir ısı dağılımı ekstraksiyon sıcaklığı, akış hızı ve tanecik boyutuyla yakından ilişkili bir sonuçtur.

d. Diğer parametreler

Yukarıda açıklanan önemli değişkenlerin yanı sıra, diğer parametrelerin de BSSE'de ekstraksiyon verimliliği üzerinde büyük etkisi olabilir. Örneğin, bazı organik ve inorganik değiştiricilerin, yüzey aktif maddelerin ve katkı maddelerinin eklenmesi, analitlerin özütleyici içindeki çözünürlüğünü artırabilir ve numune matrisinin fiziksel özelliklerini ve analitlerin numuneden desorpsiyonunu etkileyebilir. Ancak suyun sıcaklıkla değişen özelliklerinin kullanılması diğer yan reaksiyonlara yol açacak katalizör ve organik çözücüler olmadan yapabilir, uygun koşullarda işletilen BSSE yeşil kimyanın ilkelerini karşılayabilir.

Çözücü-numune oranı, BSSE'de önemli bir parametredir. Daha yüksek bir çözücü-örnek oranı, ısıtılacak daha fazla su gerektirir. Ek olarak, analit özüt içinde daha az konsantre olacaktır, bu nedenle analitin bir konsantrasyon adımı gerekli olabilir, bu da daha uzun toplam analiz sürelerine neden olur ve analitlerin bozunma riskini artırır. Çözücü-numune oranının mümkün olduğu kadar küçük ama aynı zamanda mümkün olan en yüksek ekstraksiyon verimini sağlayacak kadar büyük olması önemlidir (Plaza ve Turner, 2015). Numunenin nem içeriği, ekstraksiyon verimini etkileyebilecek başka bir parametredir (Plaza ve Turner, 2015).

Su sıvı halde kaldığı sürece, toplam basıncın suyun özellikleri üzerinde çok az etkisi vardır. Gerçek ekstraksiyon işlemlerinde, basıncın suyun dielektrik sabiti üzerinde minimum etkisi olduğu için, çeşitli organik çözücülerini taklit etmek amacıyla suyun dielektrik sabitini kontrol etmek için suyun sıcaklığının ayarlanması yeterlidir. Bu nedenle, suyun doyma basıncı aşılmadığı ekstraksiyona etkisi yoktur (Plaza ve Turner, 2015; Liu vd., 2014).

2.4. Fıstık çamı (*Pinus pinea*)

Fıstık çamı (*Pinus pinea*) Akdeniz havzasında, özellikle kıyı bölgelerinde, Güney Batı Avrupa'da bol miktarda bulunan, şemsiye şeklinde, 25-30 m boylanabilen, yaprak dökmeyen iğne yapraklı bir ağaçtır. İğneler 2-4 yıl dayanır ve mavimsi yeşil, iki demet halinde, ortalama 8-15 cm uzunluğunda ve soğan kokuludur. Gövde kabuğu geniş, kırmızımsı kahverengi, derin çatlaklıdır (Viñas vd., 2016).

Meşcereler, sıcak ve kurak yazlar (5 aya kadar kuraklık) ve yağışlı, ılıman kışlar (0°C'nin üzerinde en soğuk ayın ortalama sıcaklığı ve yağış 600 –800 mm/yıl) ile karakterize edilen termo ve mezo-Akdeniz iklim bölgelerinde ve yarı nemli biyoiklimlerde bulunur. Hafif kireçli zeminleri tolere etmesine rağmen asidik veya nötr kumlu toprakları tercih eder (Fady vd., 2004). Erkek ve dişi çiçekleri aynı ağaçta bulunur (monoecy). Polen rüzgarla taşınır. Dölllenme, tozlaşmadan 2 yıl sonra gerçekleşir ve kozalaklar 3 yılda olgunlaşır (Fady vd., 2004). Tohum kozalakları oval-küresel, 8-12 cm uzunluğunda, gençken yeşil ve olgunlaştığında kırmızımsı kahverengidir ve üçüncü yılda olgunlaşır (Viñas vd., 2016). *P. pinaster*'ın en belirgin özelliği, minimum besin sağlayan fakir topraklarda yetişebilmesidir (Vieito, 2019). Akdeniz havzasında, kalın kabuğu ve

yüksek tepesi onu diğer çam türlerine göre yangına daha az duyarlı hale getirir de, orman yangınları fıstıkçamı için en büyük tehdidi oluşturmaktadır. Düşük bir genetik çeşitlilik göstermesine rağmen, geniş bir iklim ve toprak koşulları yelpazesine sahiptir (Viñas vd., 2016). Akdeniz ülkelerinin peyzajında karakteristik bir ögedir. Vatanı Portekiz'den Anadolu'ya kadar tüm Akdeniz sahil kesimidir (Yaltırık ve Efe, 2000). *Pinus pinea*, Portekiz'den Suriye'ye kadar tüm kuzey ve doğu Akdeniz'in yanı sıra Karadeniz'in bazı kıyı bölgeleri boyunca düzensiz bir şekilde dağılmıştır. Kuzey Akdeniz'de deniz seviyesinden 500-600 m'ye kadar ve Doğu Akdeniz'de 800-1400 m'ye kadar bulunabilir (Fady vd., 2004). Şekil 2.9'da Fıstıkçamı ağacı görülmektedir.



Şekil 2.9. Fıstıkçamı ağacı (URL -1)

Pinus pinea (eski adıyla *Pinus domestica*), yenilebilir tohumları nedeniyle tarih boyunca Etrüskler, Yunanlılar, Romalılar ve Araplar tarafından Akdeniz çevresine yaygın bir şekilde ekilmiştir. İspanyol Paleolitik yerleşimlerinde *P. pinea*'nın yaklaşık 50.000 yıllık koni ve odun kömürü parçaları bulunmuştur. Anadolu, Lübnan ve İber yarımadası en muhtemel orijinal bölgeleridir. *Pinus pinea*, Arjantin ve Güney Afrika'nın yanı sıra Kuzey Afrika'ya (çoğunlukla Tunus, Cezayir ve Fas) yayılmaktadır. Diğer yerlerde bulunması (örneğin Kaliforniya, İskoçya, Güney İngiltere) genellikle park ve bahçelerle sınırlıdır (Fady vd., 2004). İber Yarımadası toplam *P. pinea* meşcerelerinin yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır: İspanya 464000 hektar ve Portekiz

130300 hektar. Bu tür ayrıca Türkiye'de (40000 ha), İtalya'da (40000 ha), Tunus'ta (15000 ha), Fransa'da (13515 ha), Fas'ta (3000 ha) ve İsrail'de (2000 ha) bulunur (Miranda vd., 2017; Loewe vd., 2011). İspanya ve Portekiz'de yıllık ortalama çam fıstığı üretimi yaklaşık 7000 tondur ve dünya çam fıstığı üretiminin (diğer çam türlerinden elde edilen fındıklar dahil) %40 ila 60'ını temsil etmektedir (Miranda vd., 2017).

2.4.1. Fıstık çamı Kabuğu

Fıstık çamı (*Pinus pinea*), güçlü kahverengi kırmızımsı renkte, kalın pullu bir kabuğa sahiptir. *Pinus pinea* 'nın kabuk anatomisi, kambiyumdan dışa doğru üç yapısal katman gösterir. Bunlar: ikincil floem, en içteki periderm ve ritidomedir (Nunes vd., 1999). Oldukça geniş, sarımsak-beyaz renkli diri odunu, bundan belirgin şekilde ayrılan kırmızımsak-kahverenginde özodunu vardır (Yaltırık ve Efe, 2000).

Çam kabuğu 2000 yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır. Çam kabuğunun terapötik kullanımına ilişkin göstergeler, Hippocrates'in iltihaplı hastalıklara karşı kullanımından bahsettiği MÖ 4. yüzyılda bulunur (Packer vd., 1999; Kollasch ve Nikel, 1995). Eczacı H. Miner tarafından 1479'da derlenen Thesaurus Medicaminum'da, çam kabuğunun yaraların iyileşmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (Packer vd., 1999; Minner, 1479). Eski Avrupa'da çam kabuğu, iltihaplanmaya karşı ve iskorbüt semptomlarının üstesinden gelmek için kullanılmıştır (Packer vd., 1999; Dragendorff, 1898)

Yeni Dünya'da Kızılderililer, çam kabuğunu bir yiyecek, bir içecek ve iltihaplı yaralar veya artık serbest radikal tutulumu olduğu kabul edilen ülserler gibi çeşitli durumlar için ilaç olarak kullanmışlardır (Packer vd., 1999; Chandler vd., 1979; Fielder, 1975; Youngken, 1924). Çam kabuğunun, iskorbüt, cilt bozuklukları, yara iyileşmesi, C vitamini eksikliğinin giderilmesi gibi birçok durum için kullanıldığı belirtilmektedir (Packer vd., 1999).

Roma döneminden beri kereste (inşaat ve gemi yapımı) için yetiştirilmesine rağmen, ekonomik açıdan en önemli ürünü yenilebilen tohumu olan çam fıstığıdır (Latince adı "pinea"). Çam fıstığının geleneksel olarak pazarlandığı başlıca ülkeler İspanya, Portekiz, İtalya, Tunus ve Türkiye'dir. Ekonomik değeri olan diğer ürünler arasında reçine, ağaç kabuğu (tanin ekstraksiyonu için) ve boş çam kozalağı kabukları (yakıt için) bulunur. *Pinus pinea* ayrıca şu anda Akdeniz çevresinde çevre koruma için yaygın olarak yetiştirilmektedir.

Çam fıstığı için dünya çapında büyüyen bir pazar vardır. *Pinus pinea*, dünya çapındaki dokuz ana ağaç yemi türünden biridir ve tohumları, özellikle proteinler (%32), yağlar (%45) ve B1 ve B2 vitaminleri açısından zengin, yüksek bir besin içeriğine sahiptir (Fady vd., 2004). *Pinus pinaster* özleri fenolik asitler, flavanoller ve flavonoidler (örn. sinamik asit, hidroksibenzoik asit, kateşin, kuersetin ve taksifolin) güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir. Bu özler, kardiyovasküler,

metabolik, nörolojik vb. gibi çeşitli hastalıkların tedavisi için faydalı etkiler göstermiştir (Ferreira-Santos vd., 2020).

Kabuk, biyoaktif bileşiklerde en yüksek içeriği gösterir. Bileşenleri arasında patojenlerin istilasını geciktirmek veya önlemek ve rezerv maddeleri ve bitkisel hormonları depolamak gibi farklı işlevlere sahip maddeler bulunabilir. Farklı bitkilerden elde edilen ağaç kabuğu, hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için tıbbi değerli ürünler elde etmek için kullanılmıştır. Örneğin; Asetillenmiş formu aspirin olan salisilik asit, *Salix alba* kabuğundan elde edilir. Ayrıca *Cinchona calisaya* ve *Cinchona pubescens* kabuğundan kinin gibi çok önemli bir alkaloid elde edilir. Kinin, sıtma önleyici, analjezik ve ateş düşürücü özelliklere sahip doğal beyaz şeffaf bir alkaloiddir. Tüm dünyada yaygın olarak kullanılan bir tür olan tarçın, orijinleri Ortadoğu olan *Cinnamomum verum* ağacının kabuğundan elde edilmektedir. Tarçın, aroma verici özelliklerinin yanı sıra birçok başka farmasötik özelliğe de sahiptir. Eski zamanlardan beri kullanılan yaygın olarak bilinen maddelere ek olarak, yeni araştırmalar şu anda örneğin *Mangifera indicatree* (mango) gibi farklı ağaç türlerinin kabuklarında biyoaktif ürünler keşfediyor. Bu ağacın yaprakları ve kabuğu, cilt enfeksiyonlarını gidermek ve şeker hastalığını tedavi etmek için analjezik gibi tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Bu bağlamda, çam kabuğu ilginç bir yeni biyomedikal bileşikler kaynağıdır, ancak birkaç yıl öncesine kadar yanıcı veya alt tabaka bahçeciliği gibi çok sınırlı kullanımlarla ağaç endüstrisinin yan atığı olarak atılmıştır. Çam ailesinin 100'den fazla türü içinde en çok besleyici ve tıbbi amaçlarla kullanılan *Pinus pinaster* deniz çamıdır (Mármol vd., 2019).

Tarih boyunca şifalı bitkiler birçok hastalığın tedavisi için kullanılmıştır. Doğal kaynaklardan elde edilen aktif bileşenler, klinik kullanım için yeni terapötik ajanlar sağlamak için çoğu farmakolojik araştırmanın güncel odak noktasıdır. Pinus türlerinden elde edilen uçucu yağlar geleneksel olarak tıpta kullanılmaktadır (Elkady vd., 2021). Pek çok Pinus türünden elde edilen uçucu yağlar ilaç, gıda ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. (Mellouk vd., 2016).

Çam kabuğu, polimerik flavanoller, tannik asit, flavonoidler ve kafeik veya protokatesik asit gibi diğer fenolik asitler dahil olmak üzere büyük bir biyoaktif molekül içeriğine sahiptir (Mármol vd., 2019). Çam kabuğu, kereste endüstrisinden gelen bir tarımsal endüstriyel kalıntıdır ve fenolik bileşiklerin bir kaynağını temsil eder (Vieito vd., 2019). Pinus türlerinden elde edilen uçucu yağlar geleneksel olarak tıpta kullanılmaktadır (Elkady vd., 2021). Pek çok Pinus türünden elde edilen uçucu yağlar ilaç, gıda ve kozmetik endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Çam gibi bitkilerden izole edilen özler, kozmetikte koku, yiyecek ve içeceklerin tatlandırıcı katkı maddeleri ve deterjanlar, sabunlar veya böcek kovucular dahil olmak üzere çeşitli ev ürünlerinde koku verici maddeler olarak kullanılır. Ayrıca parfüm kimyasallarının sentezinde ara madde olarak ve geleneksel olmayan tıbbi amaçlarla aromaterapide de kullanılırlar (Mellouk vd., 2016).

