

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN BAZI YAĞLIK KETEN
TOHUMLARININ (*Linum Usitatissimum* L.) VE
FİLİZLERİNİN BİYOAKTİF BİLEŞİKLER
AÇISINDAN İNCELENMESİ ÜZERİNE BİR
ARAŞTIRMA**

Evrin ÖZKAYNAK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülden OVA

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.01.00

Sunuş Tarihi: 27.04.2011

Bornova - İZMİR

2011

Sayın **Evrin ÖZKAYNAK** tarafından DOKTORA TEZİ olarak “**Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Yağlık Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Biyoaktif Bileşikler Açısından İncelenmesi Üzerine Bir Araştırma**” adlı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27.04.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur. (Bu nedenle Evrim ÖZKAYNAK’ın sunduğu metnin doktora tezi olarak kabulüne oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.)

27/04/2011

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Gülden OVA	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Tomris ONOĞUR	
Üye	: Prof. Dr. Neriman BAĞDATLIOĞLU	
Üye	: Prof. Dr. Yaşar HIŞIL	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Murat ZORBA	

ÖZET

**TÜRKİYE’DE YETİŞTİRİLEN BAZI YAĞLIK KETEN
TOHUMLARININ (*LINUM USITATISSIMUM* L.) ve FİLİZLERİNİN
BİYOAKTİF BİLEŞİKLER AÇISINDAN İNCELENMESİ ÜZERİNE BİR
ARAŞTIRMA**

ÖZKAYNAK, Evrim

Doktora tezi, Gıda Mühendisliği Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülden OVA
Nisan 2011, 184 sayfa

Bu araştırmada Türkiye’de yetiştirilen 7 yerel çeşit yağlık keten (*Linum usitatissimum* L.) tohumunun toplam yağ, yağ asidi kompozisyonu, α -linolenik asit, toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve SDG (sekoizolarikirezinol diglukosid) lignan içeriklerinin incelenmesi, filizlenme süresince keten tohumu filizlerinde söz konusu biyoaktif bileşiklerin değişiminin saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca keten tohumunda bulunan SDG lignan bileşiğinin ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu koşullarının belirlenmesi üzerine çalışılmıştır.

Keten tohumunun biyoaktif bileşik içeriğine kültürel çeşitliliğin etkisinin önemli düzeyde olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Keten tohumlarının toplam yağ miktarı %37.55-45.07, doymamış yağ asidi içerikleri %87.39-%90.27 ve α -linolenik asit içerikleri ise %46.33-55.47 arasında değişmektedir. Yağsız keten tohumu unlarında toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarları sırasıyla 574.48-1209.20 mg ferulik asit/100 g ve 13.61-33.65 mg luteolin/100 g arasında saptanmış olup, SDG lignan miktarları ise 5.87-23.84 mg/g arasında değişmektedir. Keten tohumunun içerdiği söz konusu biyoaktif bileşikler üzerine kültürel çeşitliliğin etkisi incelendiğinde; TR 77705 çeşidinin en yüksek toplam fenolik madde ve SDG lignan içerdiği, TR 73572 çeşidinin ise en yüksek toplam flavonoid, toplam yağ ve α -linolenik asit içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Keten tohumu filizlerinin biyoaktif bileşik içeriğine kültürel çeşitliliğin ve filizlenme süresinin etkisi önemli bulunmuştur. TR 73572 ve TR 77705 çeşitleri 13 gün süre ile filizlendirilmiş; filizlendirme işlemi ile keten tohumlarının toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarları yüksek oranda artarken toplam yağ

ve SDG lignan içeriklerinde önemli düzeyde düşme saptanmıştır. TR 73572 ve TR 77705 filizlerinin α -linolenik asit içerikleri sırasıyla %45.15 ve %52.58 doymamış yağ asidi içerikleri ise %86.20 ve %89.80 olarak 5. günde en yüksek düzeydedir. TR 73572 ve TR 77705 filizlerinin toplam fenolik madde miktarları sırayla 3396.57 mg ferulik asit/100 g ve 2945.24 mg ferulik asit/100 g; toplam flavonoid miktarları ise sırayla 495.95 mg luteolin/100 g ve 543.22 mg luteolin/100 g olarak 13. günde en yüksek düzeyde saptanmıştır.

Keten tohumundan SDG lignan bileşiğinin ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu denemelerinde en iyi çalışma materyalinin yağı alınmış parça küspe, ekstraksiyon işleminde etkin faktörlerin ise ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve örnek miktarı olduğu belirlenmiş olup en uygun koşullarda ekstraksiyon verimi %69.63 olarak saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Keten tohumu, keten tohumu filizi, doymamış yağ asidi, α -linolenik asit, toplam fenolik madde, toplam flavonoid, SDG lignan, kültürel çeşitlilik, filizlenme süresi, SDG lignan bileşiğinin kritik altı su ekstraksiyonu.

ABSTRACT**A STUDY ON INVESTIGATING THE BIOACTIVE COMPOUNDS OF
SOME FLAX SEEDS (*LINUM USITATISSIMUM* L.) AND THEIR
SPROUTS CULTIVATED IN TURKEY****ÖZKAYNAK, Evrim**

Ph.D. Thesis, Food Engineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Gül den OVA

April 2011, 184 pages

In this study, total fat, fatty acid composition, α -linolenic acid, total phenolic, total flavonoid and SDG (secoisolariciresinol diglucosid) lignan contents of seven original flax seed (*Linum usitatissimum* L.) cultivars of Turkey was investigated. Besides, changes in these bioactive compounds of two flaxseed sprouts during germination was investigated. Also subcritical water extraction of SDG lignan from flax seed was studied

The results of this study showed that cultivar variety had a significant effect on bioactive compounds of flax seed. Total fat content of flax seeds were %37,55-45,07. Unsaturated fatty acid and α -linolenic acid contents of samples were between respectively %46,33-55,47 and %87,39-%90,27. Total phenolic content were determined between 574,48-1209,20 mg ferrulic acid/100 g and total flavonoids were found between 13,61-33,65 mg luteolin/100 g and SDG lignan content were calculated between 5,87-23,84 mg/g in defatted flaxseed flour. Flaxseed cultivar TR 73572 was found to have the highest total fat, α -linolenic acid and total flavonoid content. Besides, the highest total phenolic and SDG lignan content were observed for the cultivar TR 77705.

Germination time and cultivar variety had a significant effect on bioactive compounds of flax seed sprouts. TR 73572 and TR 77705 cultivars were germinated for 13 days. As total phenolic and total flavonoid content of flax seeds showed a considerable increase with germination, on the contrary total fat and SDG lignan content of flax seeds showed a significant decrease. While TR 73572 and TR 77705 sprouts had the highest unsaturated fatty acid and α -linolenic acid content on the fifth day, the sprouts had the highest total phenolic and total

flavonoid content on the thirteenth day. TR 73572 and TR 77705 sprouts had unsaturated fatty acid content with the values %86,20 ve %89,80 and α -linolenic acid content %45,15 and %52,58 respectively on the fifth day. Total phenolic content were calculated as 3396,57 mg ferrulic/100 g and 2945,24 mg ferrulic /100 g for sprouts of TR 73572 and TR 77705 cultivars respectively, similarly total flavonoids were 495,95 mg luteolin/100 g and 543,22 mg luteolin/100 g.

At the end of the subcritical water extraction study, defatted flax seed meal was found as suitable material in order to SDG lignan be extracted by subcritical water. Parameters such as temperature, extraction time and sample amount appear to have effect on subcritical water extraction and extraction yield was obtained as 69,63% at optimum conditions.

Key words: Flax seed, flax seed sprout, α -linolenic acid, total phenolic, total flavonoid, SDG lignan, cultivar variety, germination time, subcritical water extraction of SDG lignan.

TEŞEKKÜR

“Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Yağlık Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Biyoaktif Bileşikler Açısından İncelenmesi Üzerine Bir Araştırma” konulu bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG tarafından araştırma projeleri kapsamında 108O498 nolu proje numarası ile 1001 projesi olarak desteklenmiştir. Projenin yürütülmesi aşamasında her türlü destek ve yakın ilgilerini gördüğümüz TÜBİTAK-TOVAG Yürütme Komitesi üyelerine ve çalışanlarına teşekkürlerimizi sunarız.

Bu tezin her aşamasında önerileriyle beni yönlendiren, bilimsel alanda beni her zaman özgür bırakan, öğrenimim boyunca desteğini, hoşgörüsünü ve güler yüzünü hiç bir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Gülden Ova’ya,

Yüksek lisans ve doktora öğrenimim boyunca her zaman desteklerini hissettiğim Gıda Kalite Kontrol Ana Bilim Dalı hocalarıma ve asistanlarına,

Yüksek lisans ve doktora eğitimimi tamamlamaktan gurur duyduğum Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne, alt yapısına ve bu altyapıyı oluşturanlara,

Katkıları için Prof. Dr. Tomris Altuğ, Prof. Dr. Yaşar Hışıl, Prof. Dr. Neriman Bağdatlıoğlu, Dr. Ayfer Tan ve Yrd. Doç. Dr. Murat Zorba’ya

Yardımlarından dolayı Dr. Mustafa Çam, Dr. Özlem Çağındı, Dr. Özgül Özdestan, Arş. Gör. Şebnem Şimşek ve Arş. Gör. Evren Gölge’ye,

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Bitki Genetik Kaynakları Bölümüne ve çalışanlarına,

Sundukları her türlü hizmet için Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi (Argefar) yönetimi ve çalışanlarına,

Yardımlarından dolayı Necdet Bükey A.Ş. ve çalışanlarına,

Tüm hayatım boyunca bana vermiş oldukları destek, özveri ve anlayış için aileme,

Anlayışı, desteği, proje boyunca her türlü yardımı ve güler yüzü için sayın Nihat Kanmaz’a

içtenlikle teşekkür ederim.

Evrin ÖZKAYNAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XV
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	XIX
 1. GİRİŞ	 1
 2. LİTERATÜR ÖZETİ	 5
2.1. Keten Tohumu	5
2.1.1. Dünyada ve Türkiye’de keten tarımı.....	5
2.1.2. Keten tohumunun kimyasal bileşimi.....	9
2.1.2.1. Keten tohumunun toplam yağ ve yağ asidi kompozisyonu içeriği.....	10
2.1.2.2. Keten tohumunun yapısındaki fenolik bileşikler.....	12
2.2. Tohum Filizleri.....	18
2.3. Gıdaların Yapısındaki Biyoaktif Bileşiklerin Kritik Altı Su Ekstraksiyonu (Subcritical water extraction)	26
 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	 34
3.1. Materyal	34
3.1.1. Keten tohumu.....	34
3.1.2. Keten tohumu filizi	34
3.1.3. Kritik altı su ekstraksiyonu çalışmasında deneme materyali.	38
3.1.4. Kimyasallar.....	39
3.2. Yöntem.....	40
3.2.1. Nem analizi..	40
3.2.2. Toplam yağ analizi..	40
3.2.3. Yağ asidi kompozisyonu analizi..	40
3.2.4. Toplam fenolik madde analizi..	42
3.2.5. Toplam flavonoid analizi.....	43

İÇİNDEKİLER (Devamı)

Sayfa

3.2.6. SDG lignan analizi..	44
3.2.7. Keten tohumundan SDG lignan bileşiminin ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu.	47
3.2.8. Kritik altı su ekstraktlarında SDG lignan analizi.	55
3.2.9. İstatistiksel değerlendirme.	55
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	56
4.1. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Nem İçerikleri.....	56
4.2. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Toplam Yağ İçeriği.....	57
4.3. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Yağ Asidi Kompozisyonunu	59
4.4. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Toplam Fenolik Madde İçeriği..	66
4.5. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Toplam Flavonoid İçeriği.	71
4.6. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin SDG Lignan İçeriği.	75
4.7. Keten Tohumundan SDG Lignan Bileşiminin ASE 200 Cihazında Kritik Altı Su Ekstraksiyonu.....	77
4.7.1. Materyal şeklinin etkisi	77
4.7.2. Ekstraksiyon sıcaklığının etkisi.....	82
4.7.3. Ekstraksiyon süresinin etkisi.....	84
4.7.4. Basıncın etkisi..	87
4.7.5. Taze çözgen miktarının etkisi	88
4.7.6. Örnek miktarının etkisi.	89
4.7.7. Etkin faktörler arasındaki etkileşim	91
5. SONUÇ ve ÖNERİLER..	94
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	96
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ.	182

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1. SDG ve SECO bileşiklerinin kimyasal yapısı	17
2. Sıcaklığa bağlı olarak suyun dielektrik katsayısı.....	26
3a. 3 günlük filizler	35
3b. 5 günlük filizler	35
4a. TR 73572 keten çeşidi	35
4b. TR 77705 keten çeşidi	35
5. Pensler ve kurutma kağıtları	35
6. Keten tohumlarının ekim aşaması	36
7. Keten tohumlarını ön ıslatma ve sandviç kaplara yerleştirme aşaması.....	36
8. Çimlendirme kabini.....	37
9. Filizlerin elle toplanması.	37
10. Keten tohumu filizlerinin görünüşleri	38
11. Kritik altı su ekstraksiyonu çalışmasında materyal olarak kullanılan keten tohumu ve keten tohumu küspesi fotoğrafları..	39
12. LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi- İkili Kütle Spektrometresi) cihazının (API 4000 model) fotoğrafı..	46
13. ASE 200 cihazının parçaları..	48
14a. ASE 200 cihazında ekstraksiyonun gerçekleştiği ve ekstraktların toplandığı kısımlar.....	48
14b. ASE 200 cihazında otomatik ekstrakt boşaltma kısmı ve ekstrakt toplama viali	49
15. Ekstraksiyon işleminin yapıldığı metal hazne ve başlıkları..	49
16. Metal haznenin başlığının kısımları..	50
18. Keten tohumu (0. gün) ve keten tohumu filizlerinin filizlenme süresince α -linolenik asit içeriklerinin karşılaştırılması.....	62
19. Keten tohumu yağlarında kuru madde bazında toplam fenolik madde miktarları.....	68
20. Keten tohumu (0. gün) ve keten tohumu filizlerinin filizlenme süresince kuru madde bazında toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması	70
21. Keten tohumu yağlarında kuru madde bazında toplam flavonoid miktarları.....	72
22. Keten tohumu (0. gün) ve keten filizinin filizlenme süresince kuru madde bazında toplam flavonoid miktarlarının karşılaştırılması.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

Şekil	Sayfa
23. 40°C’de öğütülmüş kûspe, tane keten tohumu ve parça kûспенin ekstraksiyon sonrasındaki görünümleri	79
24. 40°C’de öğütülmüş kûspe, tane keten tohumu ve parça kûспенin ekstraktları.....	79
25. 120°C’de öğütülmüş kûspe, tane keten tohumu ve parça kûспенin ekstraksiyon sonrasındaki görünümleri.. ..	80
26. 140°C’de tane keten tohumunun ekstraksiyon sonrası görünümü	81
27. 140°C’de tane keten tohumu ekstraktları.....	82
28. 120°C, 140°C, 160°C ve 180°C’de ekstraksiyon sonrası parça kûspeler.....	83
29. 120°C, 140°C, 160°C ve 180°C’de parça kûspe ekstraktları.....	83
30. Parça kûspe ekstraktlarının 180°C’de 15, 30,60 ve 90 dak seviyelerinde ekstraksiyon sonrası görünümleri.. ..	85
31. Parça kûspe ekstraktlarının 180°C’de 15, 30, 60 ve 90 dak seviyelerdeki ekstraktları.	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
1. 2007 yılında en çok keten tohumu üreten ülkeler ve üretim miktarları.....	7
2. Türkiye’de 1994 ve 2003 yılları arasında keten tohumu ekim alanları ve üretim miktarları ..	7
3. Keten tohumunun besin bileşenlerinin içeriği	9
4. α -linolenik asit açısından zengin bitkisel gıda kaynakları.....	10
5. Lignanlar açısından zengin bazı bitkisel gıdaların lignan içerikleri	16
6. Gaz Kromatografisi cihazı koşulları	42
7. SDG lignan analizi için LC-MS/MS cihaz koşulları.....	45
8. ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu işleminde etkin faktörleri saptamak için uygulanan deneme deseni	52
9. ASE 200 cihazında etkin faktörler olduğu saptanan sıcaklık ve süre parametrelerinde ara değerler için uygulanan deneme deseni..	53
10. Yerel keten tohumu (<i>Linum usitatissimum</i> L.) çeşitlerinin nem içerikleri.....	56
11. Keten tohumu filizlerinin nem içerikleri	57
12. Yerel keten tohumu (<i>Linum usitatissimum</i> L.) çeşitlerinin toplam yağ içerikleri..	57
13. Keten tohumu filizlerinin kuru madde bazında toplam yağ miktarları	58
14. Yerel keten tohumu (<i>Linum usitatissimum</i> L.) çeşitlerinin yağ asidi kompozisyon içerikleri.	60
15. TR 77705 keten tohumu filizinin yağ asidi kompozisyonu.....	61
16. TR 73572 keten tohumu filizinin yağ asidi kompozisyonu.....	62
17. Yağsız keten tohumu unlarında kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarları	66
18. TR 77705 filizinde kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarları.....	69
19. TR 73572 filizinde kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarları.....	70
20. Yağı alınmış keten tohumu unlarında kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

Çizelge	Sayfa
21. TR 77705 filizinde kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları	73
22. TR 73572 filizinde kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları.....	74
23. Yağsız keten tohumu unlarında kuru madde bazında SDG lignan miktarları.....	76
24. Keten tohumu filizlerinin kuru madde bazında SDG lignan içerikleri.	77
25. ASE 200 cihazındaki 40°C’de kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan materyal şekilleri ve sabit tutulan faktörler.	78
26. 40°C ekstraksiyon sıcaklığında öğütülmüş küspe, tane keten tohumu ve parça küspe ekstraktlarının SDG lignan miktarları.....	79
27. ASE 200 cihazında 120°C’de kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan materyal şekli ve sabit tutulan faktörler..	80
28. 120°C ekstraksiyon sıcaklığında tane keten tohumu ve parça küspe ekstraktlarının SDG lignan miktarları	81
29. ASE 200 cihazındaki kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan sıcaklıklar ve sabit tutulan faktörler..	83
30. Parça keten tohumu küspesi örneklerinden farklı sıcaklıklarda elde edilen su ekstraktlarının SDG lignan içerikleri..	84
31. ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon süreleri ve sabit tutulan faktörler.	85
32. Parça keten tohumu küspesi örneklerinden farklı ekstraksiyon sürelerinde elde edilen su ekstraktlarının SDG lignan içerikleri.....	86
33. ASE 200 cihazındaki kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon basınçları ve sabit tutulan faktörler.	87
34. 1500 ve 2000 psi basınçlarda elde edilen ekstraktlardaki SDG lignan miktarları.....	87
35. ASE 200 cihazındaki kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan taze çözgen miktarları ve sabit tutulan faktörler	88
36. %5, 40 ve 100 oranlarında taze çözgen miktarı kullanılarak elde edilen su ekstraktlardaki SDG lignan miktarları	89

ÇİZELGELER DİZİNİ (Devamı)

Çizelge	Sayfa
37. ASE 200 cihazındaki kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan örnek miktarları ve sabit tutulan faktörler.	89
38. 180°C’de 5 ve 10 g örnek miktarı kullanılarak elde edilen ekstraktlardaki SDG lignan miktarları	90
39. 160°C ekstraksiyon sıcaklığında elde edilen ekstraktların ekstraksiyon süresi seviyelerinde SDG lignan miktarları.....	91
40. 170°C ekstraksiyon sıcaklığında elde edilen ekstraktların ekstraksiyon süresi seviyelerinde SDG lignan miktarları.....	92
41. 180°C ekstraksiyon sıcaklığında elde edilen ekstraktların ekstraksiyon süresi seviyelerinde SDG lignan miktarları.....	92
42. Parça küspeden metanol ekstraksiyonu ve kritik altı su ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlardaki SDG lignan miktarları.....	93

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simge/Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
A	A vitamini
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
Argefar	Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi
ASE 200	Dionex ASE 200, Basıncılı çözgen ekstraktörü
atm.	Atmosfer
B ₁	B-1 vitamini
B ₂	B-2 vitamini
B ₆	B-6 vitamini
C	Konsantrasyon
C	C vitamini
Ca	Kalsiyum minerali
Cu	Bakır minerali
DAD	Diyot dizinli dedektör
dak	Dakika
E	E vitamini
ESI-MS	Elektro spray iyonizasyon kütle spektrometresi
FAME	Free acid methyl esters
Fe	Demir minerali
g	Gram
GC	Gaz kromatografisi
ISTA	Uluslararası Tohum Test Birliği
id	iç çap
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPLC-MS/MS	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-İkili kütle spektrometresi
K	Potasyum minerali
L	Litre
LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi-İkili kütle spektrometresi

SİMGELER VE KISALTMALAR (devamı)

Simge/Kısaltma Açıklama

LOD	Belirtme sınırı
LOQ	Tayin sınırı
M	Molarite
mg	Miligram
Mg	Magnezyum minerali
mL	Mililitre
mm	Milimetre
Mn	Mangan minerali
Mpa	Megapaskal
MW	Molekül ağırlığı
N	Normalite
Na	Sodyum minerali
nm	Nanometre
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
psi	İnç kare başına basınç
SDG	Sekoizolairesinol diglikozit
SECO	Sekoizolairesinol
S/N	sinyal/gürültü
UFA	Doymamış yağ asidi
UV	Ultra viyole
v/v	Hacim/hacim
Zn	Çinko minerali
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre

1. GİRİŞ

Keten (*Linum usitatissimum* L.) Lineaceae ailesinin bir türü olup mavi çiçekli bir bitkidir. Keten bitkisi dallı yapısıyla 90-120 cm arasında büyüebilmekte çiçeklerinin renkleri açık maviden koyu maviye doğru bir değişim göstermektedir. Keten tohumları oval şekilde, 4-6 mm uzunluğunda, parlak yüzeyli, açık kahverengiden koyu kahverengiye doğru renk çeşitliliği gösteren fiziksel özelliklere sahiptir (Coşkuner and Karababa, 2007). Keten tarımının Mısır'da M.Ö. 5000 yıllarına dayandığına ilişkin bilgiler bulunmakta ve ketenin Mısırlılar zamanında çok değişik amaçlarla kullanılan bir bitki olduğu bilinmektedir (Oomah and Mazza, 1997; Coşkuner and Karababa, 2007). Anadolu topraklarında keten yetiştiriciliği ise M.Ö. 6620-7200 yıl öncesine dayanmaktadır (Kurt ve ark., 2006).

Keten tohumu %30–45 yağ, %20–30 protein, %20–28 toplam diyet lifi, %3–10 müsilaaj, %4–8 nem, %3–4 kül, ve A, B, D, E vitaminlerini, mineralleri ve amino asitleri içermektedir (Oomah and Mazza, 1997). Keten tohumu yağı % 9–11 doymuş ve %75–90 doymamış yağ asidi ihtiva etmektedir (Sharma and Kundu, 2006; Kurt ve ark., 2006). Keten tohumu bu bileşenlerin yanı sıra fenolik asitler, flavonoidler ve lignanlar gibi fenolik bileşiklerin de doğal kaynağıdır. Keten tohumu lignanlar açısından en zengin kaynak olup lignanca en zengin ikinci bir kaynak olan susamdan bile en az 100 kat daha fazla lignan içeriğine sahip bir yağlı tohumdur (Berner and O'Donnell, 1998; Orcheson et al., 1998; Wilför et al., 2006).

Yapılan çalışmalar sonucunda keten tohumunun insanlar üzerinde fitoöstrojen, antioksidan, antikarsinojen ve kardioprotektif etkilere sahip olduğu görülmüştür ve insan sağlığı üzerindeki bu olumlu etkilerinin özellikle SDG (sekoisolarikirezol diglukosid) lignandan ve içerdiği diğer fenolik bileşiklerden kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Keten tohumunda bulunan SDG lignan anti-kanser (Evans et al., 1995; Thompson et al., 1996a; Thompson et al., 1996b ; Yan et al., 1998; Li et al., 1999; Chen et al., 2002; Adlercreutz, 2002; Chen and Thompson 2003; Thompson, 2003) ve antioksidan (Kitts et al., 1999; Prasad, 1997; Saarinen et al., 2000; Collins ve ark., 2003; Bloedon ve Szapary, 2004; Hosseinian et al., 2006) özelliklerinin yanı sıra antiviral, antibakteriyel ve antifungal özelliklere de sahiptir. SDG lignan güçlü bir antioksidan olmasından dolayı da farklı hastalıklara karşı bağışıklık sistemini güçlendirici bir bileşiktir (Bloedon and Szapary, 2004; Collins et al., 2003). SDG lignan bileşiğinin

kardioprotektif etkisinin de olduğu yapılan bazı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Vanharanta et al., 1999; Prasad 1999; Vanharanta et al., 2002; Lemay et al., 2002; Vanharanta et al., 2003; Lucas et al., 2004). Thompson (2003) ise keten tohumunun kardioprotektif etkisinin içerdiği yüksek miktarda α -linolenik asit bileşiğinden kaynaklandığını belirtmektedir.