Çam ürünleri büyük ticari önem kazanmış ve geleneksel tıpta uzun süredir kullanılmaktadır. Çam katranı ve terebentin yağları genellikle romatizmal rahatsızlıklar için tahriş edici olarak, analjezik olarak ve egzama gibi cilt hastalıklarını tedavi etmek için harici olarak kullanılırken, çam iğnesi yağları burun tıkanıklığını giderici, öksürük, balgam söktürücü olarak kullanılmıştır (Elkady vd., 2021)

P. pineaster çamı kabuğu özü, Birleşik Devletler Farmakopesi'nde (USP) bir diyet takviyesi olarak listelenmiştir. *P. pinaster*'dan ticari olarak temin edilebilen iki farklı ekstraktı vardır: Pycnogenol®(PYC) ve Flavangenol®. PYC, başta prosiyanidinler ve fenolik asitler olmak üzere flavonoidlerin bir karışımından oluşan Fransız deniz çamı kabuğunun (*P. pinaster*) standartlaştırılmış bir özüdür. PYC, kabuğun su ve alkol ile özütlenmesiyle elde edilir ve tüm dünyada besin takviyesi ve çeşitli hastalıklara fitokimyasal ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu öz, uzun süredir açık yaraları ve cilt hasarını iyileştirmek ve iskorbüt hastalığını önlemek için kullanılmaktadır. Kılcal geçirgenliği artırarak mikrosirkülasyonu iyileştirdiği ve askorbil radikalini yeniden oluşturabildiği ve endojen E vitamini ve glutasyonu oksidatif strese karşı koruyabildiği için dolaşım sorunlarının tedavisi ve kardiyovasküler faydaları için de kullanılır. Öte yandan, Flavangenol®, kabuğun sıcak su ile özütlenmesiyle elde edilir ve B1 prosiyanidin'in ana bileşen olduğu oligomerik proantosiyandinin-siyandininler içerir. Flavangenol®'ün UVB'nin neden olduğu cilt kanseri üzerinde önleyici bir etkiye, bir antihipertansif etkiye ve arenal bozukluğu baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu ve ayrıca arteriosklerozu baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. PYC ve Flavangenol®, ormancılık endüstrisinin bir yan ürününün farklı türde ekstraksiyon yöntemleriyle besin takviyesi olarak ikinci bir ömrü olabileceğini kanıtlıyor (Mármol vd., 2019).

Çam kabuğu ilginç bir yeni biyomedikal bileşikler kaynağıdır, ancak birkaç yıl öncesine kadar yanıcı veya alt tabaka bahçeciliği gibi çok sınırlı kullanımlarla ağaç endüstrisinin yan atığı olarak atılmıştır. Çam ailesinin 100'den fazla türü içinde en çok besleyici ve tıbbi amaçlarla kullanılan *Pinus pinaster* deniz çamıdır (Mármol vd., 2019). *P. pinea* kabuğu, önemli miktarda tanen ve nispeten düşük polisakkarit ve lignin içeriği gösterir, bu da onu potansiyel bir polifenol kaynağı olarak çekici kılar (Miranda vd., 2017).

Çam kabuğu, polimerik flavanoller, tannik asit, flavonoidler ve kafeik veya protokatesik asit gibi diğer fenolik asitler dahil olmak üzere büyük bir biyoaktif molekül içeriğine sahiptir (Mármol vd., 2019).

Çam kabuğu, çam ağacı gövdesinin %10-20'sini temsil ettiğinden, ağaç endüstrisinde bol miktarda bulunan bir kalıntıdır (Vieito vd., 2019; Braga vd., 2008). Şu anda, kabuğun yarısından fazlası yakılıyor veya çöpe atılıyor; geri kalanı çoğunlukla testere/hamur değirmenlerinde ucuz bir enerji kaynağı olarak kullanılıyor. Bu durum her iki olayda da çevresel sorunlara yol açabiliyor (Vieito vd., 2019; Jablonsky vd., 2017). Kabuğun, bazı önemli fitokimyasal bileşenlerle birlikte büyük miktarda ekstraktif madde ve atıkların dünya çapında geri kazanılması, geri dönüştürülmesi

ve iyileştirilmesi eğiliminin ardından yenilenebilir bir kaynak olarak kullanılabilen lignin içerdği gözlemlenmiştir (Vieito vd., 2019; Braga vd., 2008). Çam kabuğu, kereste endüstrisinden gelen bir tarımsal endüstriyel kalıntıdır ve fenolik bileşiklerin bir kaynağını temsil eder (Vieito vd., 2019).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal temini ve Örnek Hazırlama

Bu tez çalışmasında materyal olarak Fıstık çamı (*Pinus pinea*) kabukları kullanılmıştır. Fıstık çamı kabukları Aydın ili Çine yöresinden temin edilmiştir. Kabuklar üzerindeki toprak, kum gibi yabancı maddelerin giderilmesi amacıyla yıkanmış ve etüvde 60 °C de 1 gece boyunca kurutulmuştur. Kurumuş olan kabuk örnekleri Waring Commercial marka laboratuvar blender ile istenilen boyutta öğütülmüştür. Öğütülen kabuklar elek (Standart Testing Sieve) ile (16-30 mesh arasında) boyutlara ayrılmış ve ağzı kapaklı kutuda +4°C buzdolabında muhafaza edilmiştir. Şekil 3.1’de fıstık çamı kabuğunun öğütme öncesi ve öğütüldükten sonraki örneği gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Fıstık çamı kabuğu öğütme öncesi ve öğütme sonrası

3.2. Fıstık çamı Kabuğunda Temel Analizler

Fıstık çamı kabuğu için yapılacak olan analizlerde nem analizleri ASTM D 4442 – 92 (2003), uçucu madde analizleri ASTM E872 -92 (1998), kül analizleri ASTM E 1755 – 01’e ve sabit karbon analizi ise ASTM E870 (1998)’e göre gerçekleştirildi.

3.2.1. Uçucu madde ve Kül Tayini

Kül, organik maddelerin yakılması sonucu artakalan inorganik madde oksitlerinin oluşturduğu bir kalıntıdır. Öğütülmüş kabuk örneğinde kül tayini ASTM E 1755 – 01'e ve uçucu madde tayini de ASTM E 872 – 82 (Reapproved, 1998) göre yapılmıştır. Her iki tayin de Şekil 3.2'deki Nükleon Laboratory Equipment marka kül fırını ile yapılmıştır.

Kül fırını 900 °C'ye ayarlanarak içerisine 2 adet boş kapaklı kroze yerleştirildi ve krozelerdeki nemin uzaklaştırılması için 2 saat bekletildi. Süre sonunda kül fırınından çıkarılan kapaklı krozeler desikatör içerisine alınarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Krozeler oda sıcaklığına ulaştığında hassas terazi ile tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Boş krozeler sabit tartıma gelinceye kadar bu işleme devam edildi. Sabit tartıma gelmiş olan krozelerin içerisine 1 gr numuneden tartılarak konuldu. Krozelerin kapağı kapatılarak 900 °C'de 7 dakika kül fırınında bekletildi. Bu işlemde uçucu maddelerin ve nemin uzaklaşması sağlanmış oldu. Süre sonunda krozeler desikatöre alınarak oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve hassas terazide tartım yapıldı, sonuçlar kaydedildi.

Kül fırınının sıcaklığı 575 °C'ye düşürüldü ve uçucu maddeleri uzaklaştırılmış olan krozeler tekrar kül fırınına kapaksız şekilde koyarak 4 saat bekletildi. Süre sonunda kül fırınından alınan krozeler desikatör içerisinde oda sıcaklığına geldikten sonra tartımı yapıldı ve sonuçlar kaydedildi. Böylece numunenin kül miktarı da belirlenmiş oldu.



Şekil 3.2. Kül fırını

3.2.2. Ekstraktif Maddelerin Belirlenmesi

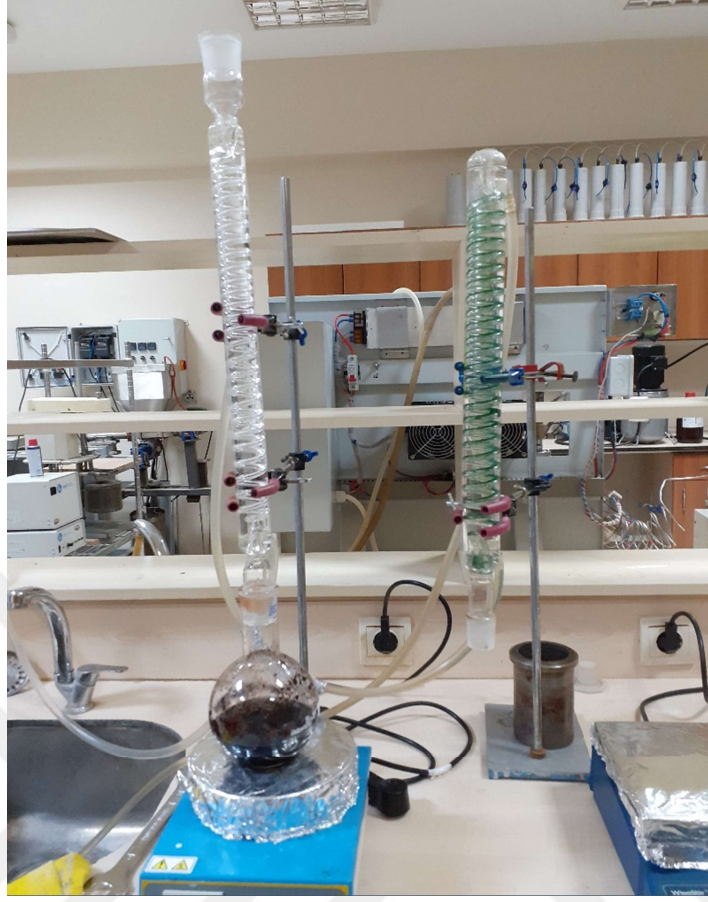
Ekstraktif madde tayini adaşlarının tanımladığı yönteme göre yapılmıştır (Li vd., 2004). Öğütülmüş kabuk örneğinden 12 gram tartıldı ve üzerine 150 mL aseton ilave edildi. Geri soğutuculu sistemde 3 saat boyunca kaynatılarak ekstrakte edildi. Süre sonunda, ekstrakt vakumlu süzgeç yardımı ile süzgeç k ğıdı kullanılarak süzüldü. Süzgeç kâğıdında toplanan kalıntı (şekil 3.3) 105  C’de etüvde sabit tartıma gelinceye kadar kurutuldu ve hesaplama için tartımlar kaydedildi.



şekil 3.3. Süzgeç kâğıdında toplanan s z nt 

3.2.3. Hemiselüloz Tayini

Bitki hücre duvarlarında bulunan ve çoğu bitki duvarının yaklaşık %25’ini oluşturan ve miktarı bitkiye göre değişen ikinci polisakkarit sınıfını oluşturan hemiselülozun tayini için Li ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem kullanılmıştır (Li vd., 2004; Ghalia ve Dahman, 2017). Ekstraktif madde analizi sonucunda etüvde kurutulan kalıntıdan 6 gram alınarak balon jöjeye konuldu.  zerine 150 mL, 0,5 M NaOH   zeltisi ilave edildi. Karışım geri soğutucu altında 3,5 saat karıştırıldı. şekil 3.4’te geri soğutuculu sistem görülmektedir. Süre sonunda karışım, süzgeç kâğıdında s z ld kten sonra saf su ile yıkanarak nötral pH’a getirildi. Süzgeç k ğıdındaki kalıntı sabit tartıma gelene kadar 105  C’de etüvde kurutuldu, desikatörde soğutulup, tartıldı ve tartım sonuçları kaydedildi.



Şekil 3.4. Geri soğutuculu sistem

3.2.4. Lignin Tayini

Lignin analizi için hemiselüloz analizi sonucunda sabit tartıma gelmiş olan kalıntıdan 1 gram alındı ve üzerine %72'lik 30 mL H_2SO_4 çözeltisi eklendi ve bu karışım oda sıcaklığında 24 saat bekletildi. Daha sonra bu karışımın üzerine 300 mL saf su ilave edilip geri soğutuculu sistemde 1 saat kaynatıldı. Karışım soğuduktan sonra süzgeç kâğıdında süzüldü ve saf su ile sülfat iyonu kalmayana kadar yıkandı. Şekil 3.5'te yapılan yıkama işlemi görülmektedir. Kalıntı etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulduktan sonra desikatörde soğutuldu, tartıldı ve tartım sonucu kaydedildi.



Şekil 3.5. Saf su ile yıkama işlemi

3.2.5. Selüloz Tayini

Selüloz miktarının belirlenmesinde, deneysel olarak belirlenen lignin, hemiselüloz ve ekstraktif madde yüzdeleri toplanıp, yüzden çıkarılması ile belirlendi.

3.3. Ekstrakta yapılan Analizler

Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uygulanan analizleri aşağıda verilmiştir.

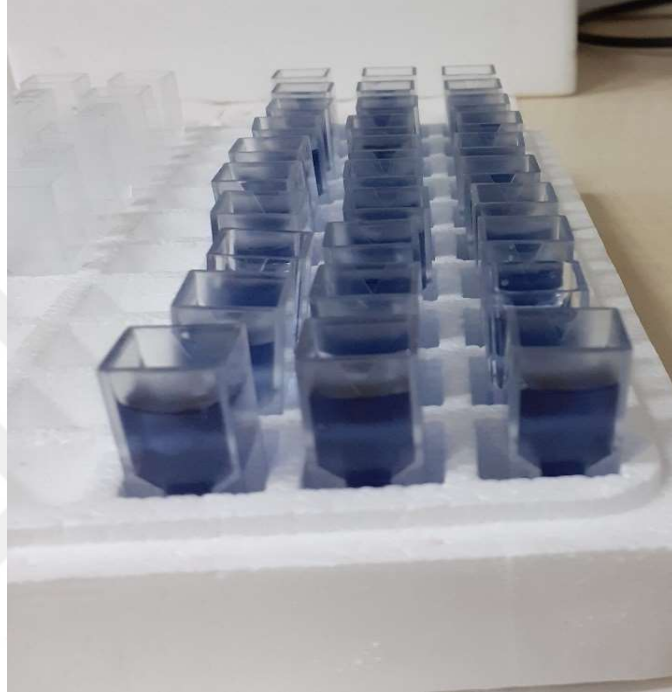
3.3.1. Toplam Fenolik İçerik Tayini

Fenolik bileşiklerin toplam içeriği, fenollerin indirgeme/oksidasyon reaksiyonuna dayanan Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenen kolorimetrik ölçüme dayanır. Fenolik bileşikler eğer bazik ortamda Folin-Ciocalteu reaktifi ile tepkimeye girerlerse fenolik bileşikler okside olur. Orijinali sarı renkli olan Folin - Ciocalteu reaktifi fenolik bilşenler ile mavi renkli bir forma dönüşür. Bu rengin şiddetinden yola çıkarak 700-760 nm de fenolik bileşiklerin analizi yapılabilir (Cemeroğlu, 2013). Toplam fenolik madde tayini Karabulut vd. (2018b) tarafından önerilen yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Tüm örneklerden 3 paralel olacak şekilde çalışıldı.

Analizlerin işlem sırası aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Ekstraktların absorbansı 0.8 'i geçmeyecek şekilde saf su ile seyreltme yapıldı (1:20).
- Seyreltilmiş ekstraktlardan deney tüplerine 100 µl konuldu.
- Üzerine 400 µl saf su eklendi.
- (1:10) oranında seyreltilen folin reaktifinden 1000 µl eklenerek vortekslendi.
- 4 dk sonra üzerine %7'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 1000 µl eklendi ve tekrar vortekslendi.

- Karışım oda sıcaklığında karanlıkta 90 dk inkübe edildi.
- Kör olarak saf su kullanıldı.
- Süre sonunda örneklerin 725 nm’de absorbans değerleri ölçüldü (Şekil 3.6).
- Sonuçlar gallik asit kalibrasyon eğrisiyle karşılaştırıldı ve gallik asit eşdeğeri olarak ifade edildi.



Şekil 3.6. Fıstık çamı kabuğunun toplam fenolik madde tayini

3.3.2. Toplam Flavonoid Miktarı Tayini

Alüminyum klorür ve sodyum nitrit ayıraçları kullanılarak, alkali ortamda renk veren flavonoid-alüminyum kompleksinin meydana gelmesiyle belirlenir. Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı tayini Makris vd. (2007) tarafından uygulanan metod esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerden 3 paralel olacak şekilde aşağıda verilen sırayla gerçekleştirilmiştir.

- Ekstraktların absorbansı 0.8 ‘i geçmeyecek şekilde saf su ile seyreltme yapıldı (1:20).
- Deney tüplerine 1 mL saf su konuldu, üzerine 250 µl seyreltilmiş ekstrakt eklendi.
- Deney tüplerine 75 µl %5’lik NaNO₂ çözeltisi eklenerek vortekslendi.
- 4 dk sonra 75 µl %10’luk AlCl₃ çözeltisi eklendi, tekrar vorteks yapıldı.
- 1 dk sonra 500 µl 1 M NaOH çözeltisi eklendi.
- Deney tüplerine tekrar 600 µl saf su eklendi, vorteks yapıldı.

- Bekleme yapılmadan kör olarak ekstrakt içermeyen reaktif karışımı kullanılarak 510 nm’de absorbans ölçüldü (Şekil 3.7.).
- Sonuçlar kuersetin eşdeğeri olarak ifade edildi.



Şekil 3.7. Fıstık çamı kabuğunun toplam flavonoid madde tayini

3.3.3. Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan kapasite ölçümü iki farklı analiz yöntemiyle takip edildi.

DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

DPPH (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil-hidrat) serbest radikal yöntemi, etanol içinde mor renkli bir çözelti üreten elektron transferine dayalı bir antioksidan tahlilidir. Oda sıcaklığında stabil olan bu serbest radikal, bir antioksidan molekülün varlığında indirgenir ve renksiz etanol çözeltisine yol açar, yani mor rengini kaybeder (Huang vd., 2005). Ekstraktların antioksidan aktivitelerini belirlemek amacıyla DPPH radikal süpürme gücü etkisi Villano vd. (2007) tarafından önerilen metoda göre gerçekleştirilmiştir. Üç paralel çalışılan örneklerde DPPH ölçümü aşağıda verilen işlem sırasında göre yapılmıştır.

- 1 mg 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil 50 mL % 70’lik metanol içerisinde çözündürülerek DPPH radikal çözeltisi hazırlandı.
- Ekstraktların absorbansı 0.8’i geçmeyecek şekilde uygun oranda saf su ile seyreltme yapıldı.
- Deney tüpüne 25 µl ekstrakt, üzerine de 75 µl saf su konularak 100 µl tamamlandı.

- Ekstrakt üzerine 1900 µl DPPH radikal çözeltisinden eklendi, vorteks yapılarak karanlık ortamda 90 dakika inkübe edildi.
- Kör olarak % 70'lik metanol kullanıldı.
- Bekleme süresi sonunda örnekler 517 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.
- Sonuçlar trolox eşdeğeri olarak ifade edildi.

ABTS (2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) Radikal Süpürücü Aktivite Analizi

Kromojenik bir redoks radikali olan ABTS [2,2'-azinobis (3- etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)] aynı zamanda kararlı bir radikaldir. Hem suda hem organik çözücülerde çözündüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan aktivite tayininde kullanılabilir. Yöntem, antioksidan varlığında çözeltideki ABTS radikalinin absorbansındaki azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır (Rice-Evans vd., 1984; Pellegrini vd., 1999). ABTS deneyi Nenadis vd. (2004) tarafından önerilen prosedüre göre aşağıda verilen sırayla gerçekleştirilmiştir.

- 16 saat önceden hazırlanan 7 mM ABTS ve 2.45 mM potasyum persülfat çözeltileri karıştırıldı.
- Ekstraktların absorbansı 0.8'i geçmeyecek şekilde uygun oranda saf su ile seyreltme yapıldı.
- Deney tüpüne 25 µl ekstrakt, üzerine de 75 µl saf su konularak 100 µl tamamlandı.
- Ekstrakt üzerine 1900 µl ABTS radikal çözeltisinden eklendi, vorteks yapılarak 6 dakika inkübe edildi.
- Kör olarak % 100'lik etanol kullanıldı.
- Örnekler 734 nm'de absorbans ölçümü yapıldı (Şekil 3.8).



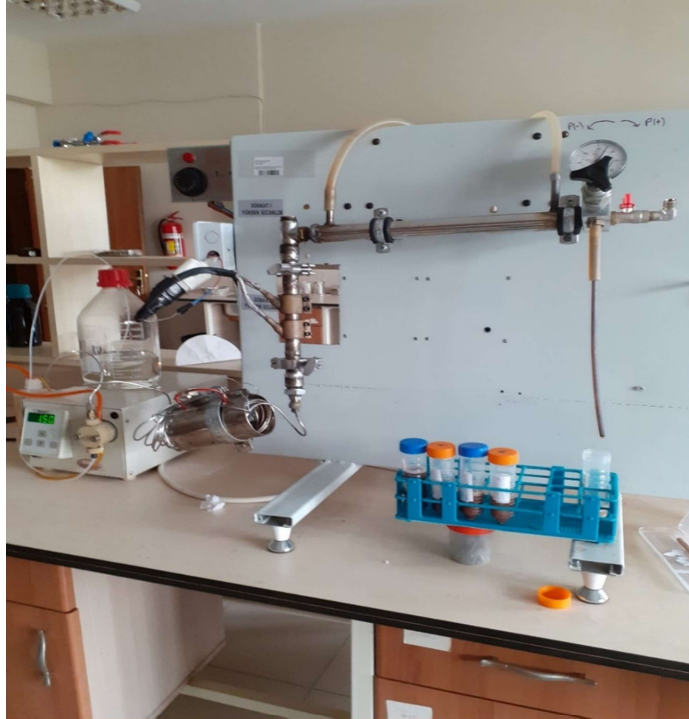
Şekil 3.8. Fıstık çamı kabuğunun ABTS tayini

3.4. Ekstraksiyon işlemleri

Deneyisel çalışmada kullanılan ekstraksiyon yöntemleri aşağıda verilmiştir. Basınçlı sıcak su ekstraksiyon için optimizasyon yapılmışken, diğer yöntemler literatürden alınmış optimum noktalarda gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu

Bu çalışmada subkritik su ekstraksiyonu Şekil 3.9’da verilen ekstraksiyon düzeneği ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sistemi, su rezervuarı, HPLC pompası, ön ısıtıcı sistemi, ekstraksiyon hücresi, soğutma sistemi ve geri basınç regülatöründen oluşmaktadır. Ekstraksiyonun ilk adımı, kullanılacak olan deiyonize suyun gazdan arındırılması işlemidir. Bunun için su öncelikle 30 dakika ultrasonik banyo da (Selecta, Ultrasound H-D) bekletilmiştir. Ardından su, sistemi doldurmak üzere belirli akış hızıyla HPLC pompası ile sisteme pompalanmıştır. Ekstraksiyon için çalışma parametrelerine ulaşıldığında, geri basınç regülatörü, ekstraksiyon hücresinin basıncının düşmesine imkân vermek üzere açılarak ekstraktlar toplama kaplarına alınmıştır. Her deneyden toplanan ekstraktlar, daha sonraki analizlerde (toplam fenolik madde miktarı, toplam flavanoid miktarı, DPPH radikal süpürücü etki tayini, ABTS radikal süpürücü etki tayini) kullanılmak üzere buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir.



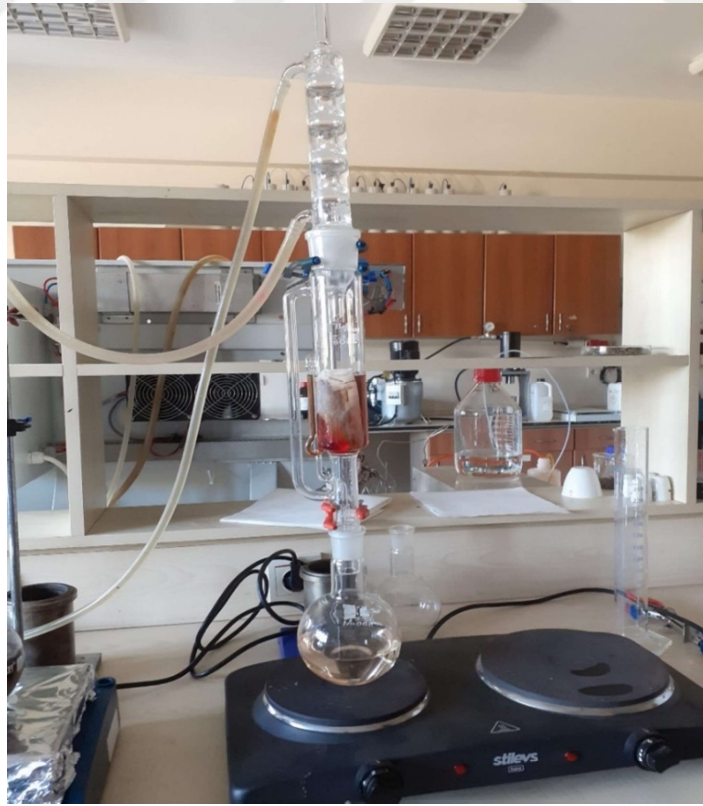
Şekil 3.9. Basınçlı sıcak su ekstraksiyon sistemi

3.4.2. Sokslet Ekstraksiyonu

Deneyde kullanılan ekstraksiyon düzeneği Şekil 3.10’da gösterilmiştir. Deney Vieito vd. (2019)’nin tanımladığı deney şartları kullanılmıştır. Kabuk örneklerinde Sokslet ekstraksiyonu etanol, etanol-su (1:1) ve su çözücü olarak kullanılarak ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır. Yöntem Sokslet ekstraksiyon parametreleri Tablo 3.1 de verilmiştir.

Tablo 3.1. Sokslet ekstraksiyonu parametreleri

Çözücü	Çözücü miktarı (mL)	Ekstraksiyon Süresi (sa)
Etanol	350	6
Etanol-Su (1:1)	350	6
Su	350	6



Şekil 3.10. Sokslet ekstraksiyon düzeneği

3.4.3. Solvent Ekstraksiyonu

Bu yöntemde solvent olarak Metanol: Su: HCl ve su kullanılmıştır. 5 gr öğütülmüş kabuk örneği toplam 150 mL Metanol: Su: HCl ; (80:19:1) karışımında ultrasonik su banyosunda (su sıcaklığı 20°C'nin altında) 30 dakika ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi (Karabulut vd., 2018). Solvent ekstraksiyonun gerçekleştirildiği sistem Şekil 3.11'de görülmektedir.



Şekil 3.11. Solvent ekstraksiyonun gerçekleştirildiği sistem

Elde edilen ekstraktlar 5000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi ve ekstraksiyon işlemi üç kez tekrar edildi. Elde edilen her üç süpernatant birleştirildi ve bu karışım (ekstraktlar) analiz edildi. Aynı ekstraksiyon adımları çözücü olarak su kullanılıp tekrar ekstraksiyon işlemi yapıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Fıstıkçamı kabuğu kullanarak biyoaktif bileşenlerin eldesine yönelik yapılan işlemlerde kullanılan hammaddenin karakterizasyonu ve ekstraksiyon şartlarının etkileri incelenmiştir. Çam kabuğunun karakterizasyonu Tablo 4.1’de verilmiştir.

4.1. Fıstık çamı kabuğunun karakterizasyon sonuçları

Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen değerler Ferreira-Santos vd.’nin çalışma değerleriyle benzerlik göstermektedir. Değerlerdeki bazı farklılıklar kullanılan çam kabuğunun yetiştiği yöreden kaynaklanan iklim koşullarının farklılığından, deneyin yapılma ortamından, deneyi yapan kişiden kaynaklanan faktörler olabilir.