Keten tohumunda yüksek düzeylerde bulunan bu biyoaktif bileşiklerin sağlığa yararlı etkilerinin çalışmalarla ortaya çıkarılmasından sonra keten tohumu tüketimi artmış ve gıda formülasyonlarında fonksiyonel amaçla kullanılmaya başlanmıştır (Madhusudhan et al., 2000; Johnsson et al., 2002; Medina, 2006). Bütün halde keten tohumu kahvaltılık tahıllarda, karışık tahıllı ekmeklerde, kahvaltılık içeceklerinde, salata soslarında, salata kremalarında, bisküvilerde, keklerde, krakerlerde, çorbalarda ve enerji barlarında kullanılmakta olup keten tohumu unu ekmeklerde ve kurabiyelerde kullanılmaktadır (Medina, 2006; Coşkuner and Karababa, 2007). Yağı alınmış keten tohumu küspesi de düşük yağ içeriğinin yanı sıra yüksek diyet lifi, müsilaj ve lignan içermesi nedeniyle fonksiyonel gıdalar için iyi bir bileşen olabilmekte; fırıncılık ürünlerinde ve kahvaltılık tahıllarda kullanılmaktadır (Madhusudhan et al., 2000; Hu et al., 2007).

Keten tohumunun yağ miktarı, yağ asidi kompozisyonu, lignanlar, fenolik asitler ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşen içeriği kültürel çeşitliliğe ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Oomah and Mazza, 1997; Thompson et al., 1997). Anadolu toprakları keten bitkisinin anayurdu olmasına karşın ülkemizde keten tohumu üretimine yeterince önem verilmemiş olup zaman içerisinde üretim miktarları oldukça düşmüştür.

Genellikle baklagiller, buğdaygiller, lahanagiller familyasına ait türlerin tohumları filizlendirilerek oluşan sürgünleri besin maddesi olarak tüketilmektedir. Filizlendirilmiş tohumlar özellikle Doğu Asya ülkelerinde çok eski yıllardan beri değişik şekillerde birçok yemeğin tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır. Bazı baklagil filizleri ise Çin'de 5000 yıl öncesinden beri tanınmakta ve sağlıklı bir besin olarak değerlendirilmektedir (Eşiyok ve Bozokalfa, 2002). Son yıllarda yağlı tohumların ve diğer değişik tohumların filizlerinin eldesi, yararları ve tüketilmesi üzerine çalışmalar yapılmakta ve bu filizlerin fonksiyonel gıda olarak tüketimi yaygınlaşmaktadır.

Filizlendirme işlemi tohumların besin içeriklerinin zenginleşmesini sağlamasının yanı sıra (Badshah et al., 1991; Sattar et al., 1995; Khattak et al., 2007a; Zanabria, et al., 2006) tohumların protein sindirilebilirliğini de arttırmaktadır (Zanabria et al., 2006; Khattak et al., 2007b). Pek çok tohumun filizlendirilmiş ürünleri Avrupa’da, Amerika’da ve Kanada’da oldukça önemli düzeylerde tüketilmektedir. Çeşitli filizler kahvaltılık ürünler, salatalar, çorbalar, makarnalar, fırın ürünleri gibi çok çeşitli gıda ürünlerinde kullanılmaktadır (Mao et al., 2005; Khattak et al., 2007a).

Keten tohumunun filizlendirmesi ile ilgili çalışmalar bazı gıda firmaları tarafından yürütülmektedir. Keten tohumu filizlerinin vitamin, mineral ve aminoasit içeriklerinde tohuma kıyasla önemli düzeyde artış olduğu bildirilmekle beraber (Canadian Organic Sprout Company, 2003), keten tohumunun yukarıda belirtilen ve keten tohumu tüketimi açısından önemli olan biyoaktif bileşenlerin filizlendirme işlemi ile ve filizlendirme süresince nasıl değiştiğine dair sistemli bilimsel araştırmaların bulunmadığı saptanmıştır. Ülkemizde filizlendirilmiş tohumların tüketimi hala yaygın olmamakla birlikte filizlerin ticari üretimine de önem verilmemektedir.

Bitkisel kaynaklı çeşitli biyoaktif bileşiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin yapılan çalışmalarla ortaya konulmasıyla birlikte bu bileşiklerin bitkisel materyallerden ekstraksiyonu önemli bir endüstriyel işlem haline gelmiştir. Başlangıçta ekstraksiyon işleminde organik çözügenler kullanılmıştır. Organik çözügenler çevreye ve insan sağlığına zarar vermektedirler ve sağlığa faydalı bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun değildirler. Gıdalardaki biyoaktif bileşiklerin gıda desteği olarak kullanımına toplumun ilgisinin artması, fonksiyonel ürünlerin üretiminin ve buna bağlı olarak yasal düzenlemelerin de artması nedeniyle ekstraksiyon metodlarında daha sağlıklı alternatif yollarla ilgili araştırmalar başlamıştır (Luque de Castro et al., 1999). Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden biri de kritik altı su ekstraksiyonu yöntemidir.

Bu çalışmada, Türkiye’de yetiştirilen bazı yağlık keten tohumu örneklerinin toplam yağ, yağ asidi kompozisyonu, α -linolenik asit, toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve SDG lignan içeriklerinin saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca araştırılan tohum çeşitleri arasında söz konusu biyoaktif bileşikleri daha yüksek düzeyde içeren iki yerel keten tohumu çeşidi filizlendirilerek filizlenme süresince keten tohumu filizlerinde söz konusu biyoaktif bileşiklerin düzeyinde nasıl bir değişim olduğu da araştırılacaktır. Çalışmanın devamında keten tohumunun

yapısındaki SDG lignan bileşiğinin ASE 200 (basınçlı çözgen ekstraktörü) cihazında kritik altı su ekstraksiyonu koşullarının belirlenmesi de amaçlanmıştır.

Keten tohumu ve keten tohumu ürünlerinin fonksiyonel gıda olarak önemi de son yıllarda anlaşılmış ve bu konudaki araştırmalar önem kazanmıştır. Bu çalışma sonucunda, ülkemizde yetiştirilen keten tohumları, içerdiği önemli biyoaktif bileşikler açısından (α -linolenik asit, SDG lignan, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid) incelenecek olup zengin bileşen içeriğine sahip olan tohumlar tespit edilebilecektir. Keten tohumu bunların yanı sıra dünya genelinde ekonomik olarak önemli bir yağlı tohumdur ve bu doğrultuda ciddi anlamda tarımı yapılan bir bitkidir. Bu çalışma ile doğal tüketime yönelik keten tohumu yağı eldesi için α -linolenik asit açısından zengin olan yerli keten çeşitleri tespit edilmiş olacaktır. Son yıllarda, filizlendirilmiş tohumların içerdikleri zengin besin bileşimi ve insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri önem kazanan bir konudur. Bu çalışma ile keten tohumu filizlerinde toplam yağ, α -linolenik asit, toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve SDG lignan bileşiklerinin miktarları tespit edilip, filizlendirme işlemi boyunca söz konusu biyoaktif bileşiklerde nasıl bir değişim olduğu tespit edilebilecektir. Ayrıca önemli bir lignan kaynağı olan keten tohumunda yüksek düzeyde bulunan SDG lignan bileşiğinin gıda üretiminde çeşitli amaçlarla kullanılabilirliğinin sağlanabilmesi için organik çözgen yerine su ile ekstraksiyonunun yapılması gerekmektedir. Bu araştırma sonucunda; keten tohumunda bulunan SDG lignanın, ASE 200 cihazında yüksek verimde ve kısa sürede ekstrakte edilebileceği en uygun kritik altı su ekstraksiyonu koşulları belirlenecek olup çalışma sonuçları bu işlemin gıda endüstrisinde etkin bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlayacaktır. Çalışmamızda elde edilen bulguların ülkemiz ve dünya literatürüne katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

LİTERATÜR ÖZETİ

1.1. Keten Tohumu

Bu bölümde dünyada ve Türkiye’de keten tarımı ve keten tohumunun kimyasal bileşimi ile ilgili çalışmalara yer verilmektedir.

1.1.1. Dünyada ve Türkiye’de keten tarımı

Linaceae familyasından *Linum* cinsi dünya üzerinde 200’den fazla türe sahiptir ve bu türler genellikle Akdeniz ülkeleri, Balkanlar ve Türkiye’de yetişmektedir. Bu türler içinde keten (*Linum usitatissimum* L.) bilinen en eski türdür (Konuklugil ve Bahadır 2004; Wang et al., 2007). *Linum* cinsinin Avrupa’da 36 türü, Kıbrıs’da 8 türü, İsrail’de 9 türü, Irak’da 13 türü, Rusya’da 45 türü, İran’da 15 türü ve Türkiye’de 38 türü bulunmaktadır. Son yıllarda sayısı gittikçe artan floristik çalışmalarla bu türlere *L. maritimum* L. da eklenerek tür sayısı 39’a ulaşmıştır. Endemizm oranının yüksek, alt tür ve varyete sayısının fazlalığı bu cinsin gen merkezlerinden birinin Anadolu olabileceğini göstermektedir (Türkel, 2007).

Keten sonbaharda ve ilkbaharda ekilebilen, Haziran-Ağustos ayları arasında mavimsi çiçekler açan yıllık bir bitkidir. Keten bitkisi her çeşit toprakta yetişebilir; kireçli toprakları ve ılıman iklimi sever ve tohumlarıyla üretilir (Vikipedi, 2011). Lifinden ve yağından yararlanılacak keten bitkilerinin fiziksel görünüşleri birbirinden farklıdır. Tohumlarından yağ elde etmek için yetiştirilen keten tohumları kısa boylu bitkiler olup dallanmış yapıdadırlar, dokumacılıkta kullanılmak amacıyla lif elde etmek için yetiştirilen keten tohumları ise daha uzun boyludur ve dallanma daha azdır. (Coşkuner and Karababa, 2007). Liflik ketenler nemli havayı, yağlık ketenler ise güneşli havayı sever. Anadolu’da kışlık ketenler Ağustos-Eylül, yazlık ketenler ise Mart-Nisan aylarında ekilir. Yağlık ketenler iyice olgunlaştıktan sonra liflik ketenler ise olgunlaşmadan toplanır. Temmuz ve Ağustos aylarında bitki yeşilliğini kaybedip yapraklarını dökünce hasatı yapılmalıdır. Keten tohumları kapsülden dövülerek çıkarılır ve elenerek temizlenir. Gövdeler iyice ezilerek içinden lifleri çıkarılır. Boyu en az 60 cm olan bitkiden tekstilde kullanılabilecek liflerde elde edilebilir (Vikipedi, 2011).

Keten tarihte tarımı yapılan ilk bitkilerden birisidir. Gürcistan’da milattan önce 30.000’lere dayanan tarih öncesi bir mağarada boyanmış keten lifleri bulunmuştur (Wapedia 2011). Keten ekimi Babil’de milattan önce 3000 yılına kadar dayanır. Mısırlıların mumyalarını sarmak için kullandıkları kumaşın keten olduğu görülmüştür (Kurt ve ark 2005). Özellikle eski Mısır’ın başkenti Teb şehrindeki mezar ve tapınak duvarlarında keten çiçeklerinin resimleri bulunmaktadır (Wapedia 2011). Tarih öncesi devirlere ait ketenden yapılmış materyallere İsviçre’nin göl kıyılarındaki yerleşim bölgelerinde ve Eski Mısır mezarlarında rastlanmıştır. Bu da ketenin iplik ve kumaş haline getirilme işlemlerinin binlerce yıl önceden geliştiğini ortaya koymaktadır (Yıldırım, 2005). Kuzey Avrupa’da keten lifinin elbise yapımında kullanılması Neolitik çağa (M.Ö. 7,000-9,000) kadar uzanmaktadır (Wapedia 2011).

Türkiye’de bazı keten türleri tabii olarak Batı Anadolu, İç Anadolu ve Karadeniz başta olmak üzere Anadolu’nun çoğu yerinde yetişmektedir. Türkiye’de keten yetiştiriciliği M.Ö. 6620-7200 yıl öncesine dayanmakta olup Türkiye’nin doğusunda M.Ö. 6000 yıllarına ait olduğu saptanan ketenden yapılmış elbiseler bulunmuştur. Anadolu’da keten tohumuna Kirbas tohumu, Siyelek, Zeyrek gibi yöresel adlar verilmektedir (Türkel, 2007).

Günümüzde keten tohumu özellikle Kanada, Arjantin, Amerika, Çin ve Hindistan’da tarımı yapılan önemli bir yağlı tohumdur (Wang et al., 2007). 2007 yılında Kanada dünyanın keten üretiminde ve ihracatında %34 oranı ile liderdir. Kanada’yı %25.5 ile Çin, %9 ile Hindistan, %8 ile Amerika Birleşik Devletleri ve %3.5 ile Etiyopya izlemektedir (Wapedia 2011). Çizelge 1’de 2007 yılında dünyada en çok keten üreten ülkelerin sıralaması ve üretim miktarları görülmektedir.

Çizelge 1. 2007 yılında en çok keten tohumu üreten ülkeler ve üretim miktarları (FAO 2011).

Ülkeler	Üretim (ton)
Kanada	633.500
Çin Cumhuriyeti	480.000
Hindistan	167.000
Amerika Birleşik Devletleri	149.963
Etiyopya	67.000
Bangladeş	50.000
Rusya	47.490
Ukrayna	45.000
Fransa	41.000
Arjantin	34.000

Ülkemizde ise keten tohumu üretimi diğer ülkelerle kıyaslandığında oldukça düşük olduğu görülmektedir. Ülkemizde 1994 yılında keten tohumu üretimi 650 ton iken 2003 yılında üretim miktarı 110 tondur (Çizelge 2). 2006 yılında ise keten tohumu üretim miktarı 84 tona düşmüş ve bu gerileme devam ederek 2009 yılında üretim miktarı 1 tona düşmüştür (Türk, 2011).

Çizelge 2. Türkiye’de 1994 ve 2003 yılları arasında keten tohumu ekim alanları ve üretim miktarları (Onurlubaş ve Kızılaslan 2007)

Yıllar	Ekim alanı (ha)	Üretim (ton)
1994	1,355	650
1995	650	390
1996	355	228
1997	355	228
1998	355	185
1999	355	227
2000	320	173
2001	290	155
2002	250	130
2003	250	110

Keten bitkisinin latince ismi olan *Linum usitatissimum* L. “en faydalı” anlamına gelmekte olup keten bitkisinin bütün kısımlarının tarih boyunca çeşitli amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Keten bitkisinin lifleri ve keten tohumundan elde edilen yağ hem geçmişte hem günümüzde önemli bir değere sahip olmuştur (Konuklugil ve Bahadır 2004). Keten liflerinin dokumacılıkta kullanılmasının yanında, keten tohumu son 10.000 yıldır gıda olarak da kullanılmaktadır (Başer, 2002). Keten tohumunun tarih boyunca tıbbi amaçla; dahilen hafif laksatif ve haricen lokal enflamasyonlarda lapa olarak kullanıldığına dair bilgiler bulunmaktadır (Konuklugil ve Bahadır 2004).

Günümüzde keten tarımı, genel olarak yağ ve lif elde etmek amacıyla yapılmakta olup keten bitkisi endüstride keten kumaşı üretiminde ve yemeklik veya yemeklik olmayan endüstriyel yağ üretiminde kullanılmaktadır (Kurt ve ark 2005; Bozkurt ve Kurt, 2007) Keten tohumu yağı ticari olarak boya, vernik, yer muşambası, baskı mürekkebi üretimlerinde ve kozmetik alanında kullanılmaktadır. Ayrıca keten bitkisi gemi halatı ve yelkeni, çadır bezi, hortum yapımında, gaz maskesi, muşamba üretiminde, boya, cila ve vernik sanayiinde, sert kontra plak, kağıt, bitkisel yağ ve reçine üretiminde, ısı yalıtım malzemesi yapımında kullanılmaktadır. Keten tohumu kanatlı hayvan sektöründe yumurtanın omega 3 yağ asidini yükseltmesi nedeniyle yemlere katılmakta olup yağı alınmış keten tohumu küspesi de hayvan beslenmesi için önemli bir kaynak olarak görülmektedir (Smith and Jimmerson, 2005).

İnsan beslenmesinde ise keten tohumu 20 yılı aşkın bir süredir fonksiyonel bir gıda olarak tane keten tohumu, öğütülmüş keten tohumu, keten tohumu yağı, yağı alınmış keten tohumu küspesi, keten tohumu lifi ve lignan ekstraktları şeklinde kullanılmaktadır (Hu et al., 2007). Bütün halde keten tohumu; kahvaltılık tahıllarda, karışık tahıllı ekmekte, kahvaltılık içeceklerinde, salata soslarında, salata kremalarında, bisküvilerde, keklerde, krakerlerde, çorbalarda ve enerji barlarında kullanılmakta olup keten tohumu unu ticari olarak ekmeklerde ve kurabiyelerde kullanılmaktadır (Medina, 2006; Coşkuner and Karababa, 2007). Ayrıca yağı alınmış keten tohumu küspesi de düşük yağ içeriğinin yanı sıra yüksek diyet lifi, müsilaaj ve lignan içermesi nedeniyle fonksiyonel gıdalar için iyi bir bileşen olabilmekte; fırıncılık ürünlerinde ve kahvaltılık tahıllarda kullanılmaktadır (Madhusudhan et al., 2000; Hu et al., 2007).

1.1.2. Keten tohumunun kimyasal bileşimi

Keten tohumu ortalama olarak %30–45 yağ, %20–30 protein, %20–28 toplam diyet lifi, %3-10 müsilağ, %4–8 nem, %3–4 kül, ve A, B, D, E vitaminlerini, mineralleri ve amino asitleri içermektedir (Oomah and Mazza, 1997). Keten tohumu yağı % 9-11 doymuş ve % 75-90 doymamış yağ asidi ihtiva etmektedir (Sharma and Kundu, 2006; Kurt ve ark., 2006). Keten tohumu bu bileşenlerin yanı sıra fenolik asitler, flavonoidler ve lignanlar gibi fenolik bileşiklerin de doğal kaynağıdır (Berner and O'Donnell, 1998; Korthals, 2002). Çizelge 3'de keten tohumunun besin bileşenlerinin içeriği ile ilgili yapılmış bir çalışmanın sonuçları yer almaktadır. Keten tohumu potasyum, fosfor, magnezyum ve kalsiyum bileşikleri açısından da zengin olduğu görülmektedir.

Çizelge 3. Keten tohumunun besin bileşenlerinin içeriği (Wapedia 2011)

Keten tohumunun besin bileşenleri tablosu (100 g)	
Karbonhidrat	28.88 g
Şeker	1.55 g
Diyet lifi	27.3 g
Yağ	42.16 g
Protein	18.29 g
Tiamin (B ₁ vit.)	1.644 mg
Riboflavin (B2 vit.)	0.161 mg
Niasin (Vit. B ₃)	3.08 mg
Vitamin B ₆	0.473 mg
Vitamin C	0.6 mg
Kalsiyum	255 mg
Demir	5.73 mg
Magnezyum	392 mg
Fosfor	642 mg
Potasyum	813 mg
Çinko	4.34 mg

Bu bölümde keten tohumunu insan beslenmesinde önemli kılan ve bu çalışmada yer alan keten tohumunun biyoaktif bileşenleri ile ilgili araştırmalar ele alınmaktadır.

1.1.2.1. Keten tohumunun toplam yağ ve yağ asidi kompozisyonu içeriği

Yağlık keten tohumu içerdiği yüksek yağ miktarı nedeniyle yağlı tohum olarak önemli bir ekonomik değere sahiptir (Karaca ve Aytaç 2007; Kurt ve ark., 2006). Keten tohumunun içerdiği yağ miktarı ile ilgili çeşitli çalışmalarda %29,1-48,00 arasında toplam yağ oranları saptanmıştır (Green and Marshall, 1981; Rowland et al., 1988; Batta et al., 1985; Wakjira et al., 2004).

Son yıllarda keten tohumu yağının insan beslenmesinde önem kazanması, omega-3 yağ asidi olan α -linolenik asit açısından oldukça zengin olmasından kaynaklanmaktadır. α -linolenik asit bileşiği açısından zengin bitkisel gıda kaynakları Çizelge 4’de görülmektedir (Bloedon and Szapary 2004). Keten tohumu yağı zengin esansiyel yağ asidi bileşiminin yanı sıra steroller, fosfolipitler ve vitaminleri de içermektedir (Rudnik et al., 2001).

Çizelge 4. α -linolenik asit açısından zengin bitkisel gıda kaynakları (Bloedon and Szapary 2004)

Gıda kaynağı	α -linolenik asit içeriği (%)
Keten tohumu	55
Kanola yağı	10
Ceviz	10
Soya fasulyesi	7

Yağlı tohumların içerdikleri yağ asitleri yağın kullanım alanlarını belirlemektedir (Karaca ve Aytaç 2007). Keten tohumu yüksek oranda α -linolenik asit içermesi nedeniyle hızlı okside olabilen bir yağdır. Bu nedenle soğuk ekstraksiyon işleminden sonra oksidasyonu önlemek için keten tohumu yağı E vitamini ilave edilerek koyu renkli şişelerde depolanmalı ve sofralık yağ olarak tüketilmeli, kızartma işlemi için kullanılmamalıdır (Lukaszewicz et al., 2004). Buna karşın, α -linolenik asit oranı düşük keten tohumu çeşitlerinin geliştirilmesiyle keten tohumu yağı yemeklik yağ olarak da kullanılmaya başlanmıştır. 1980’den günümüze kadar Kanada’da ve Avustralya’da keten tohumunu ısısal işlemlere dayanıklı hale getirmek için çalışmalar yürütülmektedir. Keten tohumunun içerdiği α -linolenik asit içeriği %2’nin altına düşürülerek düşük α -linolenik asitli Solin ve Linola keten tohumu çeşitleri üretilmiştir (Rowland, 1994). Ayrıca keten tohumu yağının palmitik asit içeriği %30’a yükselterek margarin üretiminde kullanılması çalışmaları da yapılmıştır (Ntiamoah et al., 1995).

Yağlı tohumların yağ asidi kompozisyonu sürekli sabit olmayıp türlere özgü karakteristik farklılıklar göstermekte ve birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Tohumların yağ asidi kompozisyonu dağılımı farklı enlemlerde yer alan ekolojik bölgelerde önemli farklılıklar göstermektedir. Çevresel faktörler arasında özellikle sıcaklığın yağ asitleri sentezi üzerine etkisi önemlidir (Karaca ve Aytaç 2007). Keten tohumunun yağ içeriği ve kalitesini çevresel faktörlerden sıcaklık, toprak koşullarının yanı sıra kalıtsal özellikler (genotip) ve kültürel çeşitlilik de önemli derecede etkilemektedir (Green and Marshall, 1981; Röbbelen et al., 1989). Keten tohumunun yağ asidi bileşiminde en fazla değişkenlik oleik, linoleik ve α -linolenik asitlerde gözlenmektedir. Keten tohumu yağı yaklaşık olarak %75-90 doymamış yağ asidi; %30.7-67.5 α -linolenik asit, %15-20 oleik asit, %10-15 linoleik ve %9-11 doymuş yağ asidi; %5-6 palmitik asit ve %4-5 stearik asit ihtiva etmektedir (Röbbelen et al., 1989).

Eliasson ve ark. (2003) İsviçre’de 2000 yılı hasadından 10 çeşit, 2001 yılı hasadından da bir önceki yıldan farklı 17 çeşit keten tohumu yağı ile çalışmışlardır. Araştırmacılar 10 çeşit keten tohumunun toplam yağ içeriğinin kuru madde bazında %39.7-46.0 arasında değiştiğini; 17 çeşit tohumda da toplam yağ miktarının %39.2-47.2 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Wakjira et al. (2004) Etiyopya’da yetiştirilen 60 çeşit keten tohumunun yağ asidi kompozisyonuna kültür çeşitliliğinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında tohumların doymamış yağ asidi içeriklerinin çeşide bağlı olarak %85.9-90.6 arasında değiştiğini ve bunun %47-59.10 α -linolenik asit, %10.9-16.1 linoleik asit, %14.8-29.3 oleik asitten meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca tohumların doymuş yağ asidi içeriği %8.4-11.9 arasında olup, palmitik asitin %5.2-6.6 ve stearik asitin %2.9-5.7 arasında değiştiğini saptamışlardır.

Krist et al. (2006) Avusturya’dan 2 çeşit ve Almanya’dan 1 çeşide ait keten tohumu yağ örneklerinin yağ asidi kompozisyonunu inceledikleri çalışmalarında, keten tohumu yağının yağ asidi kompozisyonunu elektro spray iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS)’nde teşhis etmişlerdir. İnceledikleri 3 çeşit keten tohumu yağının yağ asidi kompozisyonunun %50’nin üzerinde α -linolenik asitten, %20’in altında linoleik ve oleik asitten, %85’in üzerinde ise bu üç yağ asidinden oluştuğunu belirtmişlerdir.

Choo et al. (2007) Yeni Zellanda’da marketlerde satılan soğuk sıkılmış yedi adet keten tohumu yağının yağ asitleri metil esterlerini (FAME), dietil eter ve

BF3-methanol kullanarak elde etmişler ve yağların yağ asidi kompozisyonunu Gaz Kromatografisi cihazında teşhis etmişlerdir. OSELC, FO ve EBN olarak kodlanan 3 adet keten tohumu yağının en yüksek α -linolenik asit (%58.87–60.42) ve en düşük oleik asit içeriklerine (%13.44–14.65) sahip olduğu; HEA kodlu yağın ise en düşük α -linolenik asit (%51.80) ve en yüksek oleik asit (%22.21) içeriğine sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu yağın diğer yağlardan farklı olduğu ($p<0,05$) ve bu farklılığın kültürel çeşitlilikten kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada keten tohumu yağının α -linolenik asit içeriğinin artışıyla orantılı olarak oleik asit içeriğinin azaldığı saptanmış, bu durumun Bhatti (1995) tarafından da gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Yedi adet soğuk sıkılmış keten tohumu yağının çoklu doymamış yağ asidi içerikleri ise %89.46-91.61 arasında değişmektedir.