Tablo 4.1. Fıstık çamı kabuğu kimyasal analiz sonuçları

	Ağırlıkça %
Sabit Karbon	27,87
Uçucu Madde	60,97
Nem	9,47
Kül	1,69
Selüloz	20,72
Hemiselüloz	38,59
Lignin	15,11
Ekstraktif Madde	25,58

4.2. Basınçlı Sıcak Su Sisteminde Biyoaktif Bileşenlerin Ekstraksiyonu

Sürekli akış sistemiyle basınçlı sıcak su ekstraksiyonu işlemleri Tablo 4.2’de oluşturulan deneysel şablona uygun olarak incelenmiştir. Tabloda belirtilen basınçlı sıcak su akış hızı, ekstraksiyon ünitesi sıcaklığı ve sıvı-katı oranı değerlerinde gerçekleştirilen deneylerden elde edilen ekstraktlar kullanılarak toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan madde analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. BSSE işleminde izlenen deneysel şablon ve elde edilen sonuçlar

Deney No	Sıcaklık °C	Akış hızı ml/dak	Sıvı/ katı oranı g/g	Toplam Fenolik mg GA/g KM	Flavonoid mg Qe/ g KM	ABTS mmol trol/g KM	DPPH mmol trol/gr
1	125	1,5	8	33,5 ±2,52	19,2±0,57	279±19,8	260±28,3
2	200	1,5	8	30,8±1,48	73,1±3,87	271±19,2	235±11,8
3	125	3,5	8	28,6±,33	54,3±2,14	286±33	263±17,5
4	200	3,5	8	34,5±1,4	72,9±1,66	271±12,1	280±7,9
5	125	1,5	16	50,7±1,66	112,5±3,89	438±6,8	409±19,7
6	200	1,5	16	45,4±1,88	84,5±0,65	439±9,84	318±7,83
7	125	3,5	16	48,6±1,74	69,4±3,01	536±86,9	437±18,4
8	200	3,5	16	50,4±2,1	69,8±1,71	491±25,16	372±19,2
9	99,43	2,5	12	42,5±0,85	64,4±4,73	382±29,4	336±20
10	225,6	2,5	12	47,5±3,46	88,5±3,69	440±71,1	349±5,58
11	162,5	0,82	12	33,8±3,2	81,2±3,89	307±14,6	296±8,2
12	162,5	4,18	12	48,0±1,96	82,3±1,58	386±30,5	334±13,4
13	162,5	2,5	5,27	24,5±,97	57,1±2,13	210±21,1	211±11,9
14	162,5	2,5	18,73	53,0±1,36	83,5±1,21	449±6,98	395±22,1
15	162,5	2,5	12	46,1±1,52	86,6±4,24	392±14,4	395±10,6
16	162,5	2,5	12	49,6±1,16	63,8±3,23	411±19,5	365±18,8
17	162,5	2,5	12	46,1±1,52	80,9±2,11	410±13,6	376±18,8
18	162,5	2,5	12	45,1±1,16	93,1±7,41	421±15,5	337±21,2
19	162,5	2,5	12	46,2±1,67	85,1±1,42	411,85	365±6,08

Deneysel sonuçlar Design Expert (State Ease, USA) yazılımı yardımıyla istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. MKD tasarımına göre belirlenen değişken aralıklarında yapılan deney sonuçlarının farklı matematiksel model ifadelerle uyumu incelenmiş, her bir sonuç değişkeni için ayrı ayrı matematiksel model denklemler elde edilmiştir.

4.2.1. Toplam Fenolik Madde İçeriğinin Optimizasyonu

Fenolik maddelerin biyolojik faaliyetleri antioksidan kapasite ve serbest radikal süpürücü etki ile ilişkili olarak bilinmektedir. Bu etki esasen fenolik maddelerin indirgeyici ajan olarak davranması sonucu redoks reaksiyonlarına neden olmasından kaynaklanmaktadır. Bu özellikleri dolayısıyla fenolik maddelere olan ilgi artmıştır. Ayrıca fenolik madde içeriği, yağların

oksidasyonunu stabilize etmesi ve bazı oksitleyici enzimlerin inhibe edilmesi gibi rolleri dolayısıyla dikkat çekmektedir (Chandra vd., 2014).

Deneyssel verilere uygulanan istatistiksel analiz sonucunda en uygun matematiksel model ifadenin kuadratik formdaki denklem olduğu program yardımıyla görülmüş ve istatistiksel değerler Tablo 4.3'te özetlenmiştir.

Tablo 4.3. Matematiksel model ifadelerinin istatistiksel analiz sonuçları

Model	Standart sapma	R ²	R ² _{adj}	R ² _{pred}	
Lineer	4,30	0,79	0,75	0,66	
2FI	4,47	0,82	0,73	0,44	
Kuadratik	<u>2,90</u>	<u>0,94</u>	<u>0,88</u>	<u>0,62</u>	Önerilmiş
Kubik	1,72	0,99	0,96	0,53	

Önerilen kuadratik formdaki denklemde önemsiz terimlerinin çıkarılarak indirgenmiş formunun ANOVA test sonuçları Tablo 4,4'de görülmektedir. Tabloda p-değeri 0,05'ten daha düşük değere sahip terimlerinin sonuç değişkenine etkisi önemli olarak kabul edilmektedir. P-değeri 0,1'den daha büyük değere sahip olan terimler önemsiz kabul edilmektedir. %95 güven aralığıyla yapılan varyans analiz sonuçlarına göre önemsiz terimlerden arındırılmış modelin istatistik değerleri Tablo 4,5'de verilmiştir. Regresyon katsayısı önerilen model denklemin % 94 gibi yüksek bir değere sahiptir. Ekstraksiyon işleminde seçilen bağımsız değişkenlerin (sıcaklık, akış hızı ve katı sıvı oranı) incelenen deneyssel aralıklar içerisinde yüksek bir oranda tanımlanabileceğini göstermektedir. Model ifadedeki etkisiz terimlerin katkısını içermeyen uyarlanmış regresyon katsayısı (R²_{adj}) model uyumunun açıklanması için daha uygun bir istatistiksel veri olarak kabul edilmektedir. Bu değerinde yüksek değerde olması modelin verilerle uyumunu göstermektedir.

ANOVA test sonuçlarına göre basınç altında sıcak suyun akış hızı ve katı sıvı oranının toplam fenolik madde içeriğine lineer etkilerinin önemli olduğu Tablo 4.4'den görülmektedir. Bu iki bağımsız değişkenin üstel terimlerinin de toplam fenolik madde içeriğine etkisinin önemli olduğu, bu değişkenlerde meydana gelecek küçük değişimlerin sonuç üzerinde önemli bir değişime neden olacağı da yine aynı tablodan görülmektedir. Ayrıca ekstraksiyon haznesinin sıcaklığıyla bu ortamdaki geçirilen suyun debisiyle olan etkileşiminin önemli olduğu tablodan görülmektedir. Akış hızındaki değişim sıcak haznedeki temas süresi ve ayrıca çözücünün karakterinde meydana gelen değişim ekstraksiyon işlemine etkisinin önemli olması beklenmektedir.

Tablo 4.4. Toplam fenolik madde içeriğinin ANOVA test sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	1233,75	154,22	19,86	< 0.0001	Önemli
Sıcaklık (T) , C	4,65	4,65	0,60	0,4570	
Akış hızı (q), ml/dak	47,04	47,04	6,06	0,0336	
Katı/sıvı oranı (R), g/g	981,76	981,76	126,43	< 0.0001	
T * q	30,89	30,89	3,98	0,0741	
T * R	5,31	5,31	0,68	0,4274	
T ²	7,51	7,51	0,97	0,3487	
q ²	65,75	65,75	8,47	0,0156	
R ²	120,90	120,90	15,57	0,0027	
Uyum iyiliği	65,54	10,92	3,61	0,1173	Önemli değil

Tablo 4.5. İndirgenmiş ikinci dereceden model denklemin istatistiksel verileri

Standart Sapma	2,79	R²	0,94
Ortalama	42,38	Adj R²	0,89
Varyans Katsayısı (C.V)	6,58	Pred R²	0,69
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	396,74	Adeq precision	15,03

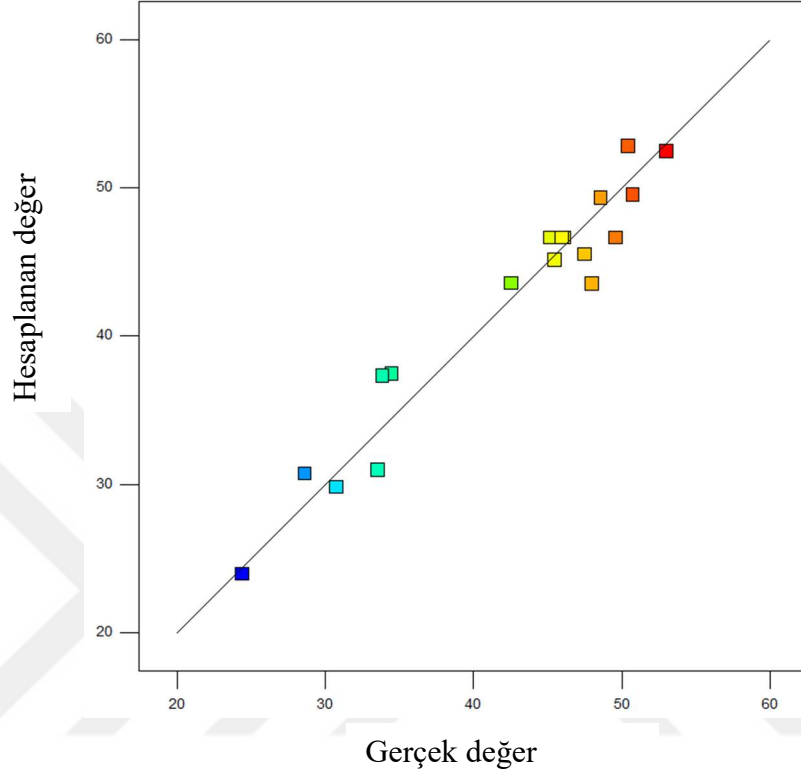
Design Expert yazılımı yardımıyla elde edilen modifiye edilmiş ikinci derece model ifade kodlu değerler cinsinden Eşitlik 4,1’de verilmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı (mg GA/g KM) =

$$\begin{aligned}
 & -29,71257 \\
 & + 0,121 \quad * T \\
 & + 4,31 \quad * q \\
 & + 7,47 \quad * W/W \\
 & + 0,052 \quad * T * q \\
 & - 5,4 * 10^{-3} \quad * T * W/W \\
 & - 5,3 * 10^{-4} \quad * T^2 \\
 & - 2,19 \quad * q^2 \\
 & - 0,186 \quad * (W/W)^2
 \end{aligned}$$

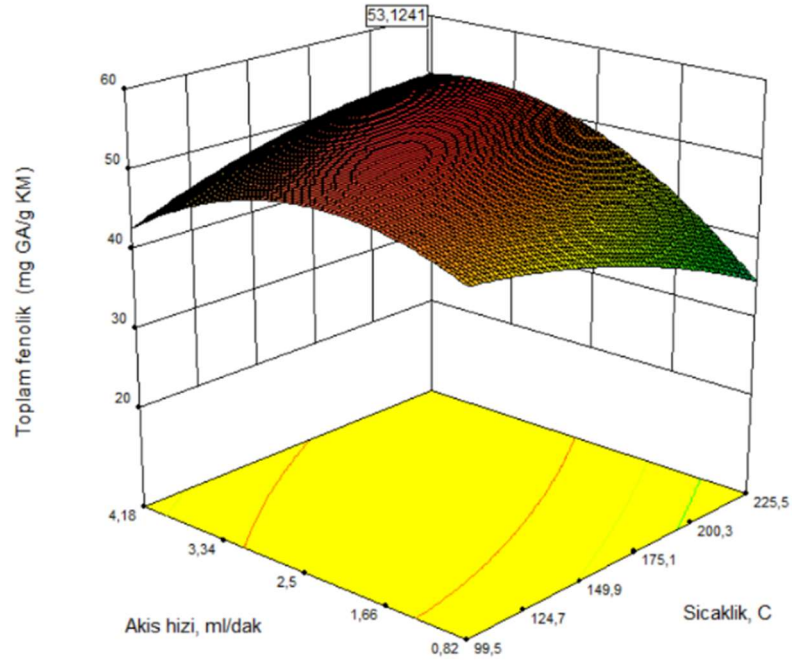
(E 4.1.)

Önerilen model ifadeden elde edilen teorik sonuçlara karşı deneysel sonuçların dağılımı Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi deneysel sonuçlar ile modelden elde edilen teorik değerlerin diagonal etrafında yoğunlaştığı görülmektedir. Önerilen matematiksel modelin deneysel verilerle uyumlu olduğu şekilden görülmektedir.



Şekil 4.1. Toplam fenolik madde içeriğine ait teorik olarak hesaplanan sonuçlara karşı deneysel sonuçların dağılımı

Toplam fenolik madde içeriğinin optimizasyonu için yapılan BSSE sisteminde incelenen bağımsız değişkenlerin sonuç değişkenine eş zamanlı etkileri üç boyutlu grafiklerle görülmektedir. Program yardımıyla elde edilen suyun akış hızı ile ekstraksiyon hücresinin sıcaklığındaki değişimlerin toplam fenolik maddeye birlikte etkisi Şekil 4.2’de verilmiştir. Üçüncü değişken olan katı/sıvı oranı maksimum toplam fenolik değerinin elde edildiği şartlarda tutularak elde edilen grafikte akış hızının az olduğu noktada (0,82 ml/dak) sıcaklığın artmasıyla ekstraktaki toplam fenolik madde miktarında azalma gözlenmektedir. Yüksek sıcaklık bölgesinde düşük akış hızı dolayısıyla uzun süre kalan ekstrakt içeriğinin bozulması muhtemeldir. Akış hızının arttığı noktalarda sıcaklık artışıyla fenolik madde miktarında artış yine grafikten gözlenmektedir. Akış hızının arttığı durumda kolon iç sıcaklığındaki azalma yanında basınçlı suyla katı maddelerin temas süresindeki düşüşün toplam fenolik madde miktarındaki değişime neden olması muhtemeldir. BSSE’de akış hızı ile ekstraksiyon kolon sıcaklığının değişimi sonucu düşük noktadan yüksek noktalara giden bir diagonal üzerinde maksimum fenolik madde elde edildiği, en yüksek fenolik madde miktarının her iki bağımsız değişkenin üst noktaları etrafında olduğu görülmektedir.

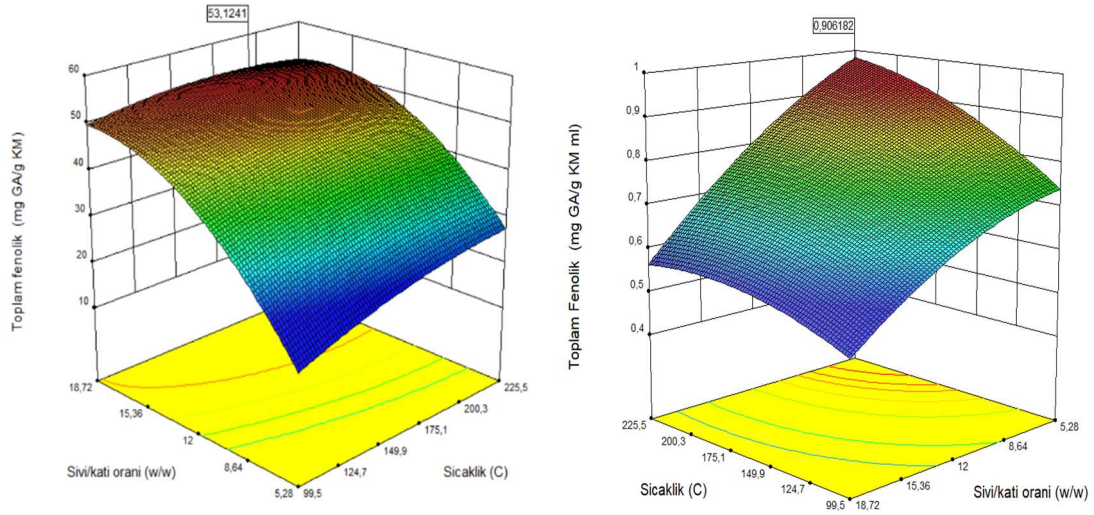


Şekil 4.2. Ekstraktaki toplam fenolik madde miktarına su akış hızı ile kolon sıcaklığının eş zamanlı etkisi

Çam fıstığı kabuğuyla temas ettirilen ve sürekli olarak beslenen basınçlı sıcak suyun miktarı değiştirilerek elde edilen farklı sıvı/katı oranı ile ekstraksiyon haznesinin sıcaklığı arasındaki etkileşim ve ekstraktaki toplam fenolik madde miktarındaki değişim Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.3a'da sonuç değişkeni olarak belirlenen toplam fenolik madde miktarı birim katı başına verilmiş, Şekil 4.3b'de ise birim hacim ve birim katı başına düzenlenmiştir. Elde edilen ekstraktaki fenolik içeriğin ve konsatrasyonun ayrı ayrı değişimi grafiklerden gözlemlenebilmektedir.

Sonuç değişkeni olarak seçilen ekstraktaki toplam fenolik madde birim katı başına elde edilen değer olarak tanımlandığından artan sıvı miktarıyla ekstrakte edilen madde miktarındaki artış beklenen bir durum olup grafikten gözlenmektedir.

Aynı grafikte, eş miktarda sıvıyla temas ettirilen fıstık kabuğundan elde edilen toplam fenolik madde içeriği, ekstraksiyon sıcaklığındaki artışla düşük sıvı/katı oranlarında artarken, yüksek sıvı/katı oranlarında önemli bir değişim olmamıştır. Ancak kullanılan suyun hacmide dikkate alındığında sonuç değişkeni için değişim farklı olmaktadır. Toplam fenolik madde konsatrasyonunun maksimum olduğu şartlar olarak düşük sıvı miktarı ve çözücü polaritesinin azaldığı yüksek ekstraksiyon sıcaklık değerleri olduğu Şekil 4.3b'den görülmektedir.



Şekil 4.3. Ekstraktaki toplam fenolik madde miktarına sıvı/katı oranı ile kolon sıcaklığının eş zamanlı etkisi
(a= mgGA/g KM, b= mg GA/g KM. ml)

4.2.2. Toplam Flavonoid Madde İçeriğinin Optimizasyonu

Flavonoidler hemen hemen tüm bitkilerde bulunan, bitkilerin canlı renklerinden sorumlu 6000’den fazla türü olan en büyük bitkisel besin maddeleridir. En fazla bilinen flavonoidler kuersetin ve kaempferol olup çoğu türü antioksidan işlevi görmektedir. Fıstık çamı kabuğunda BSSE ile flavonoidlerin maksimum elde edilmesi ve ekstraksiyon şartlarının ekstraktaki miktarına etkisi Tablo 4.2’de verilen deneysel şablon yardımıyla incelenmiştir. Belirtilen deney şartlarında yapılan ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen deneysel sonuçları da aynı tabloda verilmiştir. Deneysel verilerin Desing Expert yazılımı yardımıyla istatistiksel analizi sonucunda kuadratik model denklemi önerilmiştir. Önerilen modelin ANOVA test sonuçları Tablo 4.6’de görülmektedir.

Model terimlerinden yüksek p -değerine sahip önemsiz ifadelerin çıkarıldığı indirgenmiş formun ANOVA test sonuçlarına göre indirgenmiş ikinci derece model denklem istatistiksel açıdan önemlidir. Sonuç değişkeni olarak birim katı başına elde edilen flavonoid madde içeriğinin alındığı model denklemin en önemli bağımsız değişken olarak sıvı/katı oranı görülmektedir. Ekstraksiyon haznesinden geçen su miktarıyla belirlenen sıvı/katı oranı değişkeni ile hem ekstraksiyon sıcaklığı hem de suyun akış debisi değişkenlerinin etkileşimi sonuç üzerine önemlidir. Sıvı katı oranının üssel etkisi flavonoid miktarında önemli etkiye sahiptir. Ayrıca p -değeri $<0,1$ olan ekstraksiyon ünitesinin sıcaklığının lineer etkisi sonuç üzerinde önemli bir değişkendir. İndirgenmiş formdaki ikinci derece denklemin istatistiksel verileri Tablo 4.7’de verilmiştir. Yüksek regresyon katsayısı ve uyarlanmış regresyon katsayısı modelin tanımlayıcılığının yeterli olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.6. Flavonoid içeriğinin ANOVA test sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	5259,84	751,41	6,15	0,0041	Önemli
Sıcaklık (T) , C	534,00	534,00	4,37	0,0605	
Akış hızı (q), ml/dak	32,60	32,60	0,27	0,6156	
Sıvı/katı oranı (R), g/g	1902,05	1902,05	15,57	0,0023	
T *R	1250,00	1250,00	10,24	0,0085	
q * R	1074,62	1074,62	8,80	0,0128	
T²	130,70	130,70	1,07	0,3231	
q²	385,72	385,72	3,16	0,1032	
R²	5259,84	751,41	6,15	0,0041	
Uyum iyiliği	857,24	122,46	1,01	0,5296	Önemli değil

İstatistiksel olarak deneysel verilerle uyumlu olduğu önerilen indirgenmiş ikinci derece model denklem gerçek değişkenler cinsinden Eşitlik 4.2’de verilmiştir. Değişkenlerin sayısal değerine de bağlı olmakla birlikte, matematiksel model ifadede bulunan terim katsayıların rakamsal büyüklükleri ve işaretleri sonuç değişkeni olarak incelenen flavonoid miktarına etkisiyle ilişkilidir.

Tablo 4.7. İndirgenmiş ikinci dereceden model denklemin istatistiksel verileri

Standart Sapma	2,79	R²	0,94
Ortalama	42,38	Adj R²	0,89
Varyans Katsayısı (C.V)	6,58	Pred R²	0,69
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	396,74	Adeq precision	15,03

$$\begin{aligned}
 \text{Flavonoid miktarı (mg Qe/g KM)} = & -331,99 \\
 & +1,874 * T \\
 & +33,22 * q \\
 & +31,62 * W/W \\
 & -0,083 * T * q \\
 & -2,89 * T * R \\
 & -2,17*10^{-3} * T^2 \\
 & -0,33 * (W/W)^2
 \end{aligned}
 \quad (E4.2.)$$

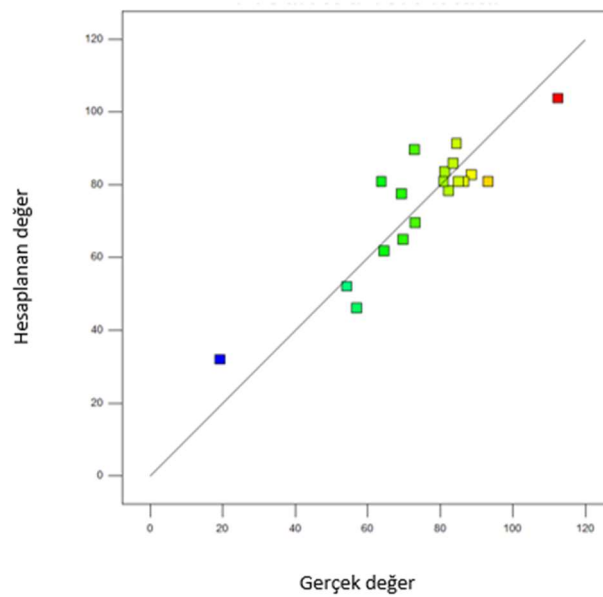
Deneysel şablona uygun şekilde yapılan çalışma sonucunda elde edilen flavonoid miktarı ile matematiksel olarak elde edilen model ifadenin teorik sonuçlarının uyumu grafiksel olarak Şekil

4.4’de verilmiştir. Diagonal etrafına bulunan verilerin çokluğu deneysel veriler ile model sonuçlarının birbiriyle kısmen uyumlu olduğunu göstermektedir.

BSSE yöntemiyle fıstık çam kabuğundaki flavonoidlerin ekstrakta geçen miktarlarının incelenen bağımsız değişkenlerle etkisi üç boyutlu grafiklerle verilmiştir. Şekil 4.5’de ekstraksiyon hazne sıcaklığı ve haznedeki katıyla temas ettirilen basınçlı sıcak su miktarındaki değişimle ayarlanan sıvı/katı oranının flavonoid miktarına etkisi görülmektedir. Sonuç değişkeni olarak kümülatif miktar alınmıştır. Düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde sabit miktardaki katı maddeyle temas eden sıvı miktarındaki artışla flavonoid miktarı lineer olarak artmaktadır. Ekstraksiyon hücresinin sıcaklığının yüksek değerlerinde flavonoid miktarındaki artışın sınırlı olup yüksek sıvı/katı oranının üst değerlerinde ise sabit kalmaktadır.

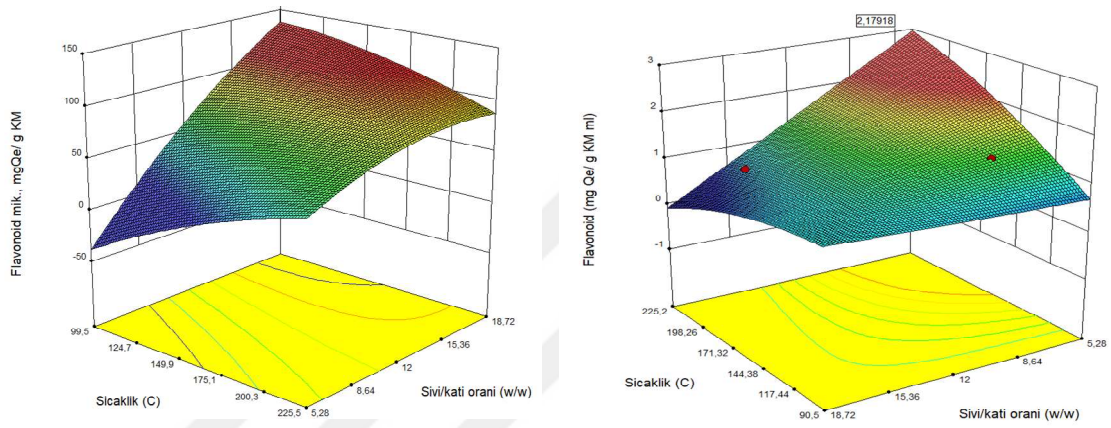
Düşük sıvı/katı oranında artan ekstraksiyon sıcaklığıyla ekstraksiyon içeriğindeki madde miktarı artış gözlenirken yüksek sıvı/katı oranında ise azalma gözlenmektedir. Bu durum sıcaklığın ekstraksiyon işlemindeki kolaylaştırma yanında biyoaktif bileşenlerin yapısal kararlılığının değişmesinden kaynaklı olması muhtemeldir. Şekil 4.5.b’de sonuç değişkeni olarak birim hacimde dikkate alınmıştır.

Düşük ekstraksiyon hazne sıcaklığı ve yüksek sıvı/katı oranı değerlerinde yapılan tüm deneylerde flavonoid konsantrasyon değerlerinde önemli bir değişim gözlenmemektedir. Ancak sıcaklığın artışıyla ve yüksek sıcaklıkta çözücü kullanıldığı şartlarda ekstraktaki flavonoid değerlerinde artış görülmektedir. Toplam flavonoid miktarının optimizasyonu ile flavonoid maddenin konsantrasyonunun optimizasyonu için şartların değiştiği grafiklerden görülmektedir.