Bozan and Temelli (2008) Konya'dan yerli üreticiden temin ettikleri keten tohumunun yağını süperkritik CO₂ ekstraksiyonu yöntemi ile ekstrakte etmişler ve yağ asidi kompozisyonunu Gaz Kromatografisi cihazı ile analizlemişlerdir. Keten tohumu yağında bulunan başlıca yağ asidinin α -linolenik asit olduğunu ve keten tohumunda %88.4 çoklu doymamış yağ asidi, %58.31 α -linolenik asit, %13.96 linoleik asit, %15.07 oleik asit, %4.59 palmitik asit ve %6.86 stearik asit bulunduğunu belirtmişlerdir.

1.1.2.2. Keten tohumunun yapısındaki fenolik bileşikler

Keten tohumunda bulunan ve insan beslenmesi açısından önemli değere sahip olan fenolik bileşikler; fenolik asitler, flavonoidler ve izoflavonoidler içinde yer alan lignanlar olarak üç başlık altında toplanmaktadır.

Fenolik asitler hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki ana grupta incelenirler (Saldamlı, 2005). Fenolik asitler doğada meyve, sebze ve birçok bitkinin yapısında bulunan hidrofilik bileşiklerdir (Silva et al., 2000). Fenolik asitlerin fenol halkasına bağlı hidroksil grupları çok aktif olup, şekerlerle birleşerek glikozitleri oluştururlar (Saldamlı, 2005). Keten tohumu çeşitli fenolik asitleri ve bunların glikozidik formlarını yapısında taşımakta olup keten tohumunun fenolik asit içeriğindeki çeşitlilik ve bulunma düzeylerindeki değişim mevsimsel etkilerden ve kültürel çeşit farklılığından kaynaklanmaktadır.

Keten tohumunun p-kumarik asit ve ferrulik asitin glikozidik formlarını yüksek miktarda içerdiği bildirilmiştir (Westcott and Muir 1996). Schoenrock et al. (1997) ise keten tohumunda özellikle ferrulik asit, sinapik asit, kafeik asit ve

bunların glikozitlerinin daha yüksek miktarlarda bulunduğunu belirtirken, Johnsson et al. (2002) öğütülmüş keten tohumu küspesinin büyük molekül ağırlığına sahip p-kumarik asit glikozit ve ferrulik asit glikozit bileşiklerini yüksek miktarda içerdiğini bildirmişlerdir.

Keten tohumunda bulunan fenolik asitler üzerine çalışan Dabrowski and Sosulski (1984) keten tohumunun p-kumarik, o-kumarik, ferrulik, p-hidroksibenzoik, vanilik, and sinapik asitlerin serbest ve bağlı formlarını içerdiğini saptamışlardır. Çalışmada kabuğu ve yağı alınmış keten tohumunun toplam ve esterleşmiş fenolik içeriklerinin ferrulik eşdeğeri üzerinden sırasıyla 81 ve 73.9 mg/100 g olduğunu; toplam ve esterleşmiş fenoliklerin %46 trans-ferrulik, %36 trans-sinapik, %7.5 p-kumarik asit ve %7.5 trans-kafeik asit bileşiklerinden oluştuğu saptanmıştır.

Wanasundara and Shahidi (1994) yağı alınmış keten tohumu küspelerinin metanol ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarlarını ferrulik asit eşdeğeri üzerinden 130-220 mg/100 g arasında bulduklarını belirtmişlerdir.

Oomah et al (1995) Kanada'nın batısında 4 farklı bölgeye 3 yıl (1991,1992,1993) boyunca ettikleri 8 çeşitten oluşan 96 keten tohumu örneğinin fenolik madde miktarları üzerine kültür çeşitliliğinin, ekim yılının ve ekim bölgesinin etkisini araştırmışlardır. Keten tohumu örneklerindeki bazik metanolle esterleşmiş fenolikleri ve sadece metanol kullanarak serbest fenolikleri ekstrakte etmişlerdir. Keten tohumlarının toplam fenolik madde miktarının klorojenik asit üzerinden 800-1000 mg/100 g, serbest fenoliklerin 300-500 mg/100 g arasında değiştiğini ve esterleşmiş fenoliklerin ortalama 500 mg/100 g olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar esterleşmiş fenoliklerin toplam fenolik madde miktarının %48-66'sını oluşturduğunu ve kültürel çeşitliliğe bağlı olmadığını; keten tohumunun serbest ve toplam fenolik içeriğine ise ekim yılının, kültür çeşitliliğinin ve daha düşük oranda bölgenin etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Oomah and Mazza (1997) Kanada'da bir firmadan aldıkları keten tohumlarının toplam fenolik madde miktarını ferrulik asit eşdeğeri üzerinden keten tohumunda 1314 mg/100 g, yağı alınmış keten tohumunda ise 1619 mg/100 g olarak bulmuşlardır.

Velioğlu et al (1998) Kanada'da yetiştirdikleri NorMan ve Linola 947 keten tohumu çeşitlerinin toplam fenolik madde içeriklerini oda sıcaklığında asidik

metanollü ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte etmişlerdir. Keten tohumlarının ortalama toplam fenolik madde miktarını 509 mg ferrulik asit/100 g olarak saptamışlardır.

Eliasson et al. (2003) İsviçre’de 2000 yılı hasadından 10 çeşit, 2001 yılı hasadından da bir önceki yıldan farklı 17 çeşit keten tohumundan elde ettikleri öğütülmüş keten tohumu örneklerini bazik hidroliz işlemine tabii tutarak fenolik bileşikleri ekstrakte etmişlerdir. 10 çeşit keten tohumunun p-kumarik asit glikozit ve ferrulik asit glikozit bileşiklerinin sırayla 1.2-6.7 ve 1.6-5.0 mg/g arasında değiştiğini; 17 çeşit tohumda p-kumarik asit glikozit ve ferrulik asit glikozit bileşiklerinin miktarlarının sırayla 2.8-8.5 ve 1.8-4.3 mg/g arasında olduğunu saptamışlardır.

Beejmohun et al. (2007) Fransa’dan temin ettikleri Barbara çeşidi keten tohumunun yağı alınmış küspesine mikrodalga sistemiyle bazik olarak ekstraksiyon işlemi uygulamışlar ve fenolik bileşikleri elde etmişlerdir. Ekstraktlardaki p-kumarik asit glikozit bileşiğini 3.7 mg/g ve ferrulik asit glikozit bileşiğini ise 4.1 mg/g olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Choo et al. (2007) Yeni Zelanda’da marketten aldıkları soğuk sıkılmış ve %2 keten tohumu küspesi içeren yedi adet keten tohumu yağının fenolik bileşiklerini hegzan ve sulu metanol kullanarak ekstrakte edip toplam fenolik madde miktarını ferrulik asit eşdeğeri olarak UV spektrofometrede 725 nm’de tayin etmişlerdir. Örneklerdeki toplam fenolik madde miktarlarının 76.8-307.3 mg/100 g arasında değiştiğini ve yağ çeşitleri arasında önemli fark bulunduğunu saptamışlardır.

Bozan and Temelli (2008) Konya’dan yerli üreticiden temin ettikleri keten tohumundan serbest fenolikleri sulu metanol ile, esterleşmiş fenolikleri de asidik metanol ile ekstrakte etmişler, gallik asit eşdeğeri üzerinden tayin yapmışlardır. 100 gram keten tohumunda serbest fenolikleri 383 mg, esterleşmiş fenolikleri 1287 mg ve toplam fenolik madde miktarını ise 1670 mg olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Keten tohumunun yapısında bulunan fenolik bileşiklerin önemli bir kısmını oluşturan diğer bir grup ise flavonoidlerdir. Flavonoidler, flavan (2-fenol-benzo-dihidro-piran) türevleridir ve fotosentez yapan hücrelerde yer alırlar. Keten

tohumunun flavonoid içeriğine kültür çeşitliliği ve çevresel faktörlerin etki ettiği belirtilmektedir (Oomah et al., 1996; Pekkarinen et al., 1999).

Oomah et al. (1996) 4 farklı keten tohumu çeşidini 4 yıl (1989-1993) boyunca 4 farklı bölgeye ekmişlerdir. Hasad edilen keten tohumlarının yağları petrol eteri ile uzaklaştırılmış ve keten tohumun yapısındaki fenolik bileşikler metanol ile ekstrakte edildikten sonra %1'lik 2-aminoetil-difenilborat bileşiği kullanılarak UV spektrofometrede 404 nm'de luteolin eşdeğeri üzerinden toplam flavonoid miktarını tayin etmişlerdir. Keten tohumunun flavonoid içeriğine kültür çeşitliliğinin ve çevrenin etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek flavonoid içeriğine kahverengi renkli Norlin çeşidinin, en düşük flavonoid içeriğine sarı renkli Omega çeşidinin sahip olduğunu; keten tohumlarının flavonoid miktarlarının 35-71 mg/100 g arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Keten tohumunda bulunan başlıca flavonoidler herbacetin diglukozit, kaempferol diglukozittir (Qiu et al., 1999).

Choo et al. (2007) Yeni Zelanda'da marketten aldıkları soğuk sıkılmış ve %2 keten tohumu küspesi içeren yedi adet keten tohumu yağının fenolik bileşiklerini hegzan ve metanol çözeltisi kullanarak ekstrakte edip toplam flavonoid miktarını luteolin eşdeğeri üzerinden UV spektrofometrede tayin etmişlerdir. Araştırmacılar keten tohumu yağlarının toplam flavonoid miktarlarının 12.7-25.6 mg/100 g arasında değiştiğini saptamışlardır.

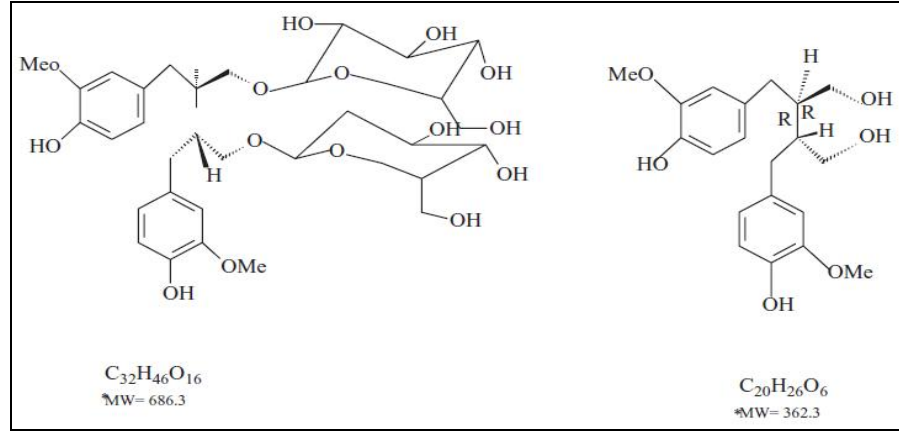
Keten tohumunu fonksiyonel gıda olarak önemli kılan ve fenolik bileşikler içerisinde yer alan diğer grup ise lignanlardır. Lignanlar izoflavonoidlerin önemli bir grubu olup, doğada bitkisel lignanlar ve memeli lignanları olarak bulunmaktadır. Keten tohumunun yapısındaki lignanlar vücuttaki östrojen hormonuna benzer yapıya sahip olan bitkisel kökenli bileşikler grubunda yer alırlar (Webb and McCullough., 2005). Keten tohumu, keten tohumu posası ve unu gibi ürünler yüksek konsantrasyonda bitki lignanları içermektedirler ve lignanca en zengin kaynaklardır. Tahıllar, tahıl kepekleri, susam, ay çekirdeği, balkabağı çekirdeği gibi birkaç yağlı tohum, meyveler ve sebzeler ise keten tohumuna göre oldukça düşük düzeylerde lignan içermektedirler (Meagher and Beecher, 2000). Lignanlar açısından zengin bazı bitkisel gıdaların lignan içerikleri Çizelge 5'de gösterilmektedir.

Çizelge 5. Lignanlar açısından zengin bazı bitkisel gıdaların lignan içerikleri (Meagher and Beecher, 2000)

Gıda kaynağı	Lignan miktarı (µg/100 g)	Gıda kaynağı	Lignan miktarı (µg/100 g)
Keten tohumu	370 000 µg	Havuç	478µg
Susam tohumu	2900 µg	Sarımsak	382.6µg
Ay çekirdeği	609.5µg	Soğan	91.0µg
Buğday	8.1 µg	Yeşil biber	124.0µg
Buğday kepeği	110.1µg	Patates	16.0µg
Arpa	58µg	Domates	58.1µg
Yulaf	13.7µg	Yaban mersini	1510µg
Yulaf kepeği	178.8µg	Çilek	1578µg
Pirinç	112-232µg	Portakal	74.6µg
Lahanagiller	185 - 2321 µg	Siyah çay	2787µg
Brokoli	437.3µg	Yeşil çay	2646µg
Kırmızı pancar	99.5µg	Kahve (instant)	716µg

Memeli lignanlarının insan vücudunda üretimi hem bağırsaktaki aktif flora varlığına hem de uygun lignan kaynağının diyetle alımına bağlıdır. Keten tohumunda bulunan lignanlar, memeli lignanları olarak bilinen ve antikarsinojenik aktiviteye sahip enterodiol ve enterolakton bileşiklerinin öncüsüdürler (Degenhardt et al., 2002; Kamal-Eldin et al., 2001). Keten tohumunda matairesinol (Liggins et al., 2000), SECO (sekoizolarikiresinol), izolarikiresinol (Meagher et al., 1999), pinoresinol (Meagher et al., 1999), ve larikiresinol (Sicilia et al., 2003) lignanları bulunmaktadır,

Bitkilerde bulunan lignanlar serbest formda bulunabildikleri gibi bir veya birden fazla şekere bağlanarak glikozid formunda da bulunabilmektedirler. Keten tohumunda bulunan SECO lignanının glikozit formu SDG lignan bileşiği (Şekil 1) şeklinde olup bu bileşik, 3-hidroksi-3-metil glutarik asidin ester bağlarıyla oligomerlere bağlanmasıyla meydana gelmektedir (Struijs et al, 2007; Milder, 2007). Keten tohumun yapısındaki lignan kompleksi ağırlık olarak %34–38 sekoisolarikiresinol diglukosid (SDG), % 15–21 sinnamik asit glukosid ve %9,6–11,0 hidroksimetilglutarik asit içermektedir (Prasad et al., 2000; Kamal-Eldin et al., 2001). Şekil 1’de SDG ve SECO bileşiklerinin kimyasal yapısı görülmektedir.



Şekil 1. SDG ve SECO bileşiklerinin kimyasal yapısı, MW: molekül ağırlığı (Tour'e and Xueming 2010)

Keten tohumunun yapısındaki SDG lignan tayini genellikle lignan kompleks bileşiğinin bazik hidroliz işlemine tabi tutularak açığa çıkan SDG lignan bileşiğinin kromatografik olarak saptanması prensibine dayanmaktadır. Bazı çalışmalarda ise asidik hidroliz işlemi uygulanarak keten tohumunun yapısındaki SDG lignan bileşiği aglikon formu olan SECO bileşiğine parçalanmakta ve SDG lignan miktarı SECO eşdeğeri üzerinden tayin edilmektedir.

Keten tohumunun SDG lignan içeriği kültür çeşitliliğine, hasad yılına, hasad yerine ve uygulanan analiz yöntemine göre değişkenlik gösterebilmektedir (Westcott and Muir, 1996; Thompson et al., 1997; Meagher et al., 1999). Yağı alınmış keten tohumu küspesinde SDG lignan miktarı 11.7–24.1 mg/g olarak değişmektedir ve bu miktar baklagiller, tahıllar, meyve sebzelerde saptanan miktarlardan oldukça yüksek düzeylerde (Wiesenborn et al., 2003).

Madhusudhan et al. (2000) Amerika Birleşik Devlet'inin North Dakota bölgesinde 1998 yılında hasad edilmiş Neche ve Omega keten tohumu çeşitlerini öğütüp, yağını uzaklaştırdıktan sonra %70 metanol/su çözeltisiyle ekstraksiyon işlemine tabii tutmuşlar, NaOH ile bazik hidroliz işleminden sonra da HPLC-DAD cihazında SDG lignan bileşiğini teşhis etmişlerdir. Neche ve Omega keten tohumu çeşitlerinde SDG lignan miktarını sırasıyla 12.9 ve 14.3 mg/g olarak saptamışlardır.

Degenhardt et al. (2002) öğütülmüş ve yağı alınmış keten tohumunun %70 metanol/su ekstraksiyonunu takiben bazik hidroliz işlemi sonrasında örnekteki SDG lignan miktarını HPLC-DAD cihazında tayin etmişlerdir. Araştırmacılar keten tohumunun SDG lignan miktarını 5.5 mg/g olarak saptamışlar.

Eliasson et al. (2003) İsviçre’de 2000 yılı hasadından 10 çeşit, 2001 yılı hasadından da bir önceki yıldan farklı 17 çeşit keten tohumundan elde ettikleri öğütülmüş keten tohumu küspesinde %50 etanol/dioksan çözeltisi ile fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu işlemi ve bazik hidroliz uygulamışlar ve keten tohumlarının SDG lignan içeriğini HPLC-DAD cihazında tayin etmişlerdir. Araştırmacılar 2000 yılına ait 10 çeşit keten tohumunun SDG lignan içeriğinin 13.3-25.9 mg/g arasında değiştiğini; 2001 yılına ait 17 çeşit tohumda ise SDG lignan miktarının 11.9-19.8 mg/g arasında olduğunu bildirmişlerdir. Çeşitler arasında fark önemli bulunmuştur.

Beejmohun et al. (2007) Fransa’dan temin ettikleri Barbara keten tohumunun preslenmiş kekini %70 metanol/su çözeltisiyle muamele ederek fenolik bileşikleri ekstrakte etmişler, sodyum hidroksit ile bazik hidroliz işlemi uyguladıktan sonra SDG lignan bileşiğini HPLC-DAD cihazında teşhis etmişlerdir. Preslenmiş keten tohumu kekinde SDG lignan bileşiğini 16.1 mg/g olarak saptamışlardır.

1.2. Tohum Filizleri

Filizlenme tohumda bulunan embriyonun uygun şartlar bulunca gelişerek ana bitkiye benzer bitkiyi vermek üzere tohumdan çıkarak serbest hale geçmesidir. Filizlenme tohumda büyümenin başlaması ve yedek besin maddelerinin embriyo büyümesinde kullanılmak üzere hareketli hale geçmesi olaylarını içine alan birçok karışık biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikler serisinden ibarettir. Filizlenme işlemi boyunca;

- Suyun emilmesi,
- Enzim ve solunum faaliyeti,
- Yedek besin maddelerinin (yağ, protein ve karbonhidrat) basit ve çözünebilir hale geçmesi,
- Nükleik asit ve protein sentezi,
- Bunların nakli,
- Özümlenmesi,
- Hücre farklılaşması
- Büyüme

meydana gelmektedir. Filizlenme ilerledikçe tohumdan çıkan filizin yapısı kısa zamanda belli olmakta ve üzerinde bir adet çenek yaprağı (kotiledon) taşıyan bir

hipokotil kök ekseninden ibaret olan embriyo yenilebilir tohum filizi olarak adlandırılmaktadır (Nonogaki et al., 2010; Wanasandura et al., 1999a).

Yenilebilir tohum filizleri tohumların belli bir süre suda bekletilmesi, yıkanıp süzülerek uygun nem ve sıcaklık koşullarında bekletilerek filizlendirilmesi işlemi ile elde edilmektedir. Filizlendirme işlemi yenilebilen tohumların besin öğelerinde önemli düzeylerde değişim oluşturmakta ve bu değişimi sıcaklık, süre ve aydınlatma şekli gibi filizlendirme koşulları ile tohum cinsi ve kültürel çeşitlilik de etkilemektedir. Taze olarak tüketilecek filizler için maksimum muhafaza süresi en iyi depolama koşullarında 0°C’de 7-9 gün, 2.5°C’de 5 gün, 10°C’de 2 gün olarak belirtilmektedir (Schrader, 2002; Suslow and Cantwell, 2002).

Bir çok filizin olgunlaşmış sebzelerine göre daha yüksek miktarlarda C vitamini ile polifenoller içerdiği ve daha yüksek oranda serbest radikallerden koruyucu özelliğe sahip olduğu belirtilmektedir (Moriyama and Oba, 2004).

Wanasundara et al. (1999a) keten tohumu yağının filizlenme süresince değişimini araştırmak amacıyla tohumları ışık altında 22°C’de %78 nemde 2, 4, 6 ve 8 gün süreyle filizlendirmişlerdir. Tohumların toplam yağ içeriğinin suda bekletilmiş tohumda %31.9 değerinde iken 8 günlük filizlerde toplam yağ içeriğinin %8,6 olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar tohumda yüksek oranda bulunan α -linolenik, linoleik ve oleik yağ asitlerinin filizlenme süresince filizlerde de yüksek oranda bulunduğunu, filizlerin linoleik ve oleik yağ asitlerinin 6. günden itibaren çok az artarken, α -linolenik asitin 4. günde ve serbest yağ asitlerinin 6. günde azalmaya başladığını belirtmişlerdir. Filizlerin 8. günün sonunda çoklu doymamış yağ asitleri (%77) açısından zengin olduğu, %12 tekli doymamış yağ asitleri ve %10 doymuş yağ asitleri içerdiği saptanmıştır.

Wanasundara et al. (1999b) ise keten tohumunun azotlu bileşiklerinin filizlenme süresince değişimini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada aynı şartlarda elde edilen filizleri kullanmışlardır. Filizlenme süresince toplam azotlu bileşiklerin miktarında az bir düşme gözlendiğini, protein olmayan azotlu bileşiklerin miktarının %9’dan %35’e yükseldiğini; suda çözünen proteinlerin fraksiyonunun artarken, tuzda çözünen proteinlerin fraksiyonunun ise azaldığını saptamışlardır. Söz konusu araştırmada 8 günlük filizlendirme süresinin sonunda keten tohumunda bulunan siyanojenik glikozitlerden linustatin ve neolinustatin bileşiklerinin sırasıyla %40 ve %70 oranında düştüğü belirlenmiştir.

Plaz and ark. (2003) özel bir firmadan hazır olarak temin ettikleri yonca, buğday ve soya tohumları ile bu tohumların filizlerini vitamin (A, B1, B2, B6, C ve E), mineral (Fe, Mg, Ca, K, Mn, Na, Cu ve Zn) ve fitoöstrojen (genistein ve daidzein) içerikleri açısından incelemişlerdir. Araştırmada yonca tohumlarının filizlenme ile A ve C vitaminlerinde sırasıyla 1250 ve 10 kat artış olduğu, soya tohumlarının filizlerinin genistein ve daidzein fitoöstrojen içeriklerinde de önemli artışların olduğu (sırasıyla 3 ve 10 kat) belirtilmiştir.

Karabuğday filizlerinin besin bileşenlerinin araştırıldığı çalışmada, karabuğday tohumları karanlıkta 25°C'de 1-8 gün boyunca filizlendirilmiş ve 1 gün arayla örnek alınmıştır. Filizlenme süresi arttıkça filizlerin monosakkarit içerikleri artarken disakkarit, trisakkarit ve tetrasakkarit içeriklerinde azalma görüldüğü saptanmıştır. Filizlerin askorbik asit içeriklerinin de filizlenme süresiyle artış gösterip 7. günde en yüksek seviyeye çıktığı ve sonra düşüşe geçtiği görülmüştür. Karabuğday tohumlarının ve filizlerinin yağ asidi kompozisyonu incelendiğinde; filizlenme işlemi ile ve filizlenme süresince tohumların stearik ve oleik asit içeriklerinin azaldığı, linoleik ve α -linolenik asit içeriklerinin arttığı bildirilmiş olup filizlerde linoleik asitin %51.10 oranıyla en yüksek düzeyde bulunan yağ asidi olduğu, bunu %18.90 ile α -linolenik asidin ve %15.40 oranıyla da oleik asidin takip ettiği görülmüştür (Kim et al., 2004a).