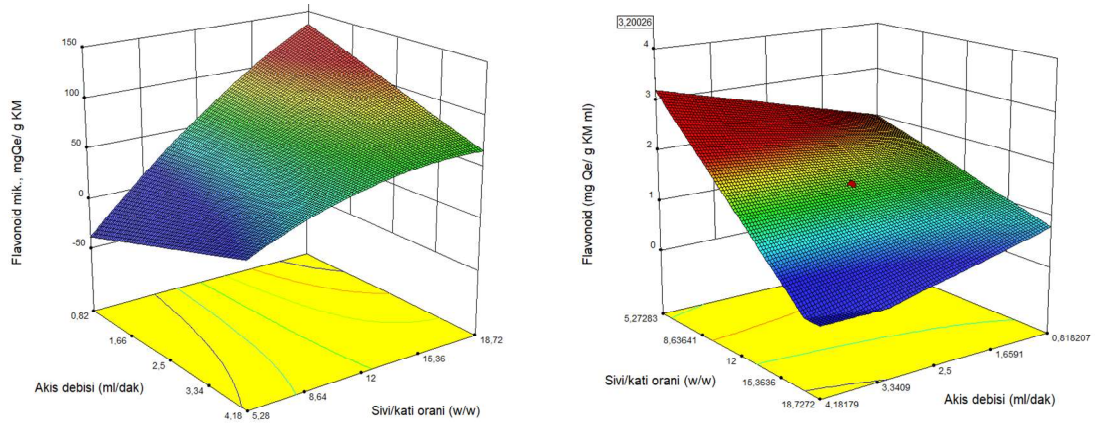


Şekil 4.4. Flavonoid miktarı için deneysel veriler ile teorik sonuçların değişimi

Basınç altında sıcak su ile temas süresi yanında kolon içerisindeki etkileşimler için önemli olan akış hızı ile bu şartlar altında katı ile temas eden su miktarının flavonoid ekstraksiyonuna eş zamanlı etkisi Şekil 4.6’da verilmiştir. Düşük sıvı/katı oranı değerlerinde artan debi ile kümülatif flavonoid miktarında artış gözlenmekle birlikte yüksek katı/sıvı oranında artan sıcak suyun debisiyle azalma gözlenmiştir. En fazla flavonoid miktarı su miktarının en yüksek olduğu ve düşük akış hızı şartlarında elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Ekstraktaki flavonoid madde miktarına sıvı /katı oranı ile kolon sıcaklığının eş zamanlı etkisi (a= mgQe/g KM, b= mg Qe/g KM. ml)



Şekil 4.6. Ekstraktaki flavonoid madde miktarına sıvı /katı oranı ile akış debisinin eş zamanlı etkisi (a= mgQe/g KM, b= mg Qe/g KM. ml)

4.2.3. Antioksidan Etkinin Optimizasyonu

Antioksidan madde, oksidasyonu kolay gerçekleşen maddelerin oksidasyonunu yavaşlatan veya durduran maddeler olarak tanımlanmaktadır. Sentetik antioksidan maddeler yerine alternatif doğal antioksidan maddelerin araştırılması giderek ilgi çeken konuların başında gelmektedir. Doğal kaynaklardan elde edilen antioksidan maddeler genellikle materyal içerisinde düşük miktarlarda mevcuttur. Bu bileşenlerin etkin bir şekilde elde edilmesi ve aktivitelerinin ölçülmesi için değişik yöntemler önerilmektedir. Yapılan tez çalışmasında antioksidan kapasitesinin ölçülmesi amacıyla DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılmıştır. Her iki yöntemde spektrofotometrik olarak ölçülen ve elektron transferine dayalı yöntemlerdir. En yaygın kullanılan antioksidan madde analiz yöntemleri arasında olan bu iki analiz sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir. Elde edilen deneysel sonuçların istatistiksel analizleri yapılmış ve önerilen quadratik model denklemlerin verileri Tablo 4.8’de verilmiştir. Regresyon katsayısı ve uyarlanmış regresyon katsayısı değerleri önerilen modelin indirgenmiş halinin yeterli tanımlayıcılığa sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 4.8. İndirgenmiş ikinci dereceden model denklemin istatistiksel verileri

	ABTS	DPPH		ABTS	DPPH
Standart Sapma	25,35	20,61	R²	0,95	0,94
Ortalama	380,51	333,3	Adj R²	0,91	0,89
Varyans Katsayısı (C.V)	6,66	6,18	Pred R²	0,77	0,75
Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (Press)	30869	16957	Adeq precision	18,35	14,64

Design Expert yazılımı yardımıyla elde edilen modifiye edilmiş ikinci derece model ifadenin ANOVA test sonuçları Tablo 4.9’da verilmiştir. Tablo 4.9’de verilen istatistiksel verilerden p-değeri 0,05’ten küçük olan terimler önemli etkiye sahiptir.

Bunlar arasında ekstraksiyon hızında alıkonma süresini etkileyen basınçlı sıcak su akış hızı ve etkin bileşenlerin alındığı katı madde ile çözücü olarak kullanılan sıvı miktarının oranı hem lineer hem de üstel terimleri açısından takip edilen her iki antioksidan ölçüm yöntemiyle de önemli olarak belirlenmiştir. Bu durum toplam fenolik madde miktarı içinde benzer değişim gözlenmektedir. Ekstraksiyon ünitesinin sıcaklığıyla sıvı/katı oranı arasındaki etkileşim DPPH sonuçlarına göre daha önemli olarak istatistiksel olarak görülmüş ABTS ölçümlerindeki sonuçlarda benzerdir. Uyum iyiliği değerinde DPPH için önerilen modelin daha iyi bir tanımlayıcılığa sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 4.9. Antioksidan kapasite içeriği için önerilen modellerin ANOVA test sonuçları

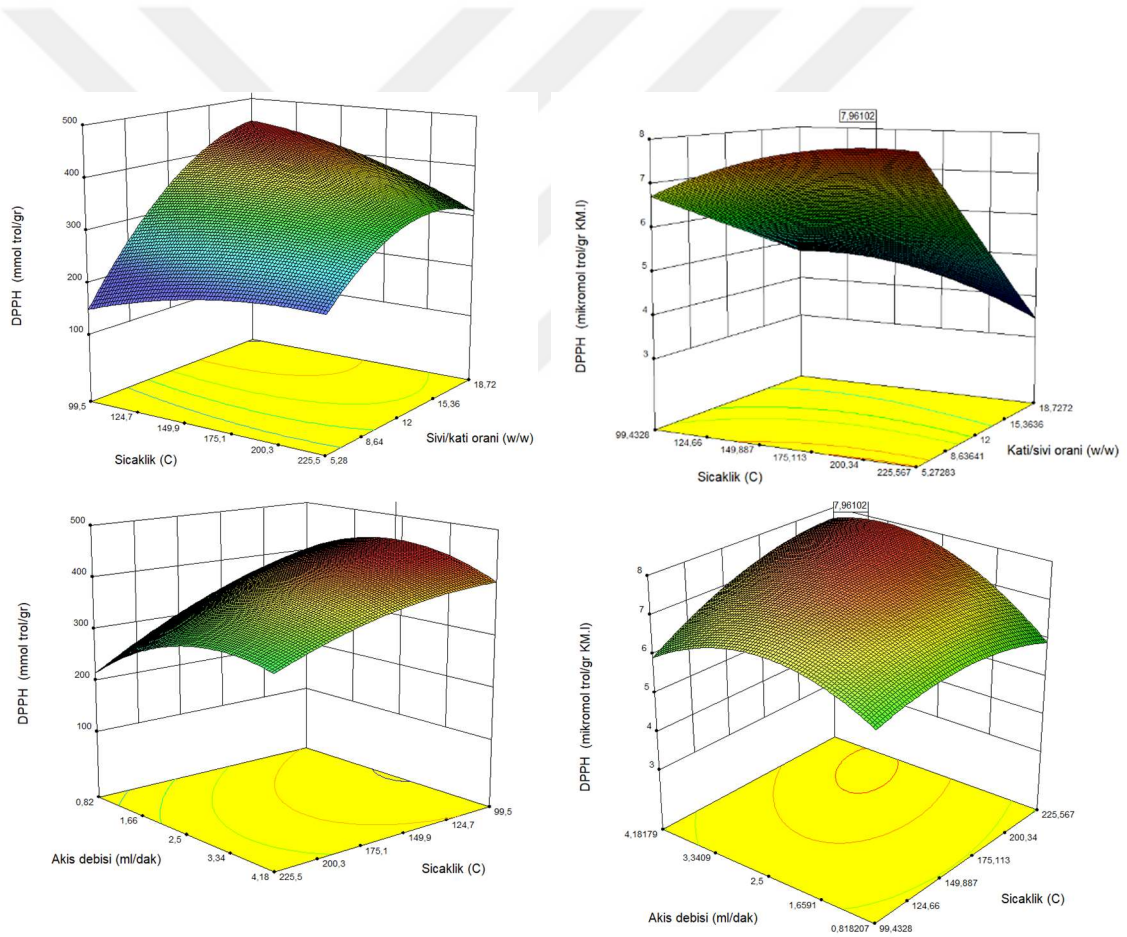
	ABTS		DPPH	
Kaynak	F-değeri	p-değeri	F-değeri	p-değeri
Model	28,13	< 0.0001	19,08	< 0.0001
Sıcaklık (T) , C	0,11	0,7483	3,48	0,0916
Akış hızı (q), ml/dak	9,59	0,0102	6,48	0,0291
Sıvı/katı oranı (R), g/g	163,84	< 0.0001	112,37	< 0.0001
T*q	0,088	0,7722	1,36	0,2705
T *R	3,96	0,0720	6,44	0,0294
T ²	-	-	2,02	0,1860
q ²	7,95	0,0167	10,00	0,0101
R ²	13,73	0,0035	15,39	0,0029
Uyum iyiliği	8,57	0,0277	0,93	0,5538

Antioksidan kapasitenin farklı ölçümlerine göre elde edilen gerçek değişkenler cinsinden önerilen matematiksel model denklem Eşitlik 4.3 ve Eşitlik 4.4 ‘de verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{ABTS (mg Trol/g KM)} &= \\ &-160,7 \\ &+0,273 * T \\ &+63,4 * q \\ &+51,4 * R \\ &-0,0178 * T * R \\ &+4,46 * q * R \\ &-19,14 * q^2 \\ &-1,57 * R^2 \end{aligned} \quad (E4.3)$$

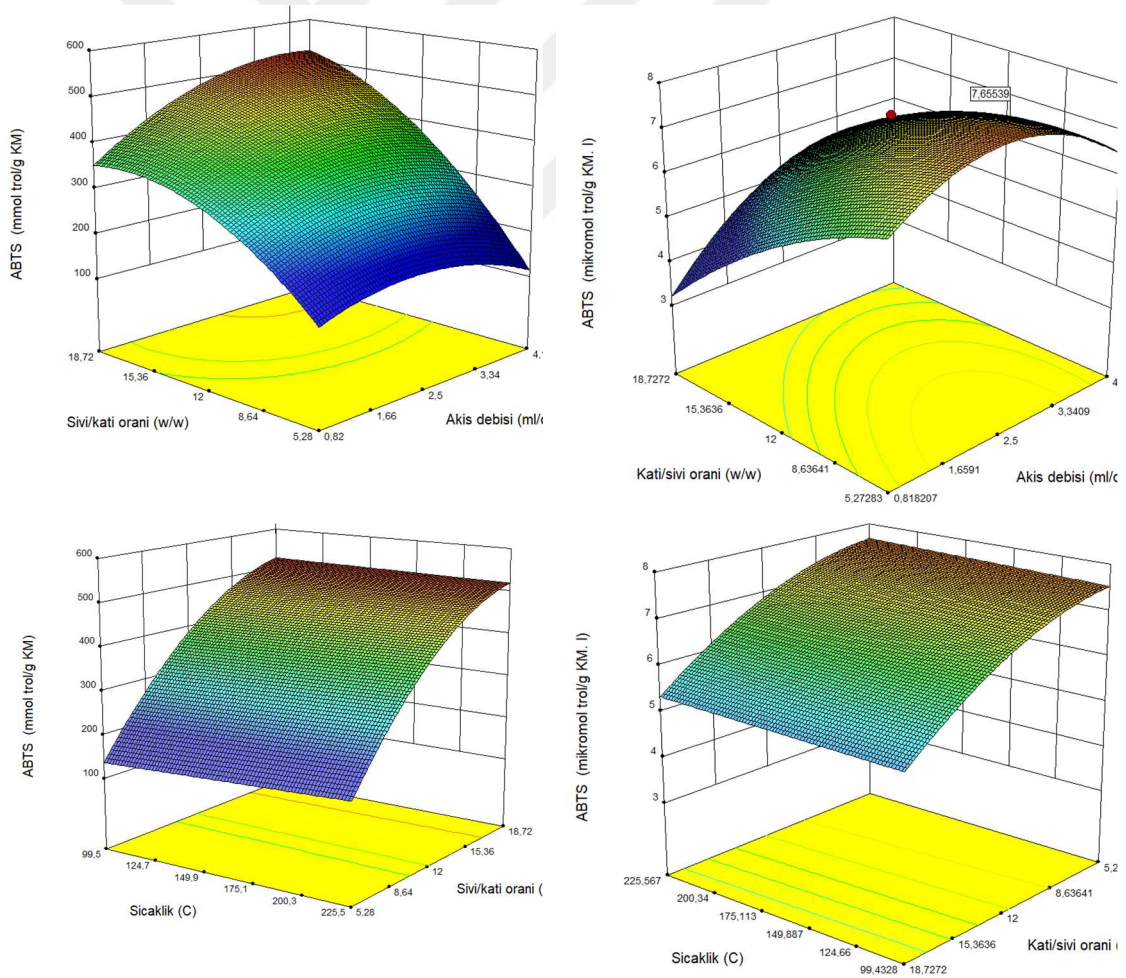
$$\begin{aligned} \text{DPPH (mg Tro/g KM)} &= \\ &-404,82 \\ &+2,47 * T \\ &+65,59 * q \\ &+67,65 * R \\ &+0,23 * T * q \\ &-0,12 * T * R \\ &-0,0005 * T^2 \\ &-17,65 * q^2 \\ &-1,37 * R^2 \end{aligned} \quad (E4.4)$$

Bağımsız değişkenlerin antioksidan kapasiteye eş zamanlı etkileri üç boyutlu grafiklerle gösterilmiştir. Şekil 4.7’de antioksidan kapasite tayini DPPH yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuç değişkeni olarak birim katı madde başına troloks eşdeğerinin ve birim katı madde başına birim hacimde troloks eşdeğerinin antioksidan kapasite olarak belirlendiği model ifadenin istatistiksel analizi sonucunda, önemli değişkenlerin üç boyutlu grafiği Şekil 4.7’de verilmiştir. Şekil 4.7’de sağdaki grafikler birim katı başına elde edilen antioksidan kapasiteyi sol tarafta verilen grafikler ise birim hacim ve birim katı başına antioksidan kapasitenin değişimini göstermektedir. Ekstraksiyon sıcaklığındaki değişimle antioksidan kapasitedeki değişim iki sonuç değişkeni içinde benzer bir değişim göstermektedir.



Şekil 4.7. Bağımsız değişkenlerin DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasite üzerine eş zamanlı etkisi

Düşük sıvı katı oranlarında ekstraksiyon ünitesinin artan sıcaklığıyla antioksidan kapasite artarken yüksek sıvı katı oranlarında yapılan deneylerde elde edilen antioksidan kapasitede azalma gözlenmektedir. Ekstraksiyon kolonundan geçen basınçlı sıcak su miktarındaki artış merkez noktaya kadar (2,5 ml/dak) antioksidan kapasitede net bir artma gözlenirken daha yüksek akış hızlarında azalma gözlenmiştir. Bu değişim hem kümülatif hemde konsantrasyon cinsinden takip edilen sonuç değişkeni için görülmektedir. Grafiklerde gösterilmeyen diğer değişken optimum noktada tutulmuştur. Şekil 4.7'ye göre birim katı madde başına en yüksek antioksidan kapasite düşük sıcaklık, yüksek sıvı katı oranı ve merkez akış hızında elde edilmektedir. Ancak sonuç değişkeni olarak konsantrasyon alındığı durumda (sağda verilen grafikler) yüksek sıcaklık, düşük sıvı katı oranı ve kısmen yüksek akış hızı (+1) değerinde elde dillecektir. Antioksidan kapasitenin ABTS yöntemiyle belirlendiği sonuçlara göre elde edilen üç boyutlu grafikler Şekil 4.8'de verilmiştir. DPPH analizlerinden farklı olarak ekstraksiyon sıcaklığındaki değişim antioksidan kapasiteyi önemli oranda etkilemediği görülmektedir.