Kim et al. (2004b) yedi çeşit soya tohumunu karanlıkta 25°C'de 5 gün filizlendirerek sarı soya filizlerini; 1. gün karanlıkta, 2. ve 3. gün ışık altında yeşil kutuların içinde, 4. ve 5. gün sarı kutuların içinde bekleterek yeşil soya filizlerini elde etmişlerdir ve farklı filizlendirme koşullarında elde ettikleri yeşil ve sarı soya filizleri ile soya tohumlarında fenolik bileşikleri ve izoflavonoidleri araştırmışlardır. Araştırmacılar soya tohumlarının toplam fenolik madde (6.67-72.33 $\mu\text{g/g}$) ve izoflavonoid içeriklerinin çeşitler arasında önemli düzeyde değişkenlik gösterdiğini, bu değişkenliğin sarı ve yeşil filizlerin toplam fenolik madde ve izoflavonoid içeriklerinde de görüldüğünü, yeşil ve sarı soya filizlerinin izoflavonoid içeriklerinin tohumdan sırasıyla yaklaşık 100 ve 50 kat daha yüksek olduğunu ve yeşil soya filizlerinin izoflavonoid miktarının sarı soya filizlerinden yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğunu saptanmışlardır. Araştırmada sarı soya filizlerinin toplam fenolik madde miktarı 9.88 ile 47.71 $\mu\text{g/g}$ arasında değişirken, yeşil soya filizlerinde bu değişim 29.21-79.70 $\mu\text{g/g}$ olarak belirtilmiştir. Ayrıca çalışma sonuçları doğrultusunda soya filizlerinin renkli ışık altında üretilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Zieliński et al. (2005) turpgiller familyası içerisinde seçilen küçük turp, turp, kolza tohumları ve beyaz hardal tohumlarını karanlıkta 25°C’de ve %95 nemde filizlendirmiş ve 4. günün sonunda yemeye hazır filizler olarak hasad etmişlerdir. Söz konusu tohumların ve filizlerinin B₁ ve B₂ vitaminleri ile diyet lifi ve mineral içeriklerinin karşılaştırıldığı bu çalışmada tohumların yemeye hazır filizlerinde B₂ vitamini içeriklerinde 3 kat; Ca, Mg, Cu and Zn içeriklerinde de sırasıyla %12, 14, 25 ve 45 oranında artış olduğu görülmüştür.

Khalil et al. (2007) Kabuli ve Desi çeşidi nohutlarının filizlerinin kalite karakteristiklerini karşılaştırdıkları çalışmada, nohutları karanlıkta, oda sıcaklığında 24, 48, 72 ve 96 saat filizlendirmişlerdir. Araştırmada filizlendirme işleminin nohutların nem, protein, askorbik asit ve toplam yağ içeriklerinde artış sağladığı, nohutların toplam yağ içeriğinin %5’den 96 saatlik filizlerde %7.7’ye çıktığı ve bu artışta nohut çeşidinin önemli derece etkili olduğu (p<0,01). görülmüştür. Söz konusu araştırmada nohutların fitik asit içeriğinin filizlenme işlemi ile önemli düzeyde azaldığı ve bu azalmanın Kabuli nohutunda %73 iken Desi nohutunda %32 seviyesinde olduğu bildirilmiştir. Araştırmada ayrıca filizlendirme süresinin filizlerin toplam yağ içeriğini önemli derecede etkilediği (p<0,01), Kabuli filizlerinin toplam yağ içeriğinde, Desi filizlerine göre daha fazla artış olduğu; protein sindirilebilirliği ve protein çözünürlüğünün de önemli düzeyde arttığı saptanmıştır. Genel değerlendirme sonucunda Kabuli çeşidi kalite karakteristikleri açısından filizlendirme amacıyla daha uygun bir nohut çeşidi olarak belirtilmiştir. Bu çeşidin 96 saatin sonunda askorbik asit içeriği daha yüksek olup fitik asit içeriği daha düşük ve protein sindirilebilirliğinin de oldukça iyi düzeyde olduğu belirtilmiştir.

Khattak et al. (2007a) nohut filizlerinin polifenol ve fitik asit içeriğine filizlendirme tekniklerinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, nohutları 28°C’de karanlıkta, florasan, sarı, mavi, yeşil, kırmızı ve gama ışığı altında 24, 48, 72, 96 ve 120 saat boyunca filizlendirmişlerdir. Filizlenme süresinin ve ışık çeşidinin asidik metanolla, suyla ve metanolla ekstrakte edilebilen polifenollerin miktarının önemli düzeyde etkilediğini görmüşlerdir. Araştırmacılar asidik metanolla ekstrakte edilen polifenollerin miktarını filizlendirme işlemi ile arttığını ancak filizlendirme süresince azalma ve artma göstererek 48 saatte florasan ışık altında en yüksek değere ulaştığını, suyla ekstrakte edilen polifenollerin miktarının filizlendirme işlemi ile azaldığını ve filizlendirme süresince azalma ve artma göstererek 72 saatte gama ışını altında en yüksek değere ulaştığını, metanolla ekstrakte edilen polifenollerin miktarının filizlenme ile azaldığını ve filizlendirme sonrası

nohutların fitik asit içeriğinin ise 48 saatte mavi ve kırmızı ışık altında en düşük seviyeye düştüğünü bildirmişlerdir.

Aynı araştırmacılar nohut filizlerinde askorbik asit içeriğine ve filiz verimine filizlendirme tekniklerinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, nohutların askorbik asit içeriğine ve filiz verimine filizlendirme süresinin ve ışıklandırma çeşidinin önemli etkisinin olduğunu, yeşil ışık altında nohutların askorbik asit seviyesinde önemli bir artış olduğunu ve 96 saatin sonunda filizlerin askorbik asit içeriğinin en yüksek düzeye çıktığını saptamışlardır. Araştırmacılar elde edilen filizlerin veriminin ise karanlıkta, florasan ve gama ışık altında daha yüksek olduğunu, 120 saatin sonunda gama ışığında en yüksek seviyeye çıktığını görmüşlerdir (Khattak et al., 2007b)

Lee et al. (2007) 17 çeşit soya tohumunu 25°C’de 5 gün süre ile karanlıkta ve ışık altında çimlendirerek sarı ve yeşil soya filizleri üretmişler ve bu filizlerin kotiledon, hipokotil ve köklerindeki izoflavon içeriklerini karşılaştırmışlardır. Söz konusu araştırmacılar yeşil ve sarı soya filizlerinin toplam izoflavonoid miktarları arasında önemli bir fark olmadığını fakat, filizlerin 3 farklı kısmındaki toplam izoflavonoid miktarları arasındaki farkın önemli olduğunu; sarı ve yeşil filizlerin köklerinin en yüksek miktarda izoflavonoid içerdiğini bunu sırayla kotiledon yaprakların ve hipokotilin izlediğini belirtmişler, ayrıca sarı ve yeşil filizlerin kotiledon yapraklarındaki genistein ve daidzein içeriğinin toplam izoflavonoid miktarının sırayla %67 ve %28’den daha fazlasını, hipokotillerdeki toplam daidzein içeriğinin ise toplam izoflavonların %45’inden daha fazlasını oluşturduğunu saptamışlardır.

Doblado et al. (2007) börülce tohumlarının ve filizlerinin C vitamini ve antioksidan aktivite değerlerini araştırdıkları çalışmalarında; tohumları 20°C’de karanlıkta 6 gün boyunca filizlendirip 4. ve 6. günlerde örnekler almışlardır. Araştırmada börülce tohumunda C vitamini saptanamamış olup filizlenme işlemi ve filizlenme süresince filizlerin C vitamini içeriğinin arttığı (58–67%), tohumun antioksidan aktivitesinin ise filizlenme işlemi ile artarak 6. günde en yüksek düzeye ulaştığı belirtilmiştir. Araştırmacılar börülce tohumlarının filizlendirilmesi işleminin tohumun C vitamini içeriğini ve antioksidan aktivite değerini artırmak açısından iyi bir teknik olduğunu vurgulamışlardır.

Bibi et al. (2008) filizlendirme süresi ve kullanılan ışık çeşidi ile nohutun kimyasal bileşiminin değişimini araştırmak amacıyla nohutlar filizlendirme

dolaplarında 28°C’de karanlıkta, florasana, sarı, mavi, yeşil, kırmızı ve gama ışıkları altında 0, 24, 48, 72 ve 96 saat filizlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, filizlendirme süresi ve kullanılan ışık çeşidinin nohut filizlerinin nem, protein, yağ, lif ve kül içeriklerini önemli düzeyde etkilediği ($p<0,01$) saptanmıştır. Araştırmada filizlendirme işlemi ile nohutun nem, protein, kül ve yağ içerikleri artarken lif içeriklerinin azaldığı ve filizlenme süresince ise kırmızı, yeşil, mavi ve sarı ışıklar altında filizlerin protein ve lif içeriklerinin; gama ışığı altında kül ve yağ içeriklerinin; karanlıkta ve floresan ışık altında ise nem içeriklerinin arttığı görülmüş olup en yüksek yağ içeriği gama ışığı altında 48 saatte elde edilen filizlerde saptanmıştır.

Khattak et al. (2008) nohut filizlerinde β -karoten içeriği, protein sindirilebilirliği ve protein çözünürlüğü üzerine filizlendirme süresinin ve kullanılan ışık çeşidinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, nohutları 28°C’de karanlıkta, florasana, sarı, mavi, yeşil, kırmızı ve gama ışığı altında 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca filizlendirmişlerdir. Araştırmacılar filizlendirme süresinin ve kullanılan ışık çeşidinin filizlerin β -karoten içeriğini, protein sindirilebilirliğini ve protein çözünürlüğünü önemli düzeyde etkilediğini; en yüksek β -karoten içeriğine sahip filizlerin sarı ışık altında 72 saat sonunda elde edildiğini, en düşük β -karoten içeriğinin 120 saatin sonunda mavi ışık altındaki filizlerde saptandığını belirtmişlerdir. Araştırmada protein çözünürlüğünün de 120 saatin sonunda gama ve yeşil ışık altında en yüksek düzeyde, filizlerin protein sindirilebilirliğinin ise 96 saatin sonunda gama ışığı altında en yüksek seviyede olduğu bildirilmektedir.

Kim et al. (2008) common ve tartary karabuğday çeşitlerinin filizlerinin fenolik bileşen içeriğini karşılaştırmak amacıyla tohumları karanlıkta 25°C’de %60 nemde 6-10 gün arasında filizlendirmişlerdir. Araştırmada common çeşidi karabuğday tohumunda klorojenik asit, orientin, isoorientin viteksin, isoviteksin ve rutin fenolik bileşikler tespit edilememiş veya çok düşük düzeyde iken 6-10 gün süre boyunca elde edilen filizlerin yenilebilen kısımlarında söz konusu fenolik bileşiklerin önemli düzeyde arttığı görülmüştür. Araştırmacılar common ve tartary karabuğday çeşitlerinin filizlerinde söz konusu fenolik bileşiklerin toplamının birbirine yakın olmakla birlikte tartary çeşidinin filizlerinin fenolik bileşenlerinin %90’ını rutin bileşiğinin oluşturduğunu, common çeşidinin filizlerinde ise bu oranın %20 olduğunu ve Tartary karabuğday çeşidinin filizlerinin rutin içeriğinin 6. gün sonunda en yüksek düzeye ulaştığını belirtmişlerdir.

Dueñas et al. (2009) acı bakla tohumunun fenolik bileşen içeriğine ve antioksidan aktivitesine filizlendirme işleminin etkisini incelemek amacı ile acı bakla tohumlarını 20°C’de karanlıkta 2, 3, 4, 5, 6 ve 9 gün süreyle filizlendirmişlerdir. Söz konusu araştırmacılar tohumların toplam fenolik madde miktarının filizlendirme işlemi ile 10.60 mg gallik asit/g değerinden 2. günde 13.67 mg gallik asit/g değerine çıktığını, filizlenme süresince ise artarak 9. günde en yüksek düzey olan 24.37 mg gallik asit/g düzeyine ulaştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca tohumların antioksidan aktivitesinin filizlenme ile artış gösterdiğini ve filizlerin 9. günde flavon, izoflavon ve dihidroflavonol içeriklerinin tohuma göre oldukça yüksek bulunduğunu saptamışlardır.

Hahm et al. (2009) susamın kimyasal kompozisyonu üzerine filizlendirmenin etkisini araştırdıkları çalışmada; susamları karanlıkta 35°C’de %100 nemde 1, 2, 3 ve 4 gün süreyle filizlendirmişlerdir. Araştırmada filizlenme işlemi ile susamların nem, fosfor, sodyum, kalsiyum, α - tokoferol ve toplam tokoferol düzeyleri artarken toplam yağ, palmitik asit, potasyum ve demir içeriklerinin azaldığı, tohumların protein, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, magnezyum ve çinko düzeylerinin ise filizlenme işlemi ile filizlenme süresince değişmediği; filizlerin 4. günde oleik ve linoleik asit içeriklerinin sırayla %40,98 ve %42.87 olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar tohumların toplam yağ içeriğinin %52’den 4. günün sonunda elde edilen filizlerde %29’a düştüğünü, toplam tokoferol içeriklerinin ise 4. günde en yüksek düzeye ulaştığını belirtmişlerdir

Paško et al. (2009) horozibiği (*Amaranthus cruentus*) ve quinoa (*Chenopodium quinoa*) tohumlarında ve filizlerinde antosiyaninler, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite üzerine çalışmışlardır. Bu amaçla tohumlar karanlıkta ve ışıktaki 20°C’de 7 gün süreyle filizlendirilmiş, filizler 4, 6 ve 7. günlerde hasad edilmiştir. Araştırmacılar filizlerin toplam fenolik madde miktarının ve antioksidan aktivitesinin tohumlardan daha yüksek olduğunu, ışıktaki elde edilen filizlerin toplam fenolik madde ve antosiyanin miktarları ile antioksidan aktivite düzeylerinin karanlıkta elde edilen filizlerden daha yüksek olduğunu ve quinoa filizlerinin toplam fenolik madde miktarının (3.7 mg gallik asit/g) horozibiği filizlerinden daha yüksek olduğunu ve aralarındaki farkın önemli bulunduğunu ($p<0,01$) saptamışlardır. Araştırmada horozibiği ve quinoa filizleri için en yüksek toplam fenolik madde miktarının ise aydınlıkta sırayla 4. günde 2.9 mg gallik asit/g ve 6. günde 3.9 mg gallik asit/g olarak belirtilmiştir.

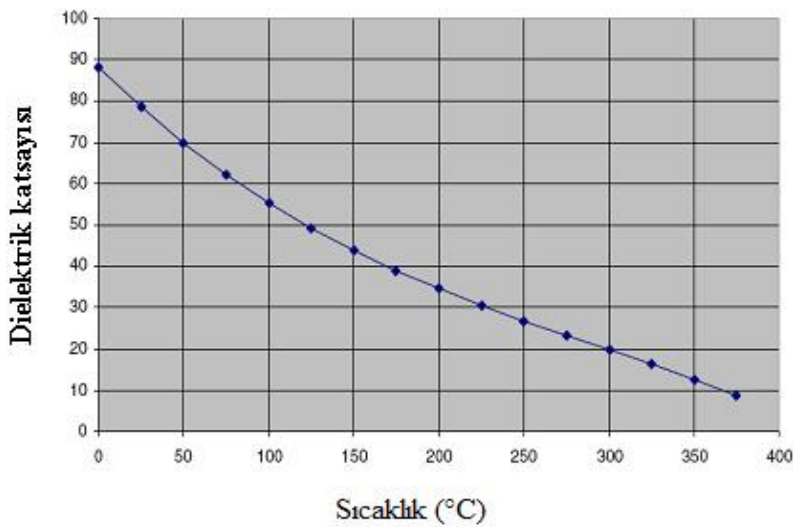
Alvarez-Jubete et al. (2010) horozibiği, quinoa, karabuğday ve buğday tohumlarının filizlenme işlemi ile toplam fenolik madde miktarını ve antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Karabuğday ve buğday tohumları 18°C’de sırayla 96 ve 110 saat; horozibiği ve quinoa tohumları 10°C’de sırayla 98 ve 82 saat filizlendirilmiştir. Araştırmacılar tohumların toplam fenolik madde miktarları arasında önemli bir farkın olduğunu ve en yüksek karabuğday tohumunda (323.4 mg gallik asit/100 g) bulunduğunu ve bunu sırayla quinoa, buğday ve horozibiği tohumlarının izlediğini saptamışlardır. Araştırmada tohumların toplam fenolik içeriğinin ve antioksidan aktivitesinin filizlenme işlemiyle arttığı ve toplam fenolik madde miktarının en yüksek karabuğday filizinde (670 mg gallik asit/100 g), ikinci olarak ise quinoa filizinde (147 mg gallik asit/100 g) bulunduğu görülmüştür. Quinoa ve karabuğday tohumlarının ve filizlerinin fenolik bileşikler açısından zengin bir kaynak olduğu vurgulanmıştır.

Pérez-Balibrea et al. (2011) ticari olarak satılan brokoli kültürlerinin tohumlarının (*B. oleracea* L. var., *italica* cv. *Nubia* ve cv. *Marathon*) ve filizlerinin fitokimyasal kalitesine genotipik etkileri araştırmışlardır. Araştırmada tohumlar gündüz 16 saat 25°C’de %60 nemde, gece 8 saat 20°C’de %80 nemde 14 gün boyunca filizlendirilmiş ve 3., 7. ve 14. günlerde örnekler alınmıştır. 3 çeşit brokoli kültürünün tohumlarında ve filizlerinde filizlenme süresince C vitamini, fenolik asitler, flavonoidler ve glukozinolat içeriği ile antioksidan aktivite düzeyleri incelenmiştir. Araştırmacılar tohumlarda C vitamininin saptanamadığını fakat filizlenme ile ve filizlenme süresince C vitamini miktarının arttığını ve kültürel çeşitliliğe göre önemli düzeyde ($p<0,05$) değiştiğini belirtmişlerdir. Araştırmada farklı brokoli kültürlerinin tohumlarının ve filizlerinin fenolik bileşikler ve glukozinolat miktarları ile antioksidan aktivite değerleri arasında da farkın önemli ($p<0,05$) bulunduğu saptanmıştır. Araştırmacılar brokoli tohumlarının filizlenme ile flavonoid içeriğinin 2-3 kat, glukozinolat içeriğinin yaklaşık 2 kat azaldığını; fenolik asit içeriklerinin 2-6 kat arttığını filizlenme süresince ise filizlerin fenolik asit, flavonoid ve glukozinolat içeriklerinin azaldığını belirtmişlerdir. Araştırmada tohumların antioksidan aktivite değerlerinin de filizlenme ile ve filizlenme süresince 7. güne kadar düştüğü ve brokoli kültürleri içerisinde cv. *Viola* tohumu ve filizlerinin fitokimyasal kalitesinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir.

1.3. Gıdaların Yapısındaki Biyoaktif Bileşiklerin Kritik Altı Su Ekstraksiyonu (Subcritical Water Extraction)

Bitkisel kaynaklı çeşitli biyoaktif bileşiklerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin yapılan çalışmalarla ortaya konulmasıyla birlikte bu bileşiklerin bitkisel materyallerden ekstraksiyonu önemli bir endüstriyel işlem haline gelmiştir. Başlangıçta ekstraksiyon işleminde organik çözügenler kullanılmıştır. Organik çözügenler çevreye ve insan sağlığına zarar vermektedirler ve sağlığa faydalı bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun değildirler. Gıdalardaki biyoaktif bileşiklerin gıda desteği olarak kullanımına toplumun ilgisinin artması, fonksiyonel ürünlerin üretiminin ve buna bağlı olarak yasal düzenlemelerin de artması nedeniyle ekstraksiyon metodlarında daha sağlıklı alternatif yollarla ilgili araştırmalar başlamıştır (Luque de et al., 1999). Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden biri de kritik altı su ekstraksiyonu yöntemidir.

Kritik altı su ekstraksiyonu yeterli derecede yüksek basıncın uygulanarak ve sıcaklığın artırılmasıyla suyun dielektrik katsayısının yani polaritesinin düşürülmesi ve suyun sıvı fazda tutulabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Su oda sıcaklığında çok polar bir çözügendir ve dielektrik katsayısı 80'e yakındır, 250°C'ye kadar ısıtıldığı zaman ise suyun dielektrik katsayısı 27'e yaklaşmaktadır (Şekil 2) ve bu değer etanolün dielektrik katsayısına yakındır. Çalışma sıcaklıkları suyun kritik değeri olan 374'nin altında olup genellikle 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklar kullanılmaktadır (Yang et al., 1998; Herrero et al., 2006).



Şekil 2. Sıcaklığa bağlı olarak suyun dielektrik katsayısı (Herrero et al., 2006)

Kritik altı su ekstraksiyonu işlemi pilot tipi düzeneklerle yapılabildiği gibi basınçlı çözgen ekstraktörü cihazlarında da yapılabilmektedir. Kritik altı su ekstraksiyonu işleminde ekstraksiyon üzerine etkin olan başlıca parametreler; materyal şekli, örnek miktarı, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, çözücü miktarı ve basınç olarak belirtilmektedir. En etkin faktörler sıcaklık ve süre olup, basınç faktörü ekstraksiyon etkinliği üzerine düşük düzeyde etki etmekte ve basınç temel olarak ekstraksiyon çözücüsünü sıvı halde tutmaya yaramaktadır. Gıdalardan biyoaktif bileşiklerin pilot tipi düzeneklerle kritik altı su ile ekstrakte edilmesi ile ilgili bazı çalışmalara aşağıda yer verilmiştir;

Mercanköşk yapraklarından esansiyel yağların ekstraksiyonu amacıyla kritik altı su ekstraksiyonu ve su destilasyonu işlemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; 0,4 g öğütülmüş yaprağa 50 bar basınç, 150°C sıcaklık, 2 ml/dak akış hızında 15 dak. kritik altı su ekstraksiyonu uygulanırken; 140 g öğütülmüş yaprak 1000 ml su ile 3 saat destilasyon işlemine tabii tutulmuştur. Çalışma sonunda, kritik altı su ekstraksiyonu işlemi ile 15 dak. gibi kısa bir sürede daha yüksek miktarda esansiyel yağ elde edilebildiği ve söz konusu ekstraksiyonun veriminin su destilasyonundan 5.5 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir (Jime'nez-Carmona et al., 1999).

Başka bir çalışmada da kekik yağının ekstraksiyonu amacıyla kritik altı su ekstraksiyonu ve su destilasyonu işlemleri karşılaştırılmıştır. 1.8 g öğütülmüş kekiğe 2.0 MPa basınç, 125°C sıcaklık, 1 ml/dak akış hızında 24 dak. kritik altı su ekstraksiyonu işlemi ve 30 g öğütülmüş kekiğe ise 500 ml su ile 3 saat destilasyon işlemi uygulanmıştır. Çalışmadan elde edilen veriler sonucunda, kritik altı su ekstraksiyonu işleminin kekik esansiyel yağlarının eldesinde su destilasyonundan daha hızlı, daha ucuz ve daha etkili bir yöntem olduğu, ayrıca kekik yağında bulunan 11 major bileşiğin 8'inin kritik altı su ekstraksiyonu ile daha yüksek verimde elde edildiği saptanmıştır. Söz konusu işlemin gıda endüstrisinde bitkilerin esansiyel yağlarını elde etmede büyük ilgi göreceği belirtilmiştir (Ayala and Kastro 2001).

Kubátová et al. (2001) kava (*Piper methysticum*) kökünden laktonların kritik altı su ekstraksiyonu işlemini; Soxhlet aparatında suyla ekstraksiyon, suda kaynatma ve ultrasonik banyoda asetonla ekstraksiyon işlemleri ile karşılaştırmışlardır. Bu amaçla, 0.5 g öğütülmüş kavaya 60 bar basınç ve 100, 125, 150, 175, 200°C sıcaklıklar uygulanarak, 1 ml/dak. akış hızında 10-120 dak. kritik altı su ekstraksiyonu uygulanırken, aynı zamanda 0.5 gram öğütülmüş kava

150 ml su ile 6 saat Soxhlet aparatında tutularak, 100 ml suda 2 saat kaynatılarak ve ultrasonik banyoda 15 ml aseton içinde 18 saat bekletilerek de ekstraksiyon işlemleri yapılmıştır. Çalışma sonunda, 175°C sıcaklıkta 20 dak. kritik altı su ekstraksiyonu işleminin kava kökünden laktonların elde edilmesi için yeterli olduğu görülmüş olup, veriminin Soxhlet aparatındaki ekstraksiyon ve suda kaynatma işlemlerinden daha yüksek olduğu, ultrasonik banyoda asetonla ekstraksiyonundan ise daha düşük olduğu görülmüştür.

Biberiye yapraklarından seçilmiş antioksidan bileşiklerin elde edilmesi amacıyla 1 g öğütülmüş biberiye örneği 60 bar basınçta, 100, 150 ve 200°C sıcaklıklarda, 1 ml/dak. akış hızında 15 dak. süre ile kritik altı su ekstraksiyonu işlemlerine tabii tutulmuştur. Çalışmada kritik altı su ekstraksiyonu işleminin, biberiyede aktif olarak bulunan karnosol, rosmanol, karnosik asit, metil karnosat bileşiklerine ve kirsimaritin ve genkwanin gibi bazı flavonoidlere karşı seçiciliğin yüksek olduğu ve ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin de çok yüksek olduğu saptanmıştır (Ibanez et al., 2003).

Özel et al. (2003) kara kekik (*Thymbra spicata* L.) yapraklarından esansiyel yağları kritik altı su kullanarak ekstrakte etmişlerdir. Bu amaçla 20, 60, ve 90 bar basınç değerlerinde, 100, 125, 150 ve 175°C sıcaklıklarda, 1, 2, ve 3 ml/dak. akış hızlarında denemeler gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen veriler doğrultusunda en yüksek ekstraksiyon verimi, 60 barda, 150°C’de, 2 ml/dak. akış hızında 30 dak. ekstraksiyon süresinde elde edilmiştir. Kritik altı su ekstraksiyonunun konvensiyonel esansiyel yağ üretim tekniklerinden daha hızlı ve düşük maliyetli ve çevre dostu bir teknik olduğu belirtilmiştir.

Kurutulmuş noni (*Morinda citrifolia*) bitkisinin köklerinden antirokinon bileşiğinin ekstraksiyonu amacıyla kritik altı su ekstraksiyonu işlemi kullanılmış; ekstraksiyon verimine ve hızına kullanılan suyun sıcaklığının (110, 170, 220°C) ve akış hızının (2, 4, and 6 ml/dak.) etkisi araştırılmıştır. 1 g öğütülmüş noni kökü 7 MPa basınçta 0-175 dak. süreler arasında farklı ekstraksiyon koşullarında kritik altı su ile muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek ekstraksiyon veriminin 220°C’de 4 ml/dak. akış hızında yaklaşık 43,6 mg/g olduğu belirtilmiş olup alizarin bileşiğinin çözünürlüğünün sıcaklıkla arttığı bulunmuştur (Shotipruk et al., 2004).

Cacae and Mazza (2006) keten tohumundan proteinlerin, lignan, ferrulik asit glukozit ve p-kumarik asit glukozit bileşiklerinin ekstraksiyonu işlemini gerçekleştirmek amacıyla; 2 g tane keten tohumu örneklerine 5.2 MPa basınçta, 100, 120, 140 ve 160°C sıcaklıklarda, 0.3, 0.5, 1, 2, 4 ml/dak. akış hızlarında kritik altı su ekstraksiyonu işleminin uygulanabilirliği üzerine çalışmışlardır. Araştırmada ekstraksiyon sıcaklığı ve sistem içindeki suyun akış hızı parametreleri optimize edilmiş ve söz konusu biyoaktif bileşikler 5.2 Mpa, 160°C ve 0.5 ml/dak. akış hızıyla yaklaşık 140 dakika ekstraksiyon süresinde elde edilen ekstraktlarda en yüksek miktarda olduğu ve keten tohumun yapısındaki SDG lignan bileşiğinin bu ekstraksiyon yöntemiyle %85 oranında ekstrakte edilebildiği saptanmıştır.

Diğer bir çalışmada da yağı alınmış keten tohumu küspesinden lignan bileşiklerinin, proteinlerin ve karbonhidratların ekstraksiyonu amacıyla kritik altı su ekstraksiyonu kullanılmıştır. Araştırmada 2 g yağı alınmış keten tohumu küspesi örnekleri ile çalışma koşulları olarak 5.2 MPa basınç, 130, 160, 190°C sıcaklıklar, 4, 6.5 ve 9 pH, 100, 150 ve 210 ml/g çözgen/materyal oranları seçilmiştir; optimum ekstraksiyon koşulları SDG lignan için 170°C sıcaklık, çözgen/materyal oranı 100 ml/g ve pH 9'a ayarlı su olarak belirlenmiştir. Araştırmada kritik altı su ekstraksiyonu yağı alınmış keten tohumu küspesinden lignan bileşiklerinin, proteinlerin ve karbonhidratların ekstraksiyonu için ticari olarak geleceğe dönük teknoloji olma potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir (Ho et al., 2007).

Eikani et al (2007) kişniş (*Coriandrum sativum* L.) tohumlarından esansiyel yağların ekstraksiyonu amacıyla kritik altı su ekstraksiyonu, Soxhlet aparatında kaynama noktasındaki suyla ekstraksiyon ve su destilasyonu işlemlerini karşılaştırmışlardır. Araştırmada 0.25; 0.50 ve 1 mm parça boyutunda öğütülmüş 4 g kişniş tohumlarına 50 bar basınçta, 100, 125, 150 ve 175°C sıcaklıklarda, 1, 2 ve 4 ml/dak. akış hızlarında kritik altı su ekstraksiyonu uygulanırken; 4 g tohum örneği 200 ml hegzanla Soxhlet aparatında 12 saat ekstrakte edilmiş ve 40 g tohum örneğine de 300 ml su ile 3 saat destilasyon uygulanmıştır. Çalışma sonucunda optimum kritik altı su ekstraksiyonu koşulları 125°C, 0.5 mm parça boyutu ve 2 ml/dak. akış hızı olarak saptanmış olup söz konusu işlemin verimi Soxhlet ve destilasyon yöntemlerine kıyasla daha düşük bulunmuş ancak kritik altı su ekstraksiyonu işlemi ile daha değerli esansiyel yağların elde edildiği bildirilmiştir.

Yağı alınmış pirinç kepeğinden protein, karbonhidrat ve fenolik bileşikler gibi sağlığa yararlı bileşiklerin ekstrakte edilmesi amacıyla kritik altı su kullanımının araştırıldığı bir çalışmada, yağı alınmış 1.5 g pirinç kepeği 50, 100, 150, 200, 250 ve 250°C sıcaklıklarda sırasıyla 5, 11, 18, 28, ve 39 dak. sürelerde kritik altı su ile ekstrakte edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, 200°C’de en yüksek miktarda ve verimde protein ve karbonhidrat elde edildiği belirtilmektedir. Araştırmada ekstraksiyon işleminde sıcaklığın yükselmesiyle elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarının ve antioksidan aktivitelerinin arttığı, 150-200°C arasında protein ve karbonhidrat içeriğinin yanısıra ekstraktların furfural içeriklerinin de hızlı arttığı görülmüştür (Wiboonsirikul et al., 2007).

Yang et al. (2007) kekik ve fesleğen yapraklarından α -pinen, limonen, kafur, sitrionellol, ve karvakrol terpenlerinin ekstraksiyonunu kritik altı (subcritical) su kullanarak 15 atm. basınçta, 0,5 ml/dak. akış hızında 0.2 g örnek materyali kullanarak 4 farklı sıcaklık (100, 150, 200, 250°C) ve 2 farklı süre (30, 300 dak.) uygulayarak bu bileşiklerin stabilitesini araştırmışlardır. Araştırmada her iki ekstraksiyon süresinde de sıcaklığın artırılmasıyla terpenlerin önemli derecede indirgendiği ve bütün sıcaklıklarda ekstraksiyon süresinin uzamasıyla da terpenlerin stabilitesinin düştüğü görülmüş olup terpenlerin en yüksek ekstraksiyon veriminin 100°C’de, 15 dakika sürede elde edildiği ve %70-80 arasında olduğu belirtilmiştir. Araştırmada fesleğen ve kekik ekstraktlarındaki her bir terpenin konsantrasyonu 100°C ve 150°C sıcaklıklarda çok fazla değişmemekle birlikte 100°C’deki kekik ekstraktlarının karvakrol içeriği 2879 μ g karvakrol/g kekik değerinden 150°C’de 4270 μ g karvakrol/g kekik değerine yükseldiği saptanmıştır.

Yağı alınmış pirinç kepeği ile yapılan diğer bir çalışmada ise antioksidan ve emülsifiye özelliğe sahip yararlı maddelerin kritik altı su ekstraksiyonu koşulları ile ekstraktlardaki bazı bileşikler ve onların özellikleri araştırılmıştır. Bu amaçla yağı alınmış 1. g pirinç kepeği 5-40 dak. sürelerle 180, 200, 220, 240 260°C sıcaklıklarda kritik altı su ile muamele edilmiştir. Araştırmada veriler doğrultusunda 260–280°C sıcaklıklarda, yüksek radikal süpürücü ve antioksidan aktiviteye sahip bileşikleri içeren ekstraktların 5 dak. gibi kısa sürede elde edildiği saptanmış olup yüksek emülsifiye özelliğe sahip ekstraktların alınabildiği optimum sıcaklık ise 200°C olarak bildirilmiştir (Hata et al., 2007).

Rangsriwong et al. (2009) helile (*Terminalia chebula Retz*) meyvelerinden gallik asit, elajik asit, ve korilagin gibi polifenolik bileşiklerin kritik altı su ekstraksiyonu üzerinde çalışmışlardır. Bu amaçla 4 MPa basınç ve 10 dak. süre sabit tutularak 120, 150, 180, 220°C sıcaklığın ve 180°C’de 2, 3, 4 ml/dak. su akış hızının ekstrakte edilen bileşiklerin miktarını nasıl etkilediğini incelenmişlerdir. Araştırmada kritik altı su ekstraksiyonu işleminde sıcaklığın artmasıyla ekstraktlardaki gallik asit ve elajik asit’in miktarı artarken korilagin en yüksek 120°C’de elde edilmiş olup suyun akış hızının da ekstraksiyon işleminde etkili olduğu ve toplam fenolikler için 4 ml/dak. akış hızının uygun olduğu saptanmıştır. Araştırmada ayrıca kritik altı su ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktiviteleri sıcak su, sıcak etanol ve suda kaynatma işlemi sonucu elde edilen ekstraktlarla karşılaştırılmıştır. Araştırma sonucunda diğer ekstraksiyon metodlarıyla kıyaslandığında kritik altı su ekstraksiyonu işlemi ile gallik asit, elajik asit gibi yüksek antioksidan aktivite özelliğine sahip önemli miktarda fenolik bileşikler içeren ekstraktların elde edildiği ve söz konusu işlemin helile meyvelerinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu amacıyla kullanımının zamandan tasarruf sağladığı, etkin ve çevre dostu bir teknik olduğu bildirilmiştir.

Gıdaların yapısındaki biyoaktif bileşiklerin basınçlı çözgen ekstraksiyonu cihazları (ASE 100, ASE 200 ve ASE 300) kullanılarak çeşitli çözgenlerle ekstraksiyonu üzerine pek çok araştırma yapılmaktadır. Bu cihazlarda kritik altı su ekstraksiyonu uygulamalarının da yapıldığı çeşitli araştırmalar aşağıda görülmektedir.

Herrero et al. (2005) *Spirulina platensis* mikroalginden antioksidanların ASE 200 cihazında ekstraksiyonunu optimize etmek amacıyla 4 farklı çözgen (hegzan, petrol eteri, etanol, su), 3 farklı sıcaklık (60, 115, 170°C) ve 3 farklı süre (3, 9, 15 dak.) parametreleri ile çalışmışlardır. Araştırmada elde edilen ekstraktlarda antioksidan aktivite ve ekstraksiyon verimine sıcaklığın etkisinin önemli olduğu belirtilmiş; her çözgen ve süre parametresi için en yüksek ekstraksiyon verimi 170°C’de elde edilmiştir; etanol ekstraktlarındaki verim %19.7 ile en yüksek oran olup ikinci sırada %10.12 ile su ekstraktları bulunmaktadır. Araştırmada ayrıca antioksidan aktivite açısından her sıcaklık ve süre parametresi için en yüksek antioksidan aktivite su ekstraktlarında saptanmıştır.

Ju and Howard (2005) kurutulmuş kırmızı üzüm kabuğundan antosiyaninlerin ve diğer fenolik bileşiklerin ASE 200 cihazında kritik altı su ile ekstraksiyonu üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar 1 MPa basınç, 40 saniye ekstraksiyon süresi, 100-160°C sıcaklıklarda (10°C artarak) denemeler yapmışlar ve kritik altı su ekstraksiyonu ile kıyaslamak amacıyla aynı miktar örnekten antosiyaninleri ve diğer fenolikleri ultrasonik banyoda su ve %60 metanol çözeltisi ile 50°C'de 1 saat süre ile ekstrakte etmişlerdir. Araştırmada üç farklı ekstraksiyondan elde edilen ekstraktlarda antosiyaninler ve diğer fenolik asitlerin miktarı ile antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Veriler değerlendirildiğinde ASE 200 cihazında 110°C'nin üzerine çıkıldığında ekstraktlardaki antosiyanin bileşiklerinin ve toplam antosiyanin miktarlarının düştüğü ancak sıcaklığın artması ile ekstraktların antioksidan kapasite değerlerinde lineer bir artış olduğu gözlenmiş olup kritik altı su ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktların antosiyanin içerikleri ve antioksidan kapasite değerleri her iki konvansiyonel ekstraksiyon tekniğinden daha yüksek bulunmuştur. Araştırmada sonucunda kurutulmuş kırmızı üzüm kabuğundan ve muhtemelen işlenmiş üzümün diğer yan ürünlerinden antosiyaninlerin ve diğer fenolik bileşiklerin 100-110°C arasında kritik altı su ile ekstrakte edilmesi işleminin organik çözen kullanımına karşı iyi bir alternatif yöntem olacağı bildirilmiştir.

Rodríguez-Meizoso et al. (2006) kekik (*Origanum vulgare* L.) yapraklarından antioksidan bileşiklerin izole ve konsantre edilmesi amacıyla kritik altı su ekstraksiyonu işleminde sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. ASE 200 cihazında 1500 psi basınçta, 25, 50, 100, 150 ve 200°C sıcaklıklarda 15 ve 30 dak. sürelerde kritik altı su ekstraksiyonu işlemi uygulanmıştır. Veriler değerlendirildiğinde en yüksek ekstraksiyon verimi (%54) ve en yüksek antioksidan aktivite 200°C'de 15 dak. ekstraksiyon süresinde elde edilen ekstraktlarda saptanmıştır. Buna karşın araştırmada farklı koşullarda elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları birbirine yakın olup fenolik bileşiklerin çeşidinde ve yapısında farklılıklar saptanmıştır ve bu farklılıkların ekstraktlardaki antioksidan aktivitelerdeki farklılığının nedeni olduğu vurgulanmıştır.

Monrad et al. (2010) Kurutulmuş üzüm posasından ASE 200 cihazı ile prosiyanidinlerin ekstraksiyonuna çözen ve sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 6.8 MPa basınçta 6 çözen (%0, 10, 30, 50, 70, ve 90 etanol/su (v/v)) ve 6 sıcaklık parametresi (40, 60, 80, 100, 120, 140°C) ile çalışmışlardır. Araştırmada aynı zamanda öğütülmüş üzüm posasındaki prosiyanidinler

aseton/su/asetik asit (70:29.5:0.5, v/v/v) çözeltisi ile konvansiyonel olarak da ekstrakte edilmiştir. Araştırmada ASE cihazında sıcaklık parametrelerinin her birinde %50 etanol/su (v/v) çözeltisi ile elde edilen ekstraktların prosiyanidin içerikleri diğer etanol/su çözeltilerinden daha yüksek olduğu ve konvansiyonel çözgenle ekstrakte edilen prosiyanidinlerin %115'ini içerdiği belirtilmiş olup %50 etanol/su (v/v) çözeltisi ile konvansiyonel ekstraksiyona göre %205 epikateşin, %221 kateşin ve %113 dimerler daha fazla ekstrakte edilmiştir. Araştırmada sonuç olarak ASE cihazında 80-140°C arasında %50 etanol/su (v/v) çözeltisi ile prosiyanidinlerin ekstraksiyonunun yapılabileceği saptanmış; şarap ve meyve suyu endüstrisinde atık olarak ortaya çıkan üzüm posasından prosiyanidinlerin ekstraksiyonunun etkin ve çevre dostu olan çözgenlerle gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir.

Çam ve Hışıl (2009) nar kabuğu ve çekirdeğinde bulunan ve antioksidan özellikler gösteren fenolik bileşiklerin ASE 300 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar sıcaklık, partikül boyutu, taze çözgen miktarı, örnek miktarı, ekstraksiyon süresi gibi işlem parametrelerini incelemiş, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresini etkin faktörler olarak saptamış ve optimum ekstraksiyon koşullarını 40°C sıcaklık, 5 dak. ekstraksiyon süresi, 1500 psi basınç, %5 taze çözgen miktarı ve 10 g örnek miktarı olarak belirtmişlerdir. Araştırmada nar kabuğunda punicalagin, gallik asit, ellagik asit, punicalagin türevleri ve ellagik asit türevleri, nar çekirdeğinde ise protokatesuik asit ve gallik asit bileşiklerinin bulunduğu saptanmıştır. Araştırmacılar optimum koşullarda su ile alınan ekstraktların fenolik bileşik miktarı ile konvansiyonel metanol ekstraktları ile alınan ekstraktlar arasında istatistiksel anlamda fark olmadığını belirtmiştir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Keten tohumu

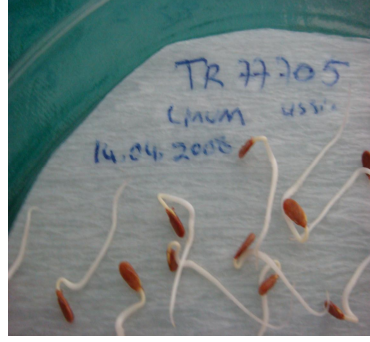
TÜBİTAK tarafından desteklenen ve Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nde yürütülen araştırmada, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bünyesindeki Ulusal Gen Bankası keten koleksiyonlarından 2008 yılı hasadı 6 yerel çeşit yağlık keten (*Linum usitatissimum* L.) tohumu (TR 77705, TR 32204, TR 42077, TR 37060, TR 77418, TR 77416) ve 1 adet tescilli çeşit Sarı 85 (TR 73572) olmak üzere toplam 7 örnek temin edilmiştir. Elde edilen tohumlar ayıklandıktan sonra cam kavanoz içerisinde buzdolabında +4°C'de depolanmıştır.

2.1.2. Keten tohumu filizi

Keten tohumu filiz eldesi ön denemeleri:

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Bitki Genetik Kaynakları Bölümünde keten tohumlarının filizlendirilmesi ön çalışmasında sırasıyla yapılanlar;

- I. Keten tohumları çimlendirme kabinlerinde filizlendirilmiş ve çimlenme yüzdeleri saptanmıştır.
- II. Keten tohumları filizlendirilerek 5., 7., 9., 11., ve 13. günlerde bir tane filizin ağırlığı saptanmıştır (analizlerde belli miktarda filizle çalışılması gerektiğinden). Bu ön çalışmada filizlendirme işlemi petri kaplarında yapılmıştır.
- III. Projenin 3. kısmında amacımız filizlenme süresinin filizlerdeki biyoaktif bileşikler üzerine etkisini incelemektir. Bu amaçla 5 ayrı süre seçilmiş ve başlangıç olarak hangi günün seçilmesi çalışmasında ise; 3 günlük ve 5 günlük filizlerin durumları incelenerek karşılaştırılmış ve 5 günlük filizlerin kotiledon yapraklarının tam olarak kabuklarından ayrılmış olduğu görülmüştür. Bu nedenle keten tohumu filizlerinin elde edilmesi için başlangıç olarak 5 günlük filizler seçilmiştir. Bu ön denemeler esnasında ilgili fotoğraflar Şekil 3a ve Şekil 3b'de gösterilmektedir.



Şekil 3a. 3 günlük filizler



Şekil 3b. 5 günlük filizler

Keten tohumu filizlerinin üretim aşaması:

Keten tohumları içerisinde seçilen TR 73572 ve TR 77705 çeşitleri (Şekil 4a ve 4b) (ISTA, Uluslararası Tohum Test Birliği 1985) tarafından belirlenen keten tohumu çimlendirme yöntemi kullanılarak çimlendirme kutuları içerisinde ve çimlendirme kağıtları arasında çimlendirme işlemine tabi tutulmuştur (ISTA,1985). Bu yöntemle göre keten tohumları ılık suda kabartılmak üzere 1 gün (24 saat) inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra bu tohumlar karanlık ortamda, 78 ± 2 nem ve $20^\circ\text{C} \pm 1$ sıcaklığa ayarlanmış çimlendirme dolaplarında 13 gün süre ile filizlendirilmiştir (ISTA,1985). Bu yöntemin aşamaları aşağıda açıklanmaktadır.

I. Filiz miktarlarına göre belirli miktarda keten tohumları (Şekil 4a ve 4b), önceden akordion haline getirilmiş kurutma kağıtları, etüvde 105°C 'de bekletilip alkolden geçirilen pensler (Şekil 5) ve çimlendirme kutuları hazır edilmiştir.



Şekil 4a. TR 73572 keten çeşidi



Şekil 4b. TR 77705 keten çeşidi



Şekil 5. Pensler ve kurutma kağıtları

II. Tohumlara patojenlerin bulaşmasını önlemek amacı ile steril şartlarda çalışılmıştır. Ekim yapan proje personeli, ellerini alkolden geçirdikten sonra, keten tohumlarını teker teker pensler yardımıyla kurutma kağıtları üzerine her sıraya 4 tohum olacak şekilde belirli aralıklarla ekmişlerdir (Şekil 6).



Şekil 6. Keten tohumlarının ekim aşaması

III. Her kurutma kağıdı üzerine yapılan ekim tamamlandığı zaman, dikkatli bir şekilde kurutma kağıdı ortasından tutularak iki el yardımıyla birleştirilmiş ve bol saf suyla ıslatıldıktan sonra çimlendirme kutuları içerisine yerleştirilmiştir. Sandviç kap doluncaya kadar bu işlem tekrar edilmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. Keten tohumlarını ön ıslatma ve sandviç kaplara yerleştirme aşaması

IV.Ekim işlemleri tamamlandıktan sonra çimlendirme kutuları çimlendirme kabinlerine (Şekil 8) yerleştirilmiştir.



Şekil 8. Çimlendirme kabini



Şekil 9. Filizlerin elle toplanması

✓ Keten tohumunun çimlenmesi aşamasında, kotiledon yapraklar ilk 4. günden itibaren çıkmaya başlamaktadır. Bu nedenle filizler, 5., 7., 9., 11. ve 13. günlerde analizlere alınmıştır.

✓ Keten tohumu filizleri, belirlenen günlerin sonunda tek tek el yardımıyla toplanmış (Şekil 9), nemli kurutma kağıtları arasında küçük çimlendirme kutuları içerisinde (Şekil 10) Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümüne getirilmiştir.

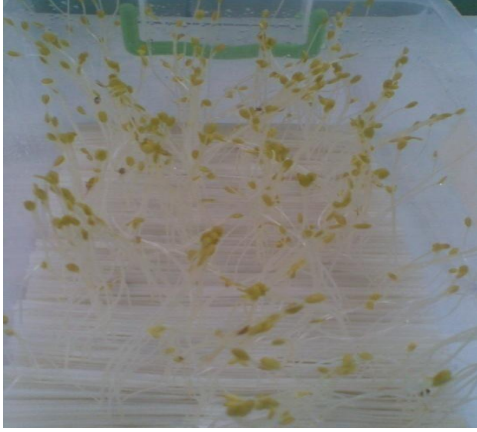
✓ Burada filizler her bir analiz için farklı kahverengi şişelerde -40°C'de depolanmıştır.



5 günlük filizler



7 günlük filizler



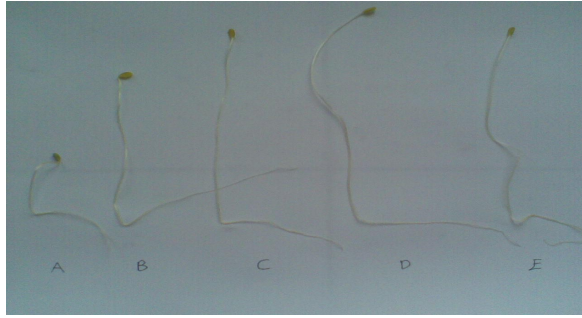
9 günlük filizler



11 günlük filizler



13 günlük filizler



5. günden (A) 13. güne (E) filiz boyları (~)

Şekil 10. Keten tohumu filizlerinin görünüşleri

2.1.3. Kritik altı su ekstraksiyonu çalışmasında deneme materyali

ASE 200 cihazı ile yapılan denemelerde en yüksek SDG lignan içeren TR 77705 keten tohumu çeşidi ana materyal olarak seçilmiştir. SDG lignan ekstraksiyonu TR 77705 çeşidi keten tohumu (Şekil 11a), soğuk sıkma yöntemiyle elde edilen parçalanmış küspesi (Şekil 11c) ve öğütülmüş keten tohumu küspesi (Şekil 11d) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Soğuk sıkma yöntemi, İzmir’de bulunan Bükey A.Ş.’deki yağ sıkma makinesinde 6 inç’lik kalıp kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çubuk şeklinde küspeler elde edilmiştir (Şekil 11b). Bu küspeler eşit büyüklükte (6 mm çap 7-10 mm uzunlukta) silindirler şeklinde kırılarak parça keten tohumu küspesi (Şekil 11c) ve öğütülüp

0.8-1.4 mm gözenek çapındaki eleklerden elenerek öğütülmüş keten tohumu küspesi (Şekil 11d) elde edilmiştir.



Şekil 11. Kritik altı su ekstraksiyonu çalışmasında materyal olarak kullanılan keten tohumu ve keten tohumu küspesi fotoğrafları. a: tane keten tohumu, b: keten tohumu küspesi, c: parça küspe, d: öğütülmüş küspe

2.1.4. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan çeşitli çözücüler, reaktifler ve standartlar; sodyum karbonat, n-hegzan (Merck); potasyum hidroksit (Supelco); sodyum hidroksit, sodyum sülfat, sülfirik asit (J. T. Baker), Folin&Ciocalteu fenol reaktifi, metanol, BF³-methanol, luteolin (Sigma); n-hegzan, dietil eter, hidroklorik asit (Merck); ferrulik asit, 2-aminoetil difenilborat (Fluka); SDG standardı (Bosco, Hong Kong) bileşikleridir. Bütün kimyasallar analitik ve HPLC saflıktadır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Nem analizi

2'şer g keten tohumu örnekleri petri kapları içinde etüvde $103\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de %0.01 sabit tartıma kadar 3 saat bekletilirken; filizlerden 4'er g tartılmış ve petri kapları vakumlu etüvde $55^{\circ}\text{C}\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 13 saat bekletilmiştir (AOAC, 1998). Petri kaplarının desikatörde soğutulması ve tartılması işlemlerinden sonra keten tohumlarının ve filizlerinin %nem miktarları hesaplanmıştır.