Şekil 4.8. Bağımsız değişkenlerin ABTS yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasite üzerine eş zamanlı etkisi

4.2.4. Optimum şartlarda yapılan deneylerde biyoaktif bileşenlerin değişimi

Deneyssel tasarıma uygun şekilde elde edilen verilerin istatistiksel testleri gerçekleştirilmiştir. Program tarafından önerilen matematiksel model ifadelerin indirgenmiş formlarının istatistiksel olarak yeterli uyumla değişimleri temsil edeceği görülmüştür. Model ifadelerin sayısal olarak çözümlenmesi sonucunda takip edilen her bir sonuç değişkeni için en uygun deney şartları belirlenmiştir. Elde edilen matematiksel model ifadelerin çözümü ve bu şartlarda elde edilen deneyssel değerler Tablo 4.10’da verilmiştir. Tabloda genel olarak flavonoid madde miktarı dışında takip edilen diğer biyoaktif bileşenlerin deneyssel sonuçları ile modelden beklenen değerler arasında iyi bir uyum olduğu görülmektedir. Ayrıca sonuç değişkeni olarak kümülatif miktar veya bileşenlerin konsantrasyonunun seçilmesi durumunda optimum şartların değiştiği de tablodan gözlenmektedir.

Tablo 4.10. Model ifadelerden elde edilen optimum şartlardaki teorik ve deneyssel sonuçlar

		Ekst. sic. °C	Akış hızı, ml/dk	Sıvı/katı oranı W/W	Top.Fenolik madde		Flavonoid madde		ABTS		DPPH	
					Mod.	Den.	Mod.	Den.	Mod.	Den.	Mod.	Den.
Birim gram katı madde başına biyoaktif bulunan ekstrakta	Top.Fenolik madde	182	3,15	17,4	53,1	52,6	69,62	95,4	506	513	391	410,7
	Flavonoid madde	99,5	0,82	18,7	47,9	48,7	137,3	124,3	352,5	612,7	402,6	391,4
	ABTS	99	3,83	18,7	45,8	44,5	73,78	120,5	526,8	542,3	420,6	465,5
	DPPH	99,5	2,5	18,7	51,7	51,3	102	126,1	492	551,3	452	472,1
Birim katı birim hacim başına ekstrakta biyoaktif maddeye göre bulunan	Top.Fenolik madde	200	3,4	8	0,9	0,89	2,16	2,06	7,25	8,86	7,13	8,0
	Flavonoid madde	200	3,5	8	0,9	0,84	2,18	1,37	7,19	8,59	7,12	7,27
	ABTS	200	2,6	8	0,88	0,83	1,99	3,07	7,47	8,78	7,07	8,03
	DPPH	186	3,1	8	0,89	0,91	1,96	3,77	7,4	9,31	7,17	9,21

Biyoaktif bileşenlerin toplam miktarının sonuç değişkeni alındığı model ifadenin çözümüyle ekstraksiyon sıcaklığının düşük, sıvı/katı oranın yüksek olduğu noktalara yakın değerlerde optimum sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, konsantrasyonun maksimize edilmeye çalışıldığı şartlar da ise çözücü polaritesinin azaldığı üst sıcaklık noktaları ve su miktarının minimum olduğu alt sıvı/katı oranında optimum değerler gözlenmektedir. Belirlenen optimum ekstraksiyon şartlarında akış hızındaki, ekstraksiyon sıcaklığındaki değişim katı-sıvı arasındaki birçok olayı etkilemekte olup sonuç değişkenine optimum değerlerde göre farklılıklar göstermiştir.

Farklı kaynakların belirlediği optimum şartlarda yapılan geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden ve tez çalışmasından elde edilen optimum şartlarda elde edilen sonuçlar Tablo 4.11’de verilmiştir.

Tablo 4.11. Geleneksel yöntemlerle yapılan ekstraksiyon işleminden elde edilen sonuçlar

Ekstraksiyon yöntemi	Top.Fenolik madde		Flavonoid madde		ABTS		DPPH	
	(mg GA / 1 g KM)	(mgGA/ 1gKM* L)	(mg Qe / 1 g KM)	(mg Qe / 1 g KM*L)	(μmol trolox/ 1g KM)	(μmol trolox/ 1gKM*L)	(μmol trolox/ 1g KM)	(μmol trolox/ 1gKM*L)
Sokslet Eks. (Etanol)	103 ± 6	296 ± 16	241 ± 2	687 ± 4	959 ± 45	2742 ± 130	1033 ± 152	2952 ± 152
Sokslet Eks. (Etanol+ Su)	106 ± 1	304 ± 3	243 ± 10	672 ± 28	1143 ± 42	3267 ± 121	1083 ± 110	3096 ± 316
Sokslet Eks. (Su)	71 ± 3	205 ± 8	151 ± 12	424 ± 34	808 ± 44	2310 ± 126	634 ± 17	1811 ± 47
Maserasyon (su)	28 ± 0,5	558 ± 2	56 ± 11	1264 ± 30	459 ± 35	9186 ± 710	298 ± 27	5966 ± 543
Basınçlı Sıcak su Eks. (Mevcut çalışma)	52,6 ± 4	584 ± 8	124 ± 6	1381 ± 11	542 ± 42	6029 ± 439	472 ± 22	5244 ± 244

Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen sonuçlar ile farklı ekstraksiyon yöntemlerine göre çoğunlukla rekabet edecek sonuçlar elde edilmiştir. Organik çözücü ve sert asidik kimyasalların kullanılmadığı durumda yüksek değerlere basınçlı sıcak su sisteminde ulaşılmıştır. Yüksek çözücü kullanılan durumlarda kümülatif miktar kısmen yüksektir. Ancak hem konsantrasyon hemde katı materyalden alınan yüksek içerik basınçlı sıcak su sisteminin uygun bir ekstraksiyon metodu olarak dikkat çekmektedir.

DPPH yöntemi, kolay, hızlı, hassas, tekrarlanabilir ve UV-Vis spektrofotometre dışında herhangi bir ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir. Ayrıca, analizde kullanılan radikal çözeltisinin önceden oluşturulması gerekmemekte, radikal ticari olarak hazır şekilde temin edilebilmektedir.

Bu nedenlerle, DPPH yöntemi birçok araştırma laboratuvarında, çeşitli bileşiklerin ve gıda örneklerinin antioksidan kapasitesini belirlemek üzere yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu avantajlarına karşın, çalışılan dalga boyu (515-517 nm) bu yöntemin en büyük dezavantajıdır. Çünkü bu dalga boyunda özellikle karotenoidler gibi bazı bileşenler analizi interfere etmektedir. Dolayısıyla spektrofotometrede elde edilen değer, analizi interfere eden 23 bu bileşenlerden kaynaklanabilmektedir. Bu tip ekstraktlarda DPPH yöntemi ile elde edilen sonuçlarla diğer bir antioksidan yöntemi ile elde edilen sonuçlar arasında zayıf bir korelasyon olmaktadır (Prior vd., 2005; Sanchez-Moreno, 2002). Ionita (2005), DPPH serbest kararlı radikalinin aktif oksijen türleri için iyi bir savor olmadığını bildirmiştir.

5. SONUÇLAR

Fıstık çamı kabuğunun BSSE ile biyoaktif maddelerin elde edilmesini amaçlamaktadır. Deneysel tasarım yöntemiyle tanımlanan deneylerden elde edilen veriler toplam fenolik, flavanoid ve antioksidan kapasite için incelenmiştir. Her bir sonuç değişkeni için matematiksel model ifadeler, incelenen bağımsız değişkenlerin etkileri ve optimum sonuç veren noktalar ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

1. Toplam fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunu tanımlayan matematiksel model ifadenin kuadratik formulla tanımlanacağı görülmüştür. Beklendiği üzere katı miktarındaki artış ile toplam fenolik madde miktarı artmaktadır. Akış hızının ve sıcaklığın arttığı noktalarda fenolik madde miktarındaki artış gözlenmektedir. Akış hızındaki değişim ekstraksiyon haznesiyle olan temas süresini etkilediğinden dolayı, akış hızındaki değişim elde edilen toplam fenolik maddeyi etkilemektedir. Sıcaklığın yüksek akış hızının az olduğu noktada fenolik madde miktarı azalmaktadır. Bunun sebebi yüksek sıcaklığa fazla süre maruz kalan ekstrakte edilecek maddenin içeriğinin bozulmasından olabilir.
2. Toplam flavonoid bileşenlerin ekstraksiyonundada abenzer şekilde kuadratik formun en uygun model ifade olduğu görülmüştür. Fenolik bileşiklerde olduğu gibi flavonoid madde için de ekstrakte edilecek katı madde miktarı arttıkça elde edilen flavonoid miktarı da artmaktadır. Sıcaklık ve akış hızının arttığı durumda flavonoid madde miktarı artmaktadır. Maksimum flavonoid miktarı düşük sıcaklık ve düşük akış hızında elde edilmiştir.
3. Antioksidan etkiye sahip bileşenler DPPH ve ABTS yöntemiyle takip edilmiştir. Fenolik bileşen ve flavonoid madde de olduğu gibi kuadratik formun en uygun model ifade olduğu görülmüştür. ABTS yöntemiyle en yüksek antioksidan kapasite düşük sıcaklık ve yüksek sıvı katı oranında elde edilmiştir. Benzer şekilde DPPH yönteminde de en yüksek antioksidan kapasite düşük sıcaklık ve yüksek sıvı katı oranında elde edilmiştir.
4. BSSE sistemiyle elde edilen biyoaktif bileşenlerin eldesinin optimum değerlerinin birbirinden farklı olduğu görülmüştür.
5. Model ifadelerden elde edilen optimum şartlardaki teorik ve deneysel sonuçların birbiriyle uyumunun yeterli olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir.
6. Geleneksel yöntemlerle yapılan ekstraksiyon işlemleriyle elde edilen biyoaktif bileşenleri basınçlı sıcak su ekstraksiyonu yöntemiyle elde edilen biyoaktif bileşenlerle karşılaştırmak gerekirse; toplam fenolik madde eldesinde gram kuru madde başına en yüksek sokslet ekstraksiyonu yöntemiyle su ve etanolün birlikte kullanıldığı çalışmada elde edilmiştir. Toplam fenolik madde için birim hacim başına en yüksek değer basınçlı sıcak su ekstraksiyon sistemiyle elde edilmiştir. Fenolik madde de olduğu gibi birim katı

başına en yüksek toplam flavonoid madde eldesi sokslet ekstraksiyonu yöntemiyle su ve etanolün birlikte kullanıldığı çalışmada elde edilmiş olup, birim hacim başına en yüksek değer basınçlı sıcak su ekstraksiyon sistemiyle elde edilmiştir. ABTS ve DPPH yönteminde birim katı başına en yüksek değer sokslet ekstraksiyonu yöntemiyle su ve etanolün birlikte kullanıldığı çalışmada elde edilmiş olup, birim hacim başına en yüksek değer ise maserasyon yöntemiyle elde edilmiştir.



KAYNAKLAR

- Abubakar, A. R., and Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 12(1), 1.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., and Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 42.; DOI: <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Angela, M., and Meireles, A. (2009). Extracting Bioactive Compounds For Food Products: Theory and Applications. *CRC Press Taylor & Francis Group*, London, New York
- Aspé, E., and Fernández, K. (2011). The effect of different extraction techniques on extraction yield, total phenolic, and anti-radical capacity of extracts from *Pinus radiata* Bark. *Industrial crops and products*, 34(1), 838-844.
- Atılğan, B. (2018). Kızılçam (*Pinus Brutia*) Kabuk Taneni Eldesinde Ekstraksiyon Yöntemlerinin Verim ve Kimyasal Bileşim Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Bursa Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Ayaria, M., and Romdhanea, M. (2020). Chemical constituents of the pine extracts and their activities: A review. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 6(3), 37-56.
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.
- Başer, K. H. C. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkisel ürünlerin üretimi ve kalite kontrolü. *Anadolu Üniversitesi Yayın*, (2109).
- Braga, M. E., Santos, R. M., Seabra, I. J., Facanali, R., Marques, M. O., and de Sousa, H. C. (2008). Fractioned SFE of antioxidants from maritime pine bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(1), 37-48.
- Brunner, G. (2014). *Hydrothermal and Supercritical Water Processes*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, Cilt 32(2), 209-242.
- Cavuldak, Ö. A., Vural, N., & Anlı, R. E. (2016). Bitki Kaynaklı Fenolik Bileşiklerin Ultrasonik Dalga Destekli Ekstraksiyonu. *Gıda*, 41(1), 53-61; doi: 10.15237/gida.GD15059.
- Cemeroğlu, B.S. (2013). Meyve Sebze İşleme Teknolojisi, 1. Cilt, Seçkin Yayıncılık, 5. Baskı.
- Chae, E., and Choi, S. S. (2019). Extraction methods of organic components from rubber composites and analysis of the extract using gas chromatography/mass spectrometry. *Elastomers and composites*, 54(3), 188-200.
- Chandler, R. F., Freeman, L., and Hooper, S. N. (1979). Herbal remedies of the Maritime Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 1(1), 49-68.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., ElSohly, M. A., and Khan, I. A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: A comparative study. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2014.
- Cheng, Y., Xue, F., Yu, S., Du, S., and Yang, Y. (2021). Subcritical water extraction of natural products. *Molecules*, 26(13), 4004; <https://doi.org/10.3390/molecules26134004>
- Chupin, L., Maunu, S. L., Reynaud, S., Pizzi, A., Charrier, B., and Bouhtoury, F. C. E. (2015). Microwave assisted extraction of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark: Impact of particle size and characterization. *Industrial Crops and Products*, 65, 142-149.
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., and Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food chemistry*, 194, 135-142.
- Demir, T., and Akpınar, Ö. (2020). -Food Science and Technology. *Turkish Journal of Agriculture*, 8(8): 1734-1746.

De Castro, M. L., and Priego-Capote, F. (2010). Sokslet extraction: Past and present panacea. *Journal of chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.

Dejian, H., Boxin, O., and Ronald, L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.

Dönmez, İ. E., and Dönmez, Ş. (2013). Ağaç kabuğunun yapısı ve yararlanma imkanları. *SDÜ Orman Fakültesi Dergisi*, 14, 156-162.

Dragendorff, G. (1898). *Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten: ihre Anwendung, wesentlichen Bestandtheile und Geschichte. Ein Handbuch für Ärzte, Apotheker, Botaniker, und Droguisten.* Verlag von Ferdinand Enke.

Durmaz, S., Kuştaş, S., Özgenç, Ö., and Yıldız, Ü. C. (2016). Bazı Odun Kabuklarının Kimyasal Analizi. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4(2), 438-442.

Elkady, W. M., Gonaïd, M. H., Yousif, M. F., El-Sayed, M., and Omar, H. A. (2021). Impact of Altitudinal Variation on the Phytochemical Profile, Anthelmintic and Antimicrobial Activity of Two Pinus Species. *Molecules*, 26(11), 3170.

Fady, B., Fineschi, S., and Vendramin, G. G. (2004). *EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use for Italian stone pine (Pinus pinea).* Bioversity International.

Fengel, D., and Wegener, G. (1984). Reactions in alkaline medium. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reaction*, Walter de Gruyter, Berlin. New York. pp, 296-318.

Ferreira-Santos, P., Genisheva, Z., Botelho, C., Santos, J., Ramos, C., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. (2020). Unravelling the biological potential of pinus pinaster bark extracts. *Antioxidants*, 9(4), 334.

Fielder, M. (1975). Plant medicine and folklore. New York: Winchester press, 55.

Ghalia, M. A., and Dahman, Y. (2017). Synthesis and utilization of natural fiber-reinforced poly (lactic acid) bionanocomposites. In *Lignocellulosic Fibre and Biomass-Based Composite Materials* (pp. 313-345). Woodhead Publishing.

Giada, M. D. L. R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants*, 2013, 87-112; DOI: 10.5772/51687

Gil-Ramírez, A., Mendiola, J. A., Arranz, E., Ruiz-Rodríguez, A., Reglero, G., Ibáñez, E., & Marín, F. R. (2012). Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. *Innovative food science & emerging technologies*, 16, 54-60.

Güveloğlu, E. (2014). Kanser İyileşir, Hayygrup Yayıncılık, İstanbul.

Halliwell, B. (1989). Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action?. *Free Radical Biology and Medicine*, 7(6), 645-651.

Halloum, B., Shakya, A. K., Elagbar, Z. A., and Naik, R. R. (2019). GC-MS Analysis and Biological activity of Essential Oil of Fruits, Needles and Bark of Pinus pinea grown wildy in Jordan. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 76(5), 825-831.

Harborne, J.B. (1999). Recent Advances in Chemical Ecology. *Natural Product Reports*, 16, 509-523.

Hawthorne, S. B., Yang, Y., and Miller, D. J. (1994). Extraction of organic pollutants from environmental solids with sub-and supercritical water. *Analytical Chemistry*, 66(18), 2912-2920.

Huang, W. Y., Cai, Y. Z., & Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62(1), 1-20; doi:10.1080/01635580903191585.

Hunt, A. J., and Attard, T. M. (Eds.). (2018). *Supercritical and other high-pressure solvent systems: for extraction, reaction and material processing.* Royal Society of chemistry.

Jablonsky, M., Nosalova, J., Sladkova, A., Haz, A., Kreps, F., Valka, J., ... and Surina, I. (2017). Valorisation of softwood bark through extraction of utilizable chemicals. A review. *Biotechnology advances*, 35(6), 726-750; doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.007>

- Jentzer, J. B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L., and Vilarem, G. (2015). Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food chemistry*, 166, 561-567.
- Kahl, R., and Kappus, H. (1993). Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung*, 196(4), 329-338.
- Karabulut, G., and Yemiş, O. (2019). Fenolik bileşiklerin bağlı formları ve biyoyararlılığı. *Akademik Gıda*, 17(4), 526-537; doi: 10.24323/akademik-gida.667270
- Karabulut, I., Bilenler, T., Sislioglu, K., Gokbulut, I., Seyhan, F., Ozdemir, I. S., and Ozturk, B. (2018). Effect of fruit canopy positions on the properties of apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Journal of Food Biochemistry*, 42(1), e12458.
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V., & Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *International journal of biological sciences*, 11(8), 982; doi: 10.7150/ijbs.12096
- Kayan, B. (2009). *Taxus Baccata* L.'nin Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri İle Ekstraksiyonu Ve Ekstraksiyon Verimlerinin Karşılaştırılması, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Keskinkaya, H. B., ve Akköz, C. (2018). Alglerden Elde Edilen Sekonder Metabolitler ve Biyoaktif Özellikleri, *IV. International Academic Research Congress*, Konya.
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., and Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328-2375.
- Kılıç, A. (2008). Uçucu yağ elde etme yöntemleri. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10(13), 37-45.
- Ko, M. J., Nam, H. H., and Chung, M. S. (2020). Subcritical water extraction of bioactive compounds from *Orostachys japonicus* A. Berger (Crassulaceae). *Scientific Reports*, 10(1), 1-10; doi.org/10.1038/s41598-020-67508-2
- Kocabaş, A. (2017). Ease of Phytochemical Extraction and Analysis from Plants?. *Anatolian Journal of Botany*, 1(2), 26-31.
- Kofujita, H., Ettyu, K., and Ota, M. (1999). Characterization of the major components in bark from five Japanese tree species for chemical utilization. *Wood science and technology*, 33(3), 223-228.
- Kolaç, T., Gürbüz, P., and Yetiş, G. (2017). Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi*, 5(1), 26-42.
- Facal, J. L. (1983). Kollesch, J. y Nickel, D.: "Antike Heilkunst. Ausgewählte Texte aus dem medizinischen Schrifttum der Griechen und Römer"(Book Review). *Emerita*, 51, 172.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., and Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), 217-233.
- Li, S., Xu, S., Liu, S., Yang, C., and Lu, Q. (2004). Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. *Fuel Processing Technology*, 85(8-10), 1201-1211.
- Lindahl, S., Ekman, A., Khan, S., Wennerberg, C., Börjesson, P., Sjöberg, P. J., ... and Turner, C. (2010). Exploring the possibility of using a thermostable mutant of β -glucosidase for rapid hydrolysis of quercetin glucosides in hot water. *Green Chemistry*, 12(1), 159-168.
- Liu, J., Sandahl, M., Sjöberg, P. J., and Turner, C. (2014). Pressurised hot water extraction in continuous flow mode for thermolabile compounds: extraction of polyphenols in red onions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(2), 441-445.
- Loewe M, V., Delard R, C., and Venegas G, A. (2011). Pine nut (*Pinus pinea* L.) production, an alternative for temperate areas. *APANews*, (39), 4-7.
- Majekodunmi, S. O. (2015). Review of extraction of medicinal plants for pharmaceutical research. *Merit Res J Med*, 3, 521-527.

- Makris, D. P., Boskou, G., and Andrikopoulos, N. K. (2007). Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 125-132.
- Mármol, I., Quero, J., Jiménez-Moreno, N., Rodríguez-Yoldi, M. J., and Ancín-Azpilicueta, C. (2019). A systematic review of the potential uses of pine bark in food industry and health care. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 558-566.
- Mellouk, H., Meullemiestre, A., Maache-Rezzoug, Z., Bejjani, B., Dani, A., and Rezzoug, S. A. (2016). Valorization of industrial wastes from French maritime pine bark by solvent free microwave extraction of volatiles. *Journal of Cleaner Production*, 112, 4398-4405.
- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C. Y. O., and Lima, G. P. P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compd. Biol. Act*, 8, 1-24; doi: 10.5772/66368
- Minner, H. Thesaurus Medicaminum. Codex 81, University library, Marburg: 1479
- Miranda, I., Gominho, J., Mirra, I., and Pereira, H. (2012). Chemical characterization of barks from *Picea abies* and *Pinus sylvestris* after fractioning into different particle sizes. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 395-400.
- Miranda, I., Mirra, I., Gominho, J., and Pereira, H. (2017). Fractioning of bark of *Pinus pinea* by milling and chemical characterization of the different fractions. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 19(2), 185-194.
- Mohd Jusoh, N. H., Subki, A., Yeap, S. K., Yap, K. C., and Jaganath, I. B. (2019). Pressurized hot water extraction of hydrosable tannins from *Phyllanthus tenellus* Roxb. *BMC chemistry*, 13(1), 1-10.
- Møller, J. K., Madsen, H. L., Aaltonen, T., and Skibsted, L. H. (1999). Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food chemistry*, 64(2), 215-219.
- Neiva, D. M., Rencoret, J., Marques, G., Gutiérrez, A., Gominho, J., Pereira, H., and Del Río, J. C. (2020). Lignin from tree barks: chemical structure and valorization. *ChemSusChem*, 13(17), 4537-4547.
- Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., and Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4669-4674.
- Nimse, S. B., and Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC advances*, 5(35), 27986-28006.
- Nunes, E., Quilhó, T., & Pereira, H. (1999). Anatomy and chemical composition of *Pinus pinea* L. bark. *Annals of Forest Science*, 56(6), 479-484.
- Ortega, A. M. M., and Campos, M. R. S. (2019). Bioactive compounds as therapeutic alternatives. In *Bioactive compounds* (pp. 247-264). Woodhead Publishing.
- Özay, C. (2015). Ege Bölgesi'ndeki Bazı *Alyssum* L. Taksonlarının Bıyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi Ve Aktıf Bileşenlerinin Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Packer, L., Rimbach, G., and Virgili, F. (1999). Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5-6), 704-724.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., and Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Pandey, A. Tripathi, S. (2014). Bitkisel ilaç için standardizasyon, ekstraksiyon ve ön fitokimyasal tarama stratejileri kavramı. *J Pharmacogn Phytochem*, 2: 115-9.
- Pandey, K. B., and Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., and Nunez, M. J. (2004). Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85(2), 267-273.
- Plaza, M., and Turner, C. (2017). Pressurized hot water extraction of bioactives. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 76, pp. 53-82). Elsevier.

- Ravber, M., Knez, Ž., and Škerget, M. (2015). Simultaneous extraction of oil-and water-soluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food chemistry*, 166, 316-323.
- Raza, W., Lee, J., Raza, N., Luo, Y., Kim, K. H., and Yang, J. (2019). Removal of phenolic compounds from industrial waste water based on membrane-based technologies. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 71, 1-18.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Rice-Evans, C., and Miller, N. J. (1994). 241 Total antioxidant status in plasma and body fluids. In *Methods in enzymology* (Vol. 234, pp. 279-293). Academic Press.
- Roleira, F. M., Varela, C. L., Costa, S. C., and Tavares-da-Silva, E. J. (2018). Phenolic derivatives from medicinal herbs and plant extracts: anticancer effects and synthetic approaches to modulate biological activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 115-156.
- Sakagami, H., Kawazoe, Y. U. T. A. K. A., Komatsu, N., Simpson, A., Nonoyama, M., Konno, K., ... and Tanuma, S. (1991). Antitumor, antiviral and immunopotentiating activities of pine cone extracts: potential medicinal efficacy of natural and synthetic lignin-related materials. *Anticancer research*, 11(2), 881-888.
- Seabra, I. J., Dias, A. M. A., Braga, M. E. M., & De Sousa, H. C. (2012). High pressure solvent extraction of maritime pine bark: Study of fractionation, solvent flow rate and solvent composition. *The journal of supercritical fluids*, 62, 135-148; doi: 10.1016/j.supflu.2011.10.016
- Sjostrom, E. (1993). Wood chemistry: fundamentals and applications, 2. Baskı, Academic Press.
- Suleria, H. A. R., and Barrow, C. (Eds.). (2019). *Bioactive Compounds from Plant Origin: Extraction, Applications, and Potential Health Benefits*. CRC Press.
- Unten, S., Sakagami, H., and Konno, K. (1989). Stimulation of granulocytic cell iodination by pine cone antitumor substances. *Journal of leukocyte biology*, 45(2), 168-175.
- URL-1, <https://tr.wikipedia.org/wiki/Fıstıkçamı>, Erişim: 01 Aralık 2022.
- Ustün, O., Özçelik, B., Akyön, Y., Abbasoglu, U., and Yesilada, E. (2006). Flavonoids with anti-Helicobacter pylori activity from Cistus laurifolius leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 108(3), 457-461.
- Uyar, B. B., ve Sürücüoğlu, M. S. (2010). Besinlerdeki biyolojik aktif bileşenler. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 38(1-2), 69-76.
- Vieito, C., Pires, P., Fernandes, É., and Velho, M. (2019). Chemical characterization of pine bark (Pinus pinaster Aiton subsp. atlantica), antioxidant properties and phenolic profile of its extracts. *Millenium*, (8), 79-87.
- Vieito, C., Fernandes, É., Velho, M. V., and Pires, P. (2018). The effect of different solvents on extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of extracts from pine bark (Pinus pinaster subsp. atlantica). *Chemical Engineering Transactions*, 64, 127-132.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Moyá, M. L., Troncoso, A. M., and García-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1), 230-235.
- Viñas, R. A., Caudullo, G., Oliveira, S., and De Rigo, D. (2016). Pinus pinea in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European atlas of forest tree species*, 204.
- Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food chemistry*, 99(4), 775-783.
- Wu, L., Hu, M., Li, Z., Song, Y., Yu, C., Zhang, H., ... and Wang, Z. (2016). Dynamic microwave-assisted extraction combined with continuous-flow microextraction for determination of pesticides in vegetables. *Food chemistry*, 192, 596-602.
- Yaltırık, F., ve Efe, A. (2000). Dendroloji, Gymnospermae –Angiospermae, Çantay Yayınevi, İstanbul.
- Yang, Y., Bowadt, S., Hawthorne, S. B., and Miller, D. J. (1995). Subcritical water extraction of polychlorinated biphenyls from soil and sediment. *Analytical Chemistry*, 67(24), 4571-4576.

Youngken, H. W. (1924). The drugs of the North American Indian II. *Am. J. Pharmacol.* 97:257–271.

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese medicine*, 13(1), 1-26; doi: 10.1186/s13020-018-017.

Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 4-14.



ÖZGEÇMİŞ

Kübra DEMİRCİ

[REDACTED]	
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]	
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

[REDACTED]	
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]