2.2.2. Toplam yağ analizi

Keten tohumlarının ve filizlerinin toplam yağ içeriği Soxhlet yöntemi ile saptanmıştır (AOAC, 1998). Öğütülmüş keten tohumları ve filizleri Soxhlet aparatında 6 saat boyunca hegzanla muamele edilmiş, elde edilen ekstrakt içindeki hegzan dönerli buharlaştırıcıda uzaklaştırıldıktan sonra %0.01 sabit tartıma kadar etüvde bekletme işlemi (ketende 6 saat; filizde 3 saat) yapılarak örneklerdeki toplam yağ miktarı belirlenmiştir. Filizlerin toplam yağ içeriğinin belirlenmesi işleminde, filizler vakumlu etüvde $55\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de kurutulduktan sonra 50 ml'lik mini Soxhlet aparatında analize alınmıştır.

2.2.3. Yağ asidi kompozisyonu analizi

Ön denemeler:

Keten tohumunun yapısındaki yağın ekstraksiyonu aşamasında, bir adet sıcak (Soxhlet aparatında 3 saat) ve iki adet soğuk ekstraksiyon (Wanasandura 1999a ve Johnsson et al, 2002) yöntemi denenmiştir. Sıcak ekstraksiyon kullanıldığı zaman keten tohumu yağının özellikle α -linolenik asit içeriğinde düşme olduğu gözlenmiş (EK 1) ve kısa zamanda iyi sonuç veren soğuk ekstraksiyon yönteminin (Johnsson et al, 2002) seçilmesine karar verilmiştir.

Metillendirme aşamasında ise iki farklı metillendirme yöntemi (Wanasandura et al., 1999a; AOAC, 1998) denenmiştir. Uzun olan yöntemde keten tohumu yağı metanolik sodyum hidroksitle sıcak su banyosunda kaynatıldıktan sonra dietil eter ile muamele edilmiş, eterli faz hidroklorik asit ile asitlendirilerek sulu faz BF_3 -metanol ile 20 dak. kaynatılmış ve dietil eterli fazdan GC (gaz kromatografisi)'ne enjeksiyon yapılmıştır (Wanasandura et al., 1999a).

Söz konusu yöntemden elde edilen kromatogram sonuçları AOAC (1998) yöntemi ile kıyaslandığında yağların α -linolenik asit içeriğinde düşme gözlenmiştir ve AOAC (1998)'de verilen metillendirme yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Keten tohumunun yağ asidi kompozisyonu fused silika kapiler kolon (DB-23.30 m x 0.25 mm id., 250 μ m film kalınlığı, J. W. Scientific) kullanılarak gaz kromatografisinde (HP 5890) 4 değişik fırın sıcaklık programı kullanılarak teşhis edilmiştir (Wanasandura et al., 1999a; Choo et al., 2007; Bozan and Temelli 2008; Lucas et al., 2004). Elde edilen veriler doğrultusunda piklerin düzgünlüğü ve doymamış yağ asidi yüzdeleri (EK 2) göz önünde bulundurularak en uygun GC yöntemi seçilmiştir (Lucas et al., 2004).

Esas denemeler:

Keten tohumları kahve değirmeninde 0.1-0.2 mm çapında öğütülmüş ve miktarının 10 katı n-hegzanla manyetik karıştırıcıda 1 saat muamele edildikten sonra kaba filtre kağıdından süzölmüş, geriye kalan kalıntıya aynı işlem tekrar uygulanmış ve elde edilen sulu fazdaki n-hegzan vakumlu rotary evaporatörde uçurulmuştur (Johnsson et al, 2002). Filizlerin yağını soğuk ekstraksiyon yöntemi ile elde etmek için 10 gram filiz alınmış ve kahve değirmeninde filizler parçalandıktan sonra keten tohumunda kullanılan soğuk ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır ve bu işleme ilave olarak elde edilen sıvı faz susuz sodyum sülfat yatağından süzöldükten sonra n-hegzan uçurulmuştur (Wanasandura et al., 1999a). Metillendirme işlemi sırasında, ekstrakte edilen yağdan 0.1 gram alınıp üzerine 2 ml n-hegzan ilave edilmiş ve yağın çözünmesi sağlandıktan sonra 4 ml 2 N metanollü potasyum hidroksit eklenmiş ve elle iyi bir çalkalama yapıldıktan sonra bir dakika yüksek devirde vorteks karıştırıcıda karıştırma yapılmış ve faz ayrımı gözleninceye kadar beklendikten sonra üst fazdan 2 μ l GC'ye enjeksiyon yapılmıştır (AOAC, 1998). Yağların yağ asidi kompozisyonunu saptamak amacıyla kullanılan GC parametreleri Çizelge 6'da gösterilmektedir (Lucas et al., 2004).

Çizelge 6. Gaz Kromatografisi cihazı koşulları

Gaz akış hızı	1 ml/dak.	
Split oranı	100:1	
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C	
Dedektör sıcaklığı	250°C	
Fırın sıcaklık programı	30°C-150°C	20°C/dak.
	150°C-235°C	6°C/dak.
	235°C	20 dak.

2.2.4. Toplam fenolik madde analizi

Keten tohumu 0.1-0.2 mm çapında öğütülüp soğuk ekstraksiyon yöntemiyle yağı alındıktan sonra yağsız keten tohumu unu ve keten tohumu yağı elde edilmiştir. Yağsız keten tohumu ununda, keten tohumu yağında ve keten tohumu filizinde fenolik madde miktarları serbest ve esterleşmiş olarak analiz edilmiştir (Bozan and Temelli 2008). Ekstraksiyon aşamasında iki yöntemden yararlanılmış olup her iki yöntemde de bazı modifikasyonlar yapılmıştır.

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu aşamasında materyal olarak 1 g yağsız keten tohumu unu, 1 g keten tohumu yağı ve 2 g keten tohumu filizi kullanılmıştır. Serbest fenoliklerin ekstraksiyonunda analize alınacak materyal 45 ml %80 metanol çözeltisi ile çalkalamalı su banyosunda 40°C'de 90 dak. muamele edilmiş; esterleşmiş fenoliklerin ekstraksiyonunda ise materyal 30 ml 1.2 M hidroklorik asit içeriğine sahip %80 metanol çözeltisi ile su banyosunda 85°C'de 60 dak. muamele edilmiştir (Bozan and Temelli 2008). Ekstraksiyon sonrasında kaba fitre kağıdından süzülerek elde edilen berrak ekstrakt 50 ml'ye saf suyla tamamlanmıştır (Çam et al., 2009). Bu çözeltiden 1 ml alınmış, üzerine 0.5 ml Folin Cioculteau's fenol reaktifi eklenip karıştırma yapılmış ve 3 dak. sonra sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi eklenmiştir. Burada eklenen sodyum karbonat çözeltisi konsantrasyonu ve hacmi analizi yapılacak materyale göre ve elde edilen fenoliklerin serbest veya esterleşmiş olmasına göre değişiklik göstermektedir;

- Unda serbest fenolik madde
 - Filizde serbest fenolik madde
 - Yağda serbest fenolik madde
- } % 7'lik 15 ml Na₂CO₃ çözeltisi
- % 7'lik 5 ml Na₂CO₃ çözeltisi
-
- Unda esterleşmiş fenolik madde
 - Filizde esterleşmiş fenolik madde
 - Yağda esterleşmiş fenolik madde
- } % 20'lik 15 ml Na₂CO₃ çözeltisi
- % 7'lik 5 ml Na₂CO₃ çözeltisi

Eklenen sodyum karbonat miktarının ardından karışım balon jode 25 ml'ye saf suyla tamamlanmış ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra çözeltinin absorbans değeri UV visible spektrofotometre'de ferrulik asit standardı kullanılarak 725 nm'de okunmuştur (Choo et al., 2007; Bozan and Temelli 2008; Çam et al., 2009). Serbest ve esterleşmiş fenolik madde miktarları belirlendikten sonra bu iki değerin toplanması yolu ile de materyaldeki toplam fenolik madde miktarları hesaplanmıştır (Bozan and Temelli 2008). Standart çözeltiler her bir materyalde serbest ve esterleşmiş fenolik maddeler için ayrı ayrı hazırlanmış, ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri çizilerek miktar tayini yapılmıştır. Kalibrasyon grafikleri için 0–500 µg/ml konsantrasyon aralığında 5 adet ferrulik asit standart çözeltisi saf su ile tamamlama yapılarak hazırlanmıştır. Ferrulik asit stok çözeltisi ise %80 metanol çözeltisinde hazırlanmıştır.

2.2.5. Toplam flavonoid analizi

Yağsız keten tohumu unu, keten tohumu yağı ve keten tohumu filizinde toplam flavonoid analizi için serbest ve esterleşmiş fenoliklerin ekstraksiyonu aşaması 3.2.4. bölümünde anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Elde edilen ekstraktan 1 ml alınıp, 100 µl %1'lik 2 amino etil difenil-borat çözeltisi eklenmiştir. İyice karıştırma işleminin ardından çözelti balon jode 10 ml'ye %80 metanollü suyla tamamlanmış ve bekleme yapılmadan çözeltinin absorbans değerleri UV visible spektrofotometre'de luteolin standardı kullanılarak 404 nm'de okunmuştur (Choo et al., 2007). Standart çözeltiler her bir materyalde serbest ve esterleşmiş flavonoidler için ayrı ayrı hazırlanmış, ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri çizilerek

miktar tayini yapılmıştır. Kalibrasyon grafikleri için 0–50 µg/ml konsantrasyon aralığında 5 adet luteolin standart çözeltisi %80 metanol çözeltisinde hazırlanmıştır. Luteolin stok çözeltisi %80 metanol çözeltisinde hazırlanmıştır.

2.2.6. SDG lignan analizi

SDG lignan bileşiğinin ekstraksiyonu aşamasında materyal olarak 0.5 g yağı alınmış keten tohumu unu, 4 g keten tohumu filizi ve 4 ml kritik altı su ekstraktı kullanılmıştır. Analize alınacak keten ve filiz materyalleri 4 ml metanol, 1ml saf su ve 5 ml 2 N sodyum hidroksit çözeltisi ile; kritik altı su ekstraktı ise 1 ml metanol ve 5 ml 2 N sodyum hidroksit çözeltisi ile 1 saat orbital karıştırıcıda orta hızda muamele edilerek hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 5 ml 1 N sülfirik asit eklenerek ortam nötr hale getirilmiş ve karışım santrifüj tüpüne alınarak 25°C’de 10.000 rpm hızda 10 dak. santrifüj edilmiştir. Üst faz balon jojeye alınarak %80 metanol çözeltisi ile 25 ml’ye tamamlanmış ve bu çözeltiden 2 ayrı ependorf tüpüne 0,4 ml ekstrakt alınmıştır. Ekstraktların üzerine 0.6 ml metanol eklenerek tüpler 30 dak. oda sıcaklığında bekletilmiştir. Daha sonra ortamdaki tuzları çöktürmek için tüpler 25°C’de 10.000 rpm hızda 1 dak. santrifüj edilmiştir. 2 ayrı tüpte bulunan üst fazlar 0,45 µm gözenekli filtreden geçirildikten sonra 2 ml vialle alınmıştır (Eliasson et al., 2003; Ho et al., 2007). Yağsız keten tohumu ununda SDG lignan bileşiğinin yüksek olması nedeniyle ve bu durumun cihazda herhangi bir kirliliğe neden olmasını önlemek için ekstraktlar 50 kat seyreltilmiş daha sonra enjeksiyon yapılmıştır.

Enjeksiyon hemen yapılamayacaksa örnekler -40°C’de depolanmalıdır. Depolama süresinin 2-3 günü geçmemesi sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir. Yapılan bu çalışmada ekstraktlardaki SDG lignan bileşiğinin -40°C’de 3 ay depolama sonucunda %50 oranında kayba uğradığı gözlenmiştir.

Ön denemelerde Argefär bünyesindeki HPLC-DAD (Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi–diyot dizinli dedektör) cihazı ile SDG lignan bileşiğinin analizi gerçekleştirilmiş ve tek bir enjeksiyon için analiz süresinin çok uzun (90 dak.) olduğu görülmüştür. Bunun üzerine Argefär bünyesindeki daha hassas bir cihaz olan, daha iyi ve kısa sürede sonuç veren API 4000 model LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi-İkili Kütle Spektrometresi) cihazında (Şekil 17) denemeler yapılmış ve kısa sürede (14 dak.) çok iyi piklerin elde edildiği gözlenmiştir.

Analizler LC-MS/MS cihazında C18 (Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonu (150mm*2.1mm*5µm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon grafiği için 0–5 µg/ml konsantrasyon aralığında 5 adet SDG lignan standart çözeltisi metanolde hazırlanmıştır.

LC-MS/MS cihazında SDG lignanın teşhisi 685.3 kütleli iyon üzerinden yapılmış olup söz konusu iyon SDG lignanın yapısını oluşturan ana belirleyici iyonudur. Teşhiden sonra miktar tayini için bu kütle enerji verilerek parçalanmış ve ortaya 2 tane 523.3 (SDG 1) ve 361.0 (SDG 2) kütleli iyon çıkmıştır. Bu iki iyondan 523.3 kütleli iyon daha yüksek sinyal gücüne sahip olduğu için kantitatif tayin aşamasında kullanılmıştır ve cihaz bunu SDG 1 olarak isimlendirmiştir.

SDG lignanın teşhisi için kullanılan LC-MS/MS parametreleri Popova et al. (2009)'dan yola çıkılarak ve çeşitli modifikasyonlar yapılarak oluşturulmuş ve yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir. Kullanılan LC-MS/MS parametreleri Çizelge 7'de gösterilmektedir.

Çizelge 7. SDG lignan analizi için LC-MS/MS cihaz koşulları

Mobil fazın akış hızı	0,2 ml/dak
Kolon sıcaklığı	40°C
Enjeksiyon hacmi	5 µl
Gradient Programı	
A fazı	0.050 mmol/L amonyum asetat/su
B fazı	0.050 mmol/L amonyum asetat/asetonitril
<u>Süre (dak.)</u>	<u>Mobil faz</u>
0.01	% 2 B mobil fazı (%98 A mobil fazı)
2.00	% 2 B mobil fazı
4.50	% 90 B mobil fazı
8.50	% 90 B mobil fazı
8.51	% 2 B mobil fazı
13.30	Bitiş



Şekil 17. LC-MS/MS (Sıvı kromatografisi- İkili Kütle Spektrometresi) cihazının (API 4000 model) fotoğrafı

Validasyon çalışması:

Doğrusallık: Doğrusallık çalışması için SDG lignan standardından 0.1; 0.5; 1.0; 2.5; 5 µg/ml konsantrasyonlarında 3'er paralel enjeksiyon yapılmıştır. Çalışma sonucunda çizilen kalibrasyon grafiğinde $r = 0.9989$ olarak tespit edilmiştir (Ek 3).

Kesinlik: Bu çalışmada enjeksiyon tekrarlanabilirliğine bakılmıştır. Bu amaçla 1,0 µg/ml konsantrasyonunda 6 enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen alanlara bakıldığında standart sapma değerinin %3.25 olduğu ve enjeksiyon tekrarlanabilirliğinin iyi çıktığı görülmektedir (Ek 4).

Doğruluk: Geri kazanım çalışmasında, ilk aşama SDG lignan bileşiği içermeyen uygun bir matriks bulmaktır. Yağı alınmış keten tohumu unu örneğine en uygun matriks olarak kepeği alınmış beyaz buğday unu seçilmiştir. Yapılan analizlerde beyaz buğday unu örneğinde SDG lignanın yok denecek kadar az olduğu görülmüştür. 0.1 µg/ml SDG lignan standardının 24300 alan değeri yanında bile beyaz buğday ununun 247 olarak tespit edilen alan değeri çok küçük kalmaktadır ve kromatogramda da bu görülmektedir (Ek 5). İkinci aşama olarak beyaz buğday unu örneklerine 3 farklı konsantrasyonda SDG lignan standardı (0.5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2.0 µg/ml) ekimi yapılmış ve bir tane de saf suyla kör deneme hazırlanmıştır. Hazırlanan bu örneklerde yukarıda anlatılan aşamalarda SDG lignan ekstraksiyonu işlemi uygulanmış ve elde edilen ekstraktlar 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmış SDG lignan standartları (0.1 µg/ml, 1.0 µg/ml, 5 µg/ml) ile birlikte LC-MS/MS cihazına verilmiştir.

Kullanılan cihazın akreditasyon koşullarında geri kazanım kabul aralığı %70-120 arasındadır. Çalışmamızda SDG lignan bileşiğinin ekstraksiyon aşamasında geri kazanım değeri %88-107 aralığında bulunmuştur. Bu değerlerin cihazın kabul aralığında kalması nedeni ile ve LC-MS/MS cihazı koşulları göz önüne alındığında geri kazanımın oldukça iyi olduğu görülmektedir (Ek 5).

Belirtme sınırı (LOD): LOD (limit of detection) ve LOQ (limit of quantification) hesaplamaları için öncelikle sinyal/gürültü değerinin (S/N) hesaplanması gerekmektedir. Bu amaçla 0.1 µg/ml SDG lignan standardı cihaza enjekte edilmiş ve pikin çıkış zamanından 1 dakika önce 7.93. ve 7.92. dakikalarda cihazdan iki tane S/N değeri alınmıştır; bu değerler sırası ile 201.2 (Ek 6) ve 174,2 (Ek 7) olup söz konusu değerlerin ortalaması 187.7 olarak tespit edilmiştir

LOD değerinin formülü = $C.3 / (S/N)$ olup değerler yerine konulduğunda,

$$LOD = (0.1\text{ppm}).3 / 187.7$$

LOD = 0.0016 ppm olarak saptanmıştır.

Tayin sınırı (LOQ)

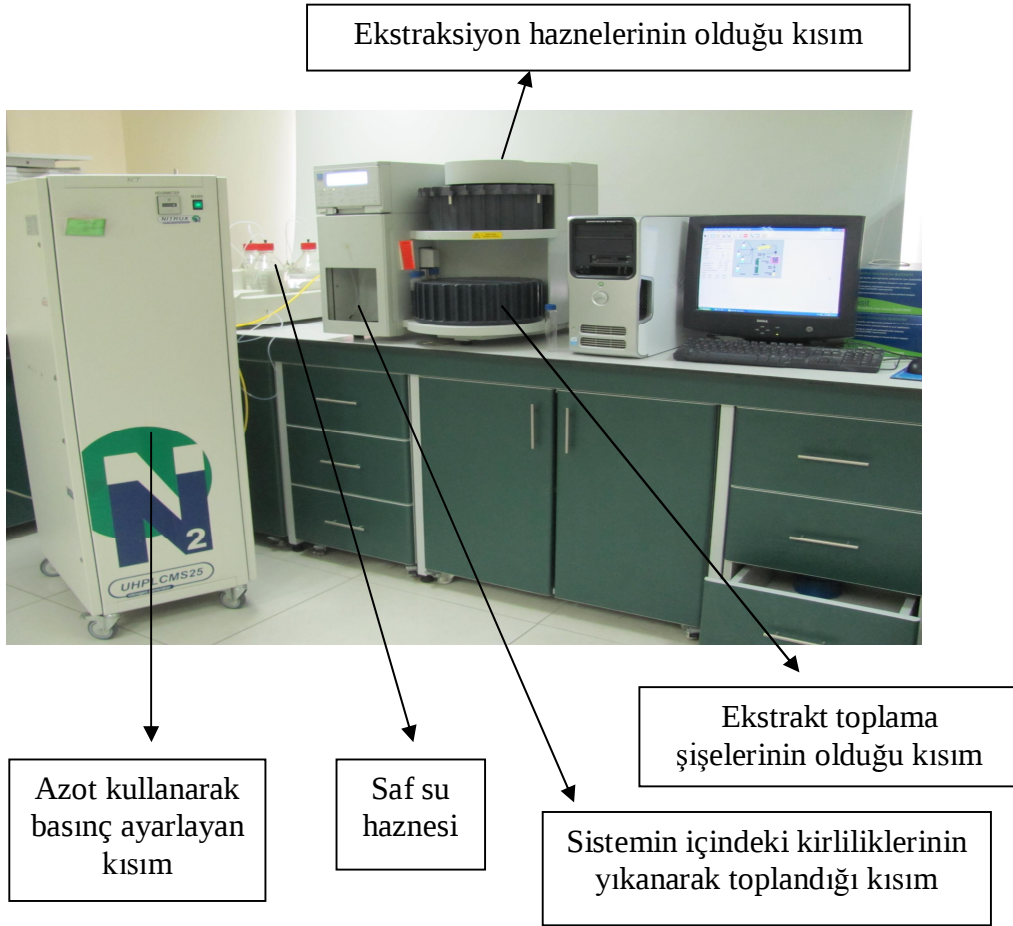
LOQ değerinin formülü = $C.10 / (S/N)$ olup değerler yerine konulduğunda,

$$LOQ = (0.1\text{ppm}).10 / 187.7$$

LOQ = 0.005 ppm olarak saptanmıştır.

2.2.7. Keten tohumundan SDG lignan bileşiğinin ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu

Keten tohumundan SDG lignan bileşiğinin kritik altı su ekstraksiyonu çalışması, Argefar bünyesindeki Dionex marka ASE 200 (Basınçlı Çözgen Ekstraktörü) cihazında (Şekil 12) gerçekleştirilmiştir. ASE 200 cihazının parçaları (Şekil 13, 14, 15 ve 16) ve çalışma koşulları ile ilgili bilgiler aşağıda gösterilmektedir.



Şekil 12. ASE 200 cihazının parçaları



Şekil 13. ASE 200 cihazında ekstraksiyonun gerçekleştiği ve ekstraktların toplandığı kısımlar



Ekstraksiyon işlemi sonunda su ekstraktlarının otomatik olarak ekstrakt toplama şişesine aktarılmasını sağlayan kısım.

Ekstrakt toplama vialı: 60 ml hacim kapasiteli

Şekil 14. ASE 200 cihazında otomatik ekstrakt boşaltma kısmı ve ekstrakt toplama vialı



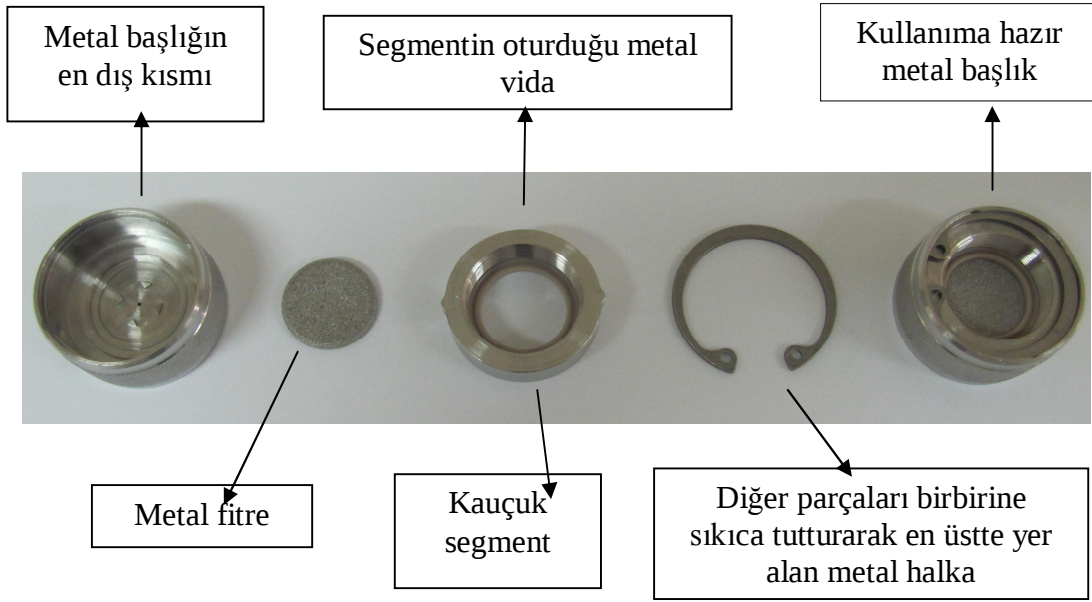
Ekstraksiyon işleminin yapılacağı metal hazneler, içi boş silindir şeklinde olup iki tane başlıktan oluşmaktadır.



Şekil 15. Ekstraksiyon işleminin yapıldığı metal hazne ve başlıkları

Metal başlık 5 ayrı parçadan oluşmaktadır. Bu parçalar her ekstraksiyon işleminden sonra birbirlerinden ayrılarak saf su/aseton karışımı içeren beherde ultrasonik banyoda bir süre tutulup daha sonra yıkanmakta ve tekrar saf sudan geçirilmektedir. Temizleme işleminden sonra bu başlıklar tekrar temizlenmiş metal silindirlere takılarak metal ekstraksiyon hazneleri yeniden kullanıma hazır

hale getirilmektedir. Bu kadar özenli temizlik işleminin nedeni çok ince gözeneklere sahip filtrelerin tıkanmasını önlemektir.



Şekil 16. Metal haznenin başlığının kısımları

ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu işlemi aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir:

- 33 ml hacimli paslanmaz çelik metal haznenin altına selüloz filtre yerleştirildikten sonra içerisine 5 g keten tohumu konulup bir adet filtre de üst kısma yerleştirilir. Hazırlanan metal hazne ve ekstraktın toplanacağı ekstrakt toplama şişesi de yerine yerleştirilir.

- Bilgisayar programında ekstraksiyon koşullarını belirleyecek parametreler girilerek bir metot oluşturulur ve ekstraksiyon işlemi için başlat düğmesi aktif hale getirilir. Oluşturulan yöntem doğrultusunda her bir ekstraksiyon için cihaz aşağıdaki işlem basamaklarını gerçekleştirir.

- ✓ Ekstraksiyon işleminin yapılacağı metal hazne fırın içerisine alınır (loading cell).
- ✓ Ekstraksiyon işlemi başlatılır (start).
- ✓ Metal hazneye ön ısıtma işlemi uygulanır (preheating).

- ✓ Metal haznenin içine pompa yardımıyla çözücü haznesinden su aktarılır (filling cell).
- ✓ Ekstraksiyon işleminin yapılacağı metal haznenin içindeki su ve örneğin sıcaklığı yöntemde girilen değere getirilir (heating cell).
- ✓ Ekstraksiyon haznesinin iç basıncı azot gazı yardımıyla yöntemde girilen basınç değerine yükseltilir ve valf kapatılır.
- ✓ Ekstraksiyon işlemi önceden belirlenmiş ekstraksiyon süresi boyunca gerçekleşir.
- ✓ Ekstraksiyon süresi sonunda ekstrakt, ekstrakt toplama şişesine alınmaya başlanır bu arada statik valf açılır ve sisteme önceden belirlenen miktarda tekrar taze su verilir.
- ✓ Sistemden azot gazı geçirilir ve kalan su toplama şişesine alınır. Azot gazı ASE 200 cihazında sistem iç basıncının istenilen değerde tutulmasını, cihazda dolaşan suyun içinde kalan oksijenin uzaklaştırılmasını ve ekstraktın toplama şişesine alınabilmesini sağlamaktadır.
- ✓ Ekstraksiyon işlemi bitince valfler açılarak ekstraksiyon haznesinin iç basıncı düşürülür ve fırın içerisindeki ekstraksiyon haznesi dışarı alınır.

Çalışmamızda deneme tasarımı, bir faktörün seviyesi değiştirilirken diğer faktörlerin sabit tutularak seviyesi değiştirilen faktörün sistem üzerindeki etkilerinin incelenmesi üzerine kurulmuştur (Çam ve Hışıl 2009). Araştırmamızda ASE 200 cihazının çalışma koşulları incelendiğinde, kritik altı su ekstraksiyonu işlemini etkileyecek faktörler aşağıdaki gibi belirlenmiştir;

- Materyal şekli
- Ekstraksiyon sıcaklığı
- Ekstraksiyon süresi
- Basınç
- Taze çözgen miktarı
- Örnek miktarı

Maksimum ekstraksiyon verimi elde etmek amacıyla söz konusu parametrelerin etkisi tek değişkenli deneme tasarımları ile saptanmıştır. Çizelge 8’de ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu işleminde uygulanan deneme deseni görülmektedir. Söz konusu deneme deseninin uygulanması sonucunda etkin olduğu saptanan sıcaklık ve süre faktörlerinin birbirleri ile etkileşimlerinin gözlenebilmesi amacıyla Çizelge 9’da görülen deneme deseni uygulanmıştır.

Çizelge 8. ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu işleminde etkin faktörleri saptamak için uygulanan deneme deseni

Materyal	Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon süresi (dak.)	Basınç (psi)	Taze çözgen miktarı (%)	Örnek miktarı (g)
Öğütülmüş küspe	40	15	1500	40	5
	120	15	1500	40	5
Tane keten tohumu	40	15	1500	40	5
	120	15	1500	40	5
	140	15	1500	40	5
Parça küspe	40	15	1500	40	5
	120	15	1500	40	5
Parça küspe	120	15	1500	40	5
	140	15	1500	40	5
	160	15	1500	40	5
	180	15	1500	40	5
	180	15	1500	40	5
	180	30	1500	40	5
	180	60	1500	40	5
	180	90	1500	40	5
	180	15	1500	40	5
	180	15	2000	40	5
	180	15	1500	5	5
	180	15	1500	40	5
	180	15	1500	100	5
	180	15	1500	40	5
	180	15	1500	40	10

Çizelge 9. ASE 200 cihazında etkin olduğu saptanan sıcaklık ve süre parametrelerinde ara değerler için uygulanan deneme deseni

Materyal	Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon süresi (dak)	Basınç (psi)	Taze çözgen miktarı (%)	Örnek miktarı (g)
Parça küspe	160	15	1500	40	5
		30	1500	40	5
		60	1500	40	5
	170	5	1500	40	5
		15	1500	40	5
		30	1500	40	5
		60	1500	40	5
	180	5	1500	40	5
		15	1500	40	5
		30	1500	40	5

Materyal şekli denemeleri

Araştırmada ASE 200 cihazında yapılacak olan keten tohumundan SDG lignan bileşiğinin kritik altı su ekstraksiyonu işleminde tane keten tohumu, öğütülmüş keten tohumu küspesi ve parça keten tohumu küspesi kullanılmıştır. Örnek miktarı 5 g, basınç 1500 psi, ekstraksiyon süresi 15 dak, taze çözgen miktarı %40 alınarak materyallerin sıcaklık artışına tepkisini görmek amacıyla 40, 120 ve 140°C sıcaklıklarda ekstraksiyon yapılmıştır.

Sıcaklık denemeleri

Çalışmada materyal olarak parça küspeye karar verildikten sonra ASE 200 cihazında en verimli sonucun alınabileceği sıcaklık seçimi ile ilgili çalışmalara başlanmıştır. Bu amaçla 5 g parça küspe 1500 psi basınç, 15 dak. ekstraksiyon süresinde %40 taze çözgen miktarı alınarak 120, 140, 160 ve 180°C sıcaklıklarda ekstraksiyon yapılmıştır.

Ekstraksiyon süresi denemeleri

Çalışmada materyal ve ekstraksiyon sıcaklığına karar verildikten sonra ASE 200 cihazında en verimli sonucun alınabileceği ekstraksiyon süresini seçmek için çalışmalara başlanmıştır. Bu amaçla örnek miktarı 5 g, basınç 1500 psi, sıcaklık 180°C, %40 taze çözgen alınarak 15, 30, 60 ve 90 dak. sürelerde ekstraksiyon yapılmıştır

Basınç denemeleri

Çalışmada materyal, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresine karar verildikten sonra ASE 200 cihazında en verimli sonucun alınabileceği ekstraksiyon basıncını belirlemek için çalışmalara başlanmıştır. Bu amaçla örnek miktarı 5 g, sıcaklık 180°C ve ekstraksiyon süresi 15 dak., %40 taze çözgen alınarak 1500 ve 2000 psi basınç değerlerinde ekstraksiyon yapılmıştır.

Taze çözgen miktarı denemeleri

ASE 200 cihazında ekstraksiyon süresinin bitiminde ekstraksiyon işleminin yapıldığı metal haznenin içine taze çözücü püskürtme imkanı mevcuttur. Taze çözgen miktarı ekstraksiyon haznesinin hacminin %5-150'si kadar olabilmektedir. Çalışmada materyal, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, basınç ve ekstraksiyon tekrarı sayısına karar verildikten sonra ASE 200 cihazında en verimli sonucun alınabileceği taze çözgen yüzdesini saptamak için çalışmalara başlanmıştır. Bu amaçla örnek miktarı 5 g, sıcaklık 180°C, ekstraksiyon süresi 15 dak., basınç 1500 psi alınarak %5, 40 ve 100 taze çözgen miktarı değerlerinde ekstraksiyon yapılmıştır.

Örnek miktarı denemeleri

Çalışmada materyal, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, basınç ve taze çözgen miktarına karar verildikten sonra ASE 200 cihazında en verimli sonucun alınabileceği örnek miktarını belirlemek için çalışmalara başlanmıştır. Bu amaçla sıcaklık 180°C, ekstraksiyon süresi 15 dak., basınç 1500 psi, taze çözgen miktarı %40 alınarak 5 ve 10 g parça keten tohumu küspesi örneklerinde ekstraksiyon yapılmıştır.

2.2.8. Kritik altı su ekstraktlarında SDG lignan analizi

3.2.6 bölümünde anlatıldığı şekilde SDG lignan analizi yöntemi gerçekleştirilmiş olup analize başlarken materyal olarak 4 ml ekstrakt alınmıştır (Eliasson et al., 2003; Ho et al., 2007; Popova et al., 2009).

2.2.9. İstatistiksel değerlendirme

Keten tohumu, keten tohumu filizi ve kritik altı su ekstraksiyonu çalışmalarında analizler 3 paralel olarak yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi, SPSS paket programı kullanılarak varyans (ANOVA) ve LSD analizleri ile yapılmıştır.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu bölümde 7 yerel çeşit yağlık keten tohumu (*Linum usitatissimum* L.) ve biyoaktif bileşikler açısından daha zengin içeriğe sahip TR 77705 ve TR 73572 keten tohumu çeşitlerinden üretilen filizlerde yapılan nem, toplam yağ, yağ asidi kompozisyonu, toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve SDG lignan analizlerinin sonuçları verilmekte ve tartışılmaktadır. Ayrıca keten tohumunun yapısındaki SDG lignan bileşiğinin ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu işlemini etkileyebilecek faktörler olarak denenen materyal şekli, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, basınç, taze çözgen miktarı ve örnek miktarı parametreleri ile ilgili sonuçlar verilmekte ve irdelenmektedir.

3.1. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Nem İçerikleri

Araştırmamızda materyal olarak kullanılan yedi çeşit keten tohumu ve iki çeşit keten tohumu filizinin nem içerikleri Çizelge 10 ve 11’de gösterilmektedir. Araştırmada keten tohumu çeşitlerinin nem içerikleri belirlenmiş ve örneklerin %5.58-6.48 arasında nem içerdiği gözlenmiştir (Çizelge 10).

Çizelge 10. Yerel keten tohumu (*Linum usitatissimum* L.) çeşitlerinin nem içerikleri

Keten tohumu çeşitleri	Nem içeriği (%)
TR 77705	6.48±0.01
TR 37060	6.23±0.02
TR 42077	6.46±0.00
TR 77418	6.31±0.01
TR 73572	5.58±0.01
TR 32204	6.24±0.03
TR 77416	6.22±0.00

Sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

Keten tohumu filizlerinde yapılan nem analiz sonuçları Çizelge 11’de gösterilmiş olup keten tohumu filizlerinin nem içeriklerinin filiz hasad gününe bağlı olarak TR 77705 ve TR 73572 çeşitlerinin filizlerinde sırasıyla %91,37-96.53 ve %91.95-96.79 arasında değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca Çizelge 11’den de görüldüğü üzere her iki çeşit için de filizlendirme süresi arttıkça filizlerin nem içeriğinin de arttığı belirlenmiştir.

Çizelge 11. Keten tohumu filizlerinin nem içerikleri

Filiz çeşitleri	Nem (%)				
	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
TR 77705	91.37±0.01	93.42±0.02	95.73±0.02	95.91±0.01	96.53±0.01
TR 73572	91.95±0.01	94.94±0.01	95.69±0.01	96.18±0.03	96.79±0.01

Sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

Filizlenme süresi arttıkça filizlerin nem içeriğinin de arttığı literatürdeki keten tohumu, nohut ve susam ile yapılan filizlendirme çalışmalarında da saptanmıştır (Khattak et al., 2007a; Wanasandura et al., 1999a; Khattak et al., 2007b; Khalil et al k., 2007; Khattak et al., 2008; Bibi et al., 2008; Hahm et al., 2009).

3.2. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Toplam Yağ İçeriği

Araştırmamızda materyal olarak kullanılan yedi çeşit keten tohumu ve iki çeşit keten tohumu filizinin toplam yağ içerikleri Çizelge 12 ve 13’de gösterilmektedir. Araştırmada keten tohumu çeşitlerinin toplam yağ içerikleri %37.55-45.07 değerleri arasında belirlenmiştir (Çizelge 12). Çalışmamızda TR 73572 ve TR 77705 keten tohumu çeşitleri en yüksek toplam yağ içeriğine sahip olup bu iki çeşit arasındaki fark önemlidir ($p<0.05$). Ayrıca söz konusu çeşitler ile diğer çeşitler arasında da istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 12. Yerel keten tohumu (*Linum usitatissimum* L.) çeşitlerinin toplam yağ içerikleri

Yerel keten tohumu çeşitleri	Toplam yağ (%)
TR 77705	42.29±1.55 ^a
TR 37060	38.73±1.18 ^b
TR 42077	37.55±1.43 ^c
TR 77418	38.71±1.03 ^b
TR 73572	45.07±1.30 ^d
TR 32204	37.89±1.23 ^{bc}
TR 77416	38.50±1.65 ^{bc}

Sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-d: aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Keten tohumunun yağ içeriğini ve kalitesini sıcaklık ve toprak gibi çevresel faktörlerin yanı sıra kalıtsal özellikler ve kültürel çeşitliliğin de önemli derecede etkilediği bildirilmektedir. Literatürde keten tohumun toplam yağ içeriğinin %29-48 arasında değiştiğine dair bilgiler bulunmaktadır (Röbbelen et al., 1989; Green and Marshall, 1981; Rowland et al., 1988; Batta and ark., 1985; Eliasson et al., 2003; Wakjira et al., 2004)

Çalışmamızda keten tohumu filizlerinde kuru maddede tayin edilen toplam yağ miktarları tohum çeşidine ve filizlenme süresine göre değişmektedir (Çizelge 13). Her iki çeşitte de toplam yağ içeriğinin filizlenme süresince azaldığı saptanmıştır. TR 73572 ve TR 77705 filizlerinin toplam yağ içerikleri filiz hasad günleri bazında karşılaştırıldığında filizlerin ilk hasad günü olan 5. günde en yüksek düzeydedir ve 5. gün ile diğer günler arasında önemli fark vardır ($p<0,05$). Filizlenmenin 5. gününde TR 73572 ve TR 77705 filizlerinin toplam yağ içerikleri sırasıyla %10.54 ve %13.23 düzeyinde olup söz konusu çeşitler arasında da fark önemlidir ($p<0,05$). Filizlenmenin 7. gününde de çeşitler arasındaki fark önemli olup diğer günlerde istatistiksel olarak fark önemli bulunmamıştır.

Çizelge 13. Keten tohumu filizlerinin kuru maddede tayin edilen toplam yağ miktarları

Filiz çeşitleri	Toplam yağ (%)				
	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
TR 77705	13.23±0.73 ^a	9.88±0.83 ^b	7.26±0.77 ^c	3.41±0.95 ^d	3.20±0.56 ^e
TR 73572	10.54±0.35 ^a	6.37±0.22 ^b	6.73±0.67 ^b	3.57±0.37 ^c	3.36±0.58 ^d

sonuçlar ($\pm$ standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-e: aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Wanasundara et al (1999a) yaptıkları çalışmada keten tohumunu 8 gün süreyle filizlendirmişlerdir. Araştırmacılar da keten tohumun toplam yağ miktarının filizlenme işlemi ile düştüğünü ve bu düşüşün filizlenme süresince de devam ederek 8. günün sonunda filizlerin toplam yağ içeriğininin %8.6 olduğunu belirtmişlerdir.

3.3. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Yağ Asidi Kompozisyonunu

Araştırmada materyal olarak kullanılan yedi çeşit keten tohumu ve iki çeşit keten tohumu filizlerinin yağ asidi kompozisyonları Çizelge 14, 15 ve 16'da gösterilmektedir. Çalışmamızda keten tohumunun yağ asidi kompozisyonu üzerine özellikle de doymamış yağ asidi, α -linolenik ve oleik asit içeriklerine kültürel çeşit farklılığının önemli bir etkisinin olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Benzer şekilde Choo et al. (2007) ve Wakjira et al. (2004) yaptıkları çalışmalarda keten tohumun yağ asidi kompozisyonuna kültür çeşitliliğinin etkisinin önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 15 ve 16'dan görüldüğü gibi TR 77705 ve TR 73572 filizlerinin yağ asidi kompozisyonu ise tohum çeşidine ($p<0,05$) ve filizlenme süresine ($p<0,05$) göre önemli düzeyde değişkenlik göstermektedir. Benzer şekilde Wanasandura et al (1999a) yaptıkları çalışmada keten tohumu filizlerinin yağ asidi kompozisyonu içeriğinin filizlenme işlemi süresince önemli düzeyde değiştiğini belirtmişlerdir.

Keten tohumlarının ve filizlerinin α -linolenik asit içerikleri

Yedi yerel çeşit keten tohumu yağının α -linolenik asit ($C_{18:3}$) içeriklerinin %46.33-55.47 arasında değiştiği saptanmıştır. TR 73572 ve TR 77705 çeşitlerinin α -linolenik asit içerikleri diğer çeşitlerden daha yüksektir ve bu çeşitlerle diğer çeşitler arasındaki fark istatistiki açıdan önemli ($p<0,05$) olup TR 73572 ve TR 77705 çeşitleri arasında da istatistiki açıdan önemli ($p<0,05$) fark bulunmaktadır (Çizelge 14).

Wakjira et al. (2004) yaptıkları çalışmada keten tohumlarının α -linolenik asit içeriğinin %47.00-59.10 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Krist ve ark. (2006) ise inceledikleri keten tohumu yağlarının %50'nin üzerinde α -linolenik asit içerdiklerini belirtmişlerdir. Keten tohumu yağlarının incelendiği diğer bir çalışmada da yedi adet keten tohumu yağının α -linolenik asit içeriği %51.80-60.42 arasında değişmektedir (Choo et al., 2007). Bozan and Temelli (2008) de keten tohumu yağında bulunan başlıca yağ asidinin %58.31 oranıyla α -linolenik asit olduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 14. Yerel keten tohumu çeşitlerinin yağ asidi kompozisyon içerikleri

Yağ asidi	TR 73572	TR 77705	TR 42077	TR 32204	TR 37060	TR 77418	TR 77416
C 16:0	5.24 ±0.09 ^a	5.66±0.17 ^b	6.15±0.06 ^c	6.24±0.16 ^b	6.26±0.19 ^d	6.39±0.20 ^e	6.50±0.14 ^f
C 18:0	3.18±0.06 ^a	3.20±0.11 ^b	3.40±0.06 ^c	3.50±0.40 ^d	4.7±0.32 ^e	3.80±0.15 ^f	4.50 ±0.42 ^g
C 18:1	18.95±0.09 ^a	19.3 ±0.45 ^b	21.15±0.11 ^c	23.29±0.34 ^d	25.27±0.27 ^e	23.84±0.26 ^f	25.47±0.57 ^g
C 18:2	15.69±0.07 ^a	15.29±0.10 ^b	15.88±0.21 ^c	15.39±0.14 ^d	15.62±0.25 ^e	15.82±0.15 ^f	15.44±0.28 ^d
C 18:3	55.47±2.11 ^a	54.56±2.23 ^b	51.72±0.52 ^c	49.86±1.92 ^d	46.43±2.74 ^e	48.24±0.58 ^f	46.37±1.97 ^e
C 20:0	0.24±0.01	0.15±0.00	0.31±0.01	0.24±0.02	0.29±0.00	0.26±0.01	0.21±0.02
C 20:1	0.16±0.02	0.16±0.01	0.17±0.01	0.16±0.01	0.17±0.01	0.18±0.00	0.17±0.01
C 22:0	0.16±0.00	0.16±0.02	0.24±0.00	0.19±0.02	0.30±0.01	0.27±0.02	0.22±0.01
C 24:0	0.12±0.01	0.17±0.01	0.21±0.02	0.19±0.01	0.28±0.02	0.23±0.01	0.20±0.01
UFA	90.27 ^a	89.39 ^b	88.92 ^c	88.70 ^c	87.39 ^d	88.08 ^e	87.45 ^d

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir.

a-g: aynı saurda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3).

UFA: doymamış yağ asidi

TR 73572 ve TR 77705 filizlerinin α -linolenik asit içerikleri filiz hasad günleri bazında karşılaştırıldığında filizlerin ilk hasad günü olan 5. günde en yüksek düzeydedir ve 5. gün ile diğer günler arasında önemli fark vardır ($p<0,05$). Filizlenmenin 5. gününde TR 73572 ve TR 77705 filizlerinin α -linolenik asit içerikleri sırasıyla %52.58 ve %45.15 düzeyinde olup söz konusu çeşitler arasında da fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Filizlenme işlemi süresince her iki çeşidin de α -linolenik asit içerikleri 11. güne kadar bir düşme göstermiş olup 13. günde tekrar artmaya başlamıştır (Çizelge 15 ve 16).

Wanasundara et al. (1999a) yaptıkları çalışmada keten tohumunu 8 gün süreyle filizlendirmişler ve keten tohumunda %63.6 oranında bulunan α -linolenik yağ asidinin filizlerde 8. günün sonunda %58.1 olduğunu saptamışlardır. Tohumda yüksek oranda bulunan α -linolenik yağ asidinin filizlenme süresince filizlerde de diğer yağ asitlerine oranla yüksek düzeyde bulunduğunu belirtmişlerdir.

Çizelge 15. TR 77705 keten tohumu filizinin yağ asidi kompozisyonu

Yağ asitleri	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
C_{16:0}	5.77±0.69 ^a	6.47±0.59 ^b	16.45±0.93 ^c	16.73±0.56 ^d	12.25±0.48 ^e
C_{18:0}	4.43±0.62 ^a	5.46±0.51 ^b	9.22±0.87 ^c	11.68±0.51 ^d	9.33±0.86 ^e
C_{18:1}	19.58±0.27 ^a	17.65±0.39 ^b	15.05±0.44 ^c	20.69±0.86 ^d	21.96±0.55 ^e
C_{18:2}	17.64±0.36 ^a	23.77±0.68 ^b	31.52±0.23 ^c	23.84±0.49 ^d	25.62±0.64 ^e
C_{18:3}	52.58±1.48 ^a	46.55±1.32 ^b	27.77±0.68 ^c	26.77±0.37 ^d	30.74±0.77 ^e
UFA	89.80 ^a	87.97 ^b	74.34 ^c	71.30 ^d	78.32 ^e

Sonuçlar ($\pm$ standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-e: aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

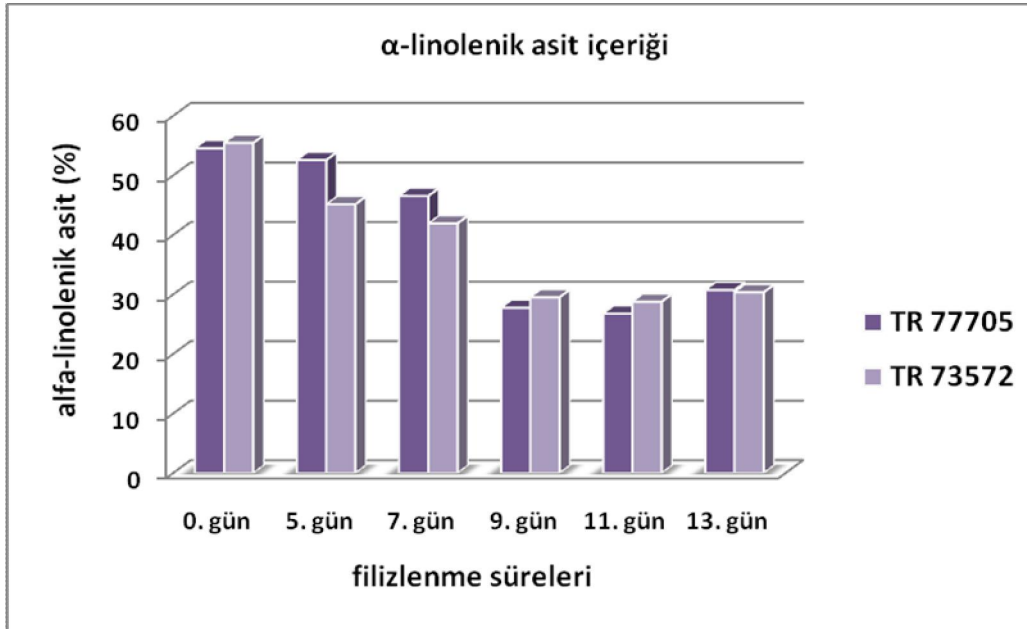
Çizelge 16. TR 73572 keten tohumu filizinin yağ asidi kompozisyonu

Yağ	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
C_{16:0}	7.11±0.78 ^a	7.66±0.53 ^b	18.60±0.34 ^c	18.96±0.65 ^d	15.62±0.47 ^e
C_{18:0}	6.70±0.84 ^a	7.89±0.88 ^b	8.76±0.59 ^c	10.50±0.68 ^d	8.78±0.55 ^c
C_{18:1}	26.02±0.19 ^a	24.08±0.24 ^b	15.91±0.37 ^c	16.06±0.29 ^c	16.9±0.45 ^d
C_{18:2}	15.03±0.31 ^a	18.45±0.17 ^b	27.20±0.74 ^c	26.13±0.81 ^d	28.33±0.46 ^e
C_{18:3}	45.15±1.22 ^a	41.93±1.25 ^b	29.53±0.79 ^c	28.78±0.54 ^d	30.36±0.29 ^e
UFA	86.20 ^a	84.46 ^b	72.64 ^c	70.97 ^d	75.59 ^e

Sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-e: aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Şekil 18’de keten tohumu (0. gün) ve keten tohumu filizlerinin filizlenme süresince α -linolenik asit içeriklerindeki değişim görülmektedir. TR 73572 ve TR 77705 keten tohumu çeşitlerinin α -linolenik asit içerikleri sırasıyla %55.47 ve 54.56 düzeyindedir ve filizlenme işlemi ile keten tohumlarının α -linolenik asit içeriklerinde düşme gözlenmiştir.



Şekil 18. Keten tohumu (0. gün) ve keten tohumu filizlerinin filizlenme süresince α -linolenik asit içeriklerinin karşılaştırılması

Keten tohumlarının ve filizlerinin doymamış yağ asidi içerikleri

Çalışmamızda kullanılan yedi yerel çeşit keten tohumunun doymamış yağ asidi (UFA) içerikleri de oldukça yüksektir ve %87,39-90,27 arasında değişmekte olup (Çizelge 14) çeşitlerin doymamış yağ asidi içerikleri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). TR 73572 ve TR 77705 çeşitlerinin doymamış yağ asidi içerikleri de diğer çeşitlerden daha yüksektir ve bu çeşitlerle diğer çeşitler arasındaki fark önemlidir ($p<0,05$). Ayrıca TR 73572 ve TR 77705 çeşitleri arasındaki farkın da önemli olduğu ($p<0,05$) saptanmıştır.

Wakjira et al. (2004) keten tohumlarının doymamış yağ asidi içeriklerinin çeşide bağlı olarak %85.9-90.6 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Krist ve ark. (2006) ise inceledikleri keten tohumu yağlarının %85'in üzerinde doymamış yağ asidi içerdiğini bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada da keten tohum yağlarının doymamış yağ asidi içeriklerinin %89.46-91.61 arasında değiştiği saptanmıştır (Choo et al., 2007). Bozan and Temelli (2008) ise yaptıkları çalışmada keten tohumu yağının %88,4 oranında doymamış yağ asidi içerdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda TR 73572 ve TR 77705 keten tohumu çeşitlerinin filizlendirilmesi ile tohumların doymamış yağ asidi içeriklerinde düşme gözlenmiştir (Çizelge 15 ve 16). TR 73572 ve TR 77705 filizlerinin doymamış yağ asidi içerikleri 5. günde en yüksek düzeydedir ve 5. gün ile diğer günler arasında önemli bir fark vardır. Filizlenmenin 5. gününde TR 73572 ve TR 77705 filizlerinin doymamış yağ asidi içerikleri sırasıyla %89.80 ve %86.20 değerinde olup çeşitler arasındaki fark önemli ($p<0,05$) bulunmuştur. Filizlendirme işlemi süresince her iki çeşidin de α -linolenik asit içerikleri 11. güne kadar bir düşme göstermiş olup 13. günde tekrar artmaya başlamıştır. Wanasundara et al. (1999a) 8 gün süreyle filizlendirilen keten tohumu ile yaptıkları çalışmada keten tohumu filizlerinin 8. günün sonunda %89 oranında doymamış yağ asitleri içerdiğini saptamışlardır.

Keten tohumlarının ve filizlerinin linoleik asit içerikleri

Çalışmamızda yedi yerel çeşit keten tohumu yağının linoleik asit ($C_{18:2}$) içeriklerinin %15.29-15.88 arasında değiştiği saptanmıştır (Çizelge 14). Diğer çalışmalar incelendiğinde; Wakjira et al. (2004) keten tohumu yağlarının %10.9-16.1 arasında linoleik asit, Krist et al. (2006) keten tohumu yağının %20'in altında linoleik asit içerdiğini, Bozan and Temelli (2008) ise keten tohumu yağının %13.96 linoleik asit içerdiğini bildirmektedir.

TR 73572 ve TR 77705 çeşitlerinin linoleik asit içerikleri sırasıyla %15.69 ve 15.29 arasındadır ve söz konusu çeşitlerin filizlendirilmesi ile tohumların linoleik asit içeriklerinde oldukça yüksek artış gözlenmiştir. TR 73572 filizinin linoleik asit içeriği filizlenme süresince artarak 13. günde en yüksek düzeye çıkmıştır ve 13. gün ile diğer günler arasında istatistiki açıdan önemli bir fark vardır ($p<0,05$). Filizlenmenin 13. gününde TR 73572 filizlerinin linoleik asit içeriği %28.33 olarak saptanmıştır. TR 77705 filizinin linoleik asit içeriği ise filizlenme süresince artarak 9. günde en yüksek düzeye ulaşmış ve 9. gün ile diğer günler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). 9 günlük TR 77705 filizlerinde linoleik asit içeriği %31.52 olarak saptanmıştır. Ayrıca TR 73572 ve TR 77705 filizleri arasında da fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Wanasundara et al. (1999a) yaptıkları çalışmada keten tohumunu 8 gün süreyle filizlendirmişler ve filizlerin linoleik asit içeriğini 8. günün sonunda %18.5 olduğunu saptamışlardır.

Keten fohumlarının ve filizlerinin oleik asit içerikleri

Yedi yerel çeşit keten tohumu çeşidinin oleik asit ($C_{18:1}$) içerikleri ise %18.95-25.47 arasında değişmekte (Çizelge 14) ve tohum çeşitleri arasındaki bu farkın istatistiki açıdan önemli olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Yapılan diğer çalışmalarda da keten tohumu yağının oleik asit içeriğinin %14.8-29.3 arasında olduğu bildirilmiştir (Wakjira et al., 2004; Krist et al., 2006; Bozan and Temelli 2008). Keten tohumu yağlarının α -linolenik asit içerikleri artarken oleik asit içeriklerinde düşme gözlenmektedir. TR 73572 en yüksek α -linolenik asit (%55.47) ve en düşük oleik asit (%18.95) içeriğine sahip keten tohumu iken TR 77416 çeşidi en düşük α -linolenik asit (%46.37) ve en yüksek oleik asit (%25.47) içeriğine sahip keten tohumudur. Choo et al. (2007) de yaptıkları çalışmada en düşük α -linolenik asit (%51.80) içeriğine sahip keten tohumu yağının en yüksek oleik asit (%22.21) içeriğine sahip yağ olduğunu saptamışlardır. Keten tohumu yağının α -linolenik asit içeriğinin artışıyla oleik asit içeriğinin azalması durumunun Bhattı (1995) tarafından da gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

TR 73572 ve TR 77705 çeşitlerinden elde edilen filizlerin oleik asit miktarlarının tohumlardan daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 15 ve 16). TR 73572 keten tohumu çeşidi filizinin oleik asit içeriği 5. günde en yüksek düzeyde (%26.02) olup filizlenme süresince azalmaktadır. 5 günlük filizler ile diğer günlerin oleik asit içerikleri arasında önemli bir fark bulunmuştur ($p<0,05$). TR 77705 filizinin oleik asit içeriği ise 13. günde en yüksek düzeye çıkmıştır ve

13. gün ile diğer günler arasındaki fark istatistiki açıdan önemlidir ($p<0,05$). Ayrıca TR 73572 ve TR 77705 çeşitlerinin filizleri arasında da fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Wanasundara et al. (1999a) keten tohumunu 8 gün süreyle filizlendirmişler ve filizlerin 8. günün sonunda %12.1 oleik asit içerdiğini saptamışlardır.

Keten fohumlarının ve filizlerinin palmitik asit içerikleri

Çalışmamızda yedi yerel çeşit keten tohumu yağının palmitik asit içerikleri %5.24-6.50 arasında değişmektedir. TR 73572 ve TR 77705 keten tohumları sırasıyla %5.24 ve 5.66 palmitik asit içeriğine sahip olup (Çizelge 14) söz konusu çeşitlerin filizlendirilmesi sonucunda ise filizlerin palmitik asit içeriklerinde oldukça yüksek artış olmuştur (Çizelge 15 ve 16). TR 73572 ve TR 77705 çeşitlerinden elde edilen filizlerin en yüksek palmitik asit içerikleri 11. günde saptanmıştır ve her iki çeşit için de 11. gün ile diğer günler arasında önemli fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). TR 73572 ve TR 77705 çeşitlerinin filizlerinin 11. günde palmitik asit içerikleri sırasıyla %18.96 ve %16.73 düzeylerinde olup çeşitler arasında istatistiksel olarak fark önemlidir ($p<0,05$). Filizlerde doymamış yağ asitleri miktarının azalmasıyla doymuş yağ asitleri miktarında artma olduğu görülmüş olup literatürde taranan çalışmalarda da benzer bulgular saptanmıştır (Wanasandura et al., 1999a; Hahm et al., 2009). Wanasundara et al (1999a) yaptıkları çalışmada 8 günlük keten tohumu filizlerinin %6.1 palmitik asit içerdiğini bildirmişlerdir.

Keten fohumlarının ve filizlerinin stearik asit içerikleri

Çalışmamızda Çizelge 14'de görüldüğü gibi keten tohumu çeşitlerimizin stearik asit içerikleri %3.18-4.57 arasında değişmekte olup TR 73572 ve TR 77705 keten tohumları en düşük stearik asit içeriğine sahip keten tohumlarıdır. Söz konusu çeşitlerin filizlendirilmesi ile her iki çeşidin filizlerinin stearik asit içerikleri artmış olup en yüksek değer 11 günlük filizlerde saptanmıştır (Çizelge 15 ve 16) ve her iki çeşit için de 11. gün diğer çeşitlerden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). TR 73572 tohumunun %3.18 olan stearik asit içeriği filizlendirme işlemi ile artmış ve filizlendirmenin 11. gününde %10.50 değerine ulaşmıştır. TR 77705 tohumunun %3.48 olan stearik asit içeriği de filizlendirme işlemi ile artmış ve filizlendirmenin 11. gününde %11.68 değerine yükselmiştir ve söz konusu çeşitler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Wanasundara et

al (1999a) 8 gün süreyle filizlendirdikleri keten tohumu filizlerinin 8. günün sonunda %3.1 stearik asit içerdiğini bildirmişlerdir.

3.4. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Toplam Fenolik Madde İçeriği

Yedi yerel çeşit keten tohumunun fenolik madde içeriği yağı alınmış keten tohumu ununda serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde içeriği olarak Çizelge 17’de verilmektedir.

Çizelge 17. Yağı alınmış keten tohumu unlarında kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarları

Yerel keten tohumu çeşitleri	Fenolik madde miktarları (mg ferulik asit/100 g keten tohumu unu)		
	Serbest	Esterleşmiş	Toplam
TR 77705	249.33 ± 11.10 ^a	959.87 ± 38.20 ^a	1209.20 ^a
TR 37060	112.48 ± 8.13 ^b	617.03 ± 31.59 ^b	729.51 ^b
TR 42077	125.52 ± 6.62 ^b	628.31 ± 30.60 ^b	753.83 ^b
TR 77418	134.52 ± 5.78 ^b	624.27 ± 26.53 ^b	758.79 ^b
TR 73572	160.91 ± 9.40 ^c	681.55 ± 35.98 ^c	842.46 ^c
TR 32204	125.52 ± 7.54 ^b	618.12 ± 37.77 ^b	743.64 ^b
TR 77416	85.78 ± 3.63 ^d	488.70 ± 28.78 ^d	574.48 ^d

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-d: aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Yağı alınmış keten tohumu unları fenolik madde içeriği açısından incelendiğinde, bütün çeşitlerde esterleşmiş fenolik madde miktarları serbest fenolik madde miktarlarından oldukça yüksek saptanmıştır. Çizelge 17’de görüldüğü gibi, yağsız keten tohumu unlarında toplam fenolik madde miktarları ferulik asit eşdeğeri üzerinden 574.48-1209.20 mg/100 g arasında değişmektedir. Esterleşmiş ve serbest fenolik madde miktarları ise sırayla 488.7-959.87 ve 85.78-249.33 mg/100 g arasında bulunmuştur. Keten tohumlarının serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarlarına kültürel çeşitliliğinin etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (p<0,05). Yağsız keten tohumu ununda serbest ve esterleşmiş fenolik madde miktarları en yüksek TR 77705 çeşidinde saptanmış olup söz konusu çeşit fenolik madde içeriği açısından diğer çeşitlerden istatistiksel

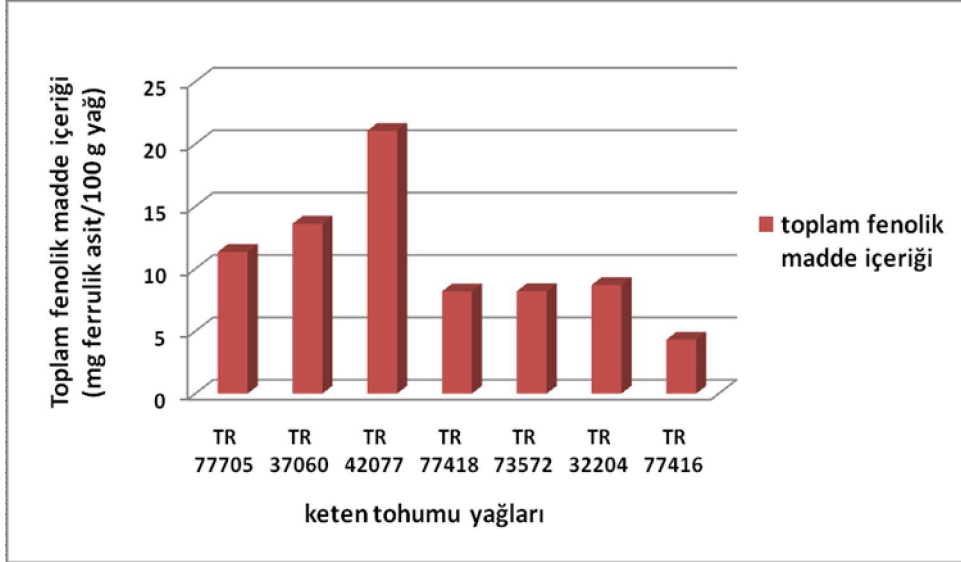
farklılık göstermektedir ($p<0,05$). TR 73572 çeşidi ise ikinci en yüksek fenolik madde içeriğine sahip keten tohumu olup serbest ve toplam fenolik madde içerikleri açısından diğer çeşitler ile arasında önemli farklılık göstermektedir ($p<0,05$). TR 77705 ve TR 73572 çeşitleri arasında da serbest, esterleşmiş ve toplam madde miktarları açısından önemli fark bulunmuştur ($p<0,05$). TR 77416 keten tohumu ise çeşitler arasında en düşük serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde içeriğine sahip olup diğer çeşitlerden istatistiksel anlamda farklı bulunmuştur ($p<0,05$).

Keten tohumu çeşitli fenolik asitleri ve bunların glikozidik formlarını yapısında taşımakta olup keten tohumunun fenolik asit içeriğindeki çeşitliliğin ve bulunma düzeylerindeki farklılığın mevsimsel etkilerden ve kültürel çeşit farklılığından kaynaklandığı belirtilmektedir. Dabrowski and Sosulski (1984) kabuğu ve yağı alınmış keten tohumunun toplam ve esterleşmiş fenolik içeriklerinin ferulik asit eşdeğeri üzerinden sırasıyla 81 ve 73.9 mg/100 g olduğunu saptamıştır. Wanasundara and Shaidi (1994) ise yağı alınmış keten tohumu küspelerinin metanol ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarlarını ferrulik asit eşdeğeri üzerinden 130-220 mg/100g arasında saptamışlardır.

Oomah et al. (1995) keten tohumlarının toplam fenolik madde miktarının 800-1000 mg ferulik asit/100 g, serbest fenolik madde miktarının 300-500 mg ferrulik asit/100 g arasında değiştiğini ve esterleşmiş fenolik madde miktarının ortalama 500 mg ferulik asit/100 g olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar esterleşmiş fenoliklerin toplam fenolik madde miktarının %48-66'sını oluşturduğunu ve kültürel çeşitliliğe bağlı olmadığını; keten tohumunun serbest ve toplam fenolik madde miktarına ise ekim yılının, kültür çeşitliliğinin ve daha düşük oranda bölgenin etkisinin olduğunu bildirmişlerdir.

Oomah and Mazza (1997) keten tohumunda toplam fenolik madde miktarını ferrulik asit eşdeğeri üzerinden 1314 mg/100 g, yağı alınmış keten tohumunda ise 1619 mg/100 g olarak saptamışlardır. Velioğlu et al. (1998) keten tohumunda asidik metanolla ekstraksiyon sonucunda toplam fenolik madde miktarını 509 mg ferrulik asit/100 g olarak bulmuşlardır. Bozan and Temelli (2008) ise 100 gram keten tohumunda serbest fenolikleri 383 mg, esterleşmiş fenolikleri 1287 mg ve toplam fenolik madde miktarını ise 1670 mg ferulik asit olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Araştırmada kullanılan yedi çeşit keten tohumunun yağlarında saptanan toplam fenolik madde miktarları karşılaştırmalı olarak Şekil 19'da gösterilmektedir.



Şekil 19. Keten tohumu yağlarında kuru madde bazında toplam fenolik madde miktarları (mg ferrulik asit /100g yağ)

Keten tohumu yağlarının fenolik madde miktarı keten tohumu ununa kıyasla oldukça düşük saptanmıştır. Keten tohumu yağlarında ferrulik asit eşdeğeri olarak toplam fenolik madde miktarları kuru madde bazında 4.32-21.35 mg/100 g arasında değişmektedir. Keten tohumu yağında toplam fenolik madde miktarı en yüksek TR 42077 keten çeşidinde saptanmış olup söz konusu çeşit ile diğer çeşitler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

Choo et al. (2007) marketlerde satılan ve %2 oranında keten tohumu küspesi içeren yedi adet keten tohumu yağının metanol ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarının ferrulik asit eşdeğeri üzerinden 76.8-307.3 mg/100 g arasında değiştiğini ve yağ çeşitleri arasında önemli fark bulunduğunu saptamışlardır. Fakat, fenolik bileşiklerin yağda çözünmediği göz önünde bulundurulduğunda söz konusu çalışmada keten tohumu yağında saptanmış toplam fenolik madde miktarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

TR 77705 ve TR 73572 çeşitlerinden üretilen filizlerin filizlenme süresince fenolik madde miktarlarındaki değişimler sırasıyla Çizelge 18 ve 19'da gösterilmektedir. TR 77705 ve TR 73572 keten tohumu filizlerinin serbest, bağlı

ve toplam fenolik madde miktarları filizlenme süresine göre önemli düzeyde ($p<0,05$) değişkenlik göstermektedir (Çizelge 18 ve 19).

Çizelge 18. TR 77705 filizinde kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarları (mg ferulik asit /100 g keten tohumu filizi)

Fenolik madde miktarları	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
Serbest	451.80±19.25 ^a	509.12±31,06 ^a	684.31±35.45 ^b	711.74±29.61 ^b	998.27±62.29 ^c
Esterleşmiş	1223.87±61.32 ^a	1109.73±46,50 ^a	1648.95±76.68 ^b	1624.94±66.95 ^b	1946.97±78.66 ^c
Toplam	1675.67 ^a	1618.85 ^a	2333.26 ^b	2336.68 ^b	2945.24 ^c

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-c: aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Filizlenme işlemi ile TR 77705 tohumunun serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde içeriklerinde önemli miktarda ($p<0,05$) artma saptanmış olup filizlerin esterleşmiş fenolik madde miktarı serbest fenolik madde miktarından daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 18). TR 77705 keten tohumu filizlerinin serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarları filizlenmenin 13. gününde en yüksek düzeye ulaşmış olup 13. gün ile diğer günler arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli görülmüştür ($p<0,05$). TR 77705 keten tohumunun fenolik madde miktarı 13 günlük filizlerde 998.27 mg ferulik asit/100 g değerine ulaşırken, tohumun esterleşmiş fenolik madde miktarı 1946.97 mg ferulik asit/100 g'a yükselmiştir. TR 77705 keten tohumunun 697.83 mg/100 g olan toplam fenolik madde içeriği de 4 kat artarak 2945.24 mg ferulik asit/100 g değerine ulaşmıştır.

Filizlenme işlemi ile TR 73572 tohumlarının serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarlarında önemli miktarda ($p<0,05$) artış olmuş ve filizlerin esterleşmiş fenolik madde miktarı serbest fenolik madde miktarından daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 19). TR 73572 keten tohumu filizlerinin serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde içerikleri filizlenmenin 13. gününde en yüksek düzeye ulaşmış olup 13. gün ile diğer günler arasında istatistiki anlamda fark önemlidir ($p<0,05$). TR 73572 keten tohumunun serbest fenolik madde miktarı 13 günlük filizlerde 1120.25 mg ferulik asit/100 g değerine ulaşırken, tohumun esterleşmiş fenolik madde miktarı 2276.32 mg ferulik asit/100 g değerine yükselmiştir. TR 73572 keten tohumunun 462.76 mg ferulik asit/100 g olan toplam fenolik madde

miktarı (Şekil 20) da 7.3 kat artarak 3396.57 mg ferulik asit/100 g değerine ulaşmıştır.

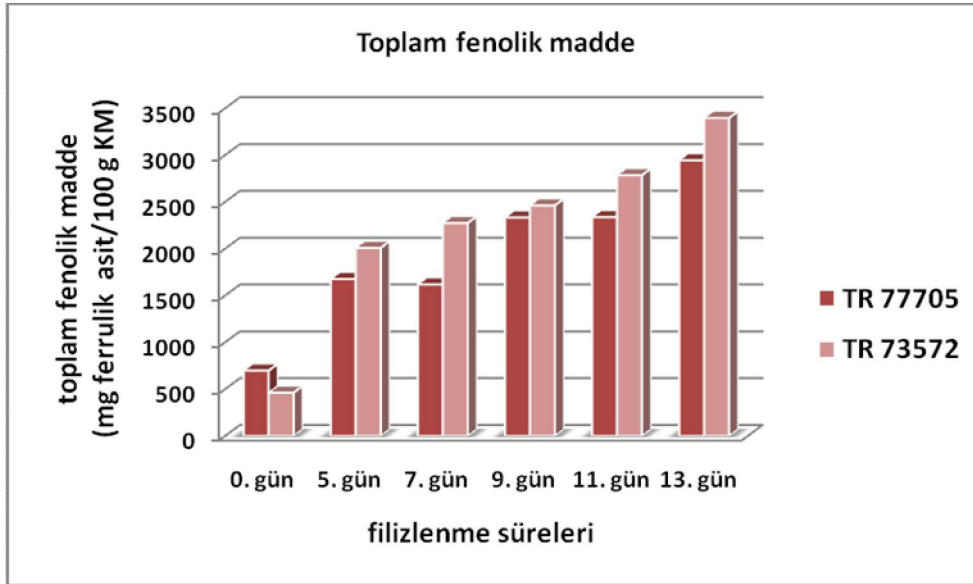
Çizelge 19. TR 73572 filizinde kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam fenolik madde miktarları (mg ferrulik asit /100 g keten tohumu filizi)

Fenolik madde miktarı	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
Serbest	571.68±28.64 ^a	630.63±39.10 ^a	707.43±29.85 ^b	876.18±43.02 ^c	1120.25±60.72 ^d
Esterleşmiş	1437.27±74.59 ^a	1643.68±88.43 ^b	1754.29±95.26 ^b	1908.38±91.22 ^b	2276.32±117.23 ^c
Toplam	2008.95 ^a	2274.31 ^b	2461.72 ^b	2784.56 ^c	3396.57 ^d

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-d: aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Şekil 20’de keten tohumu (0. gün) ve keten tohumu filizlerinin filizlenme süresince toplam fenolik madde içeriklerindeki değişim görülmektedir.



Şekil 20. Keten tohumu (0. gün) ve keten tohumu filizlerinin filizlenme süresince toplam fenolik madde miktarlarının karşılaştırılması

Şekil 20’den görüldüğü gibi TR 77705 tohumunun toplam fenolik madde miktarı TR 73572 keten tohumuna nazaran daha yüksek (p<0,05) olmasına karşın

TR 73572 filizlerinin toplam fenolik madde miktarı daha yüksek olarak saptanmıştır ($p<0,05$). TR 77705 ve 73572 filizlerinin toplam fenolik madde içeriklerine kültürel çeşitliliğin etkisinin 5., 7., 9. ve 13. günlerde önemli olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Literatürde keten tohumu filizlerinde toplam fenolik madde miktarı ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

3.5. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin Toplam Flavonoid İçeriği

Yerel keten tohumu çeşitlerinin yağı alınmış ununda saptanan serbest, bağlı ve toplam flavonoid miktarları Çizelge 20’de; keten tohumu yağlarında saptanan toplam flavonoid miktarları ise Şekil 21’da görülmektedir.

Çizelge 20. Yağı alınmış keten tohumu unlarında kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları

Keten tohumu unları	Flavonoid miktarları (mg luteolin/100 g un)		
	Serbest	Esterleşmiş	Toplam
TR 77705	16.41±0.86 ^a	11.58±0.66 ^a	28.04 ^a
TR 37060	7.94±0.46 ^b	12.29±0.61 ^b	20.23 ^b
TR 42077	14.79±1.02 ^c	11.17±0.73 ^b	25.96 ^a
TR 77418	8.16±0.33 ^b	13.88±0.86 ^c	22.04 ^c
TR 73572	19.08±1.25 ^d	14.57±0.79 ^c	33.65 ^d
TR 32204	8.39±0.35 ^b	13.63±0.90 ^c	22.02 ^c
TR 77416	5.48±0.19 ^d	8.13±0.34 ^d	13.61 ^e

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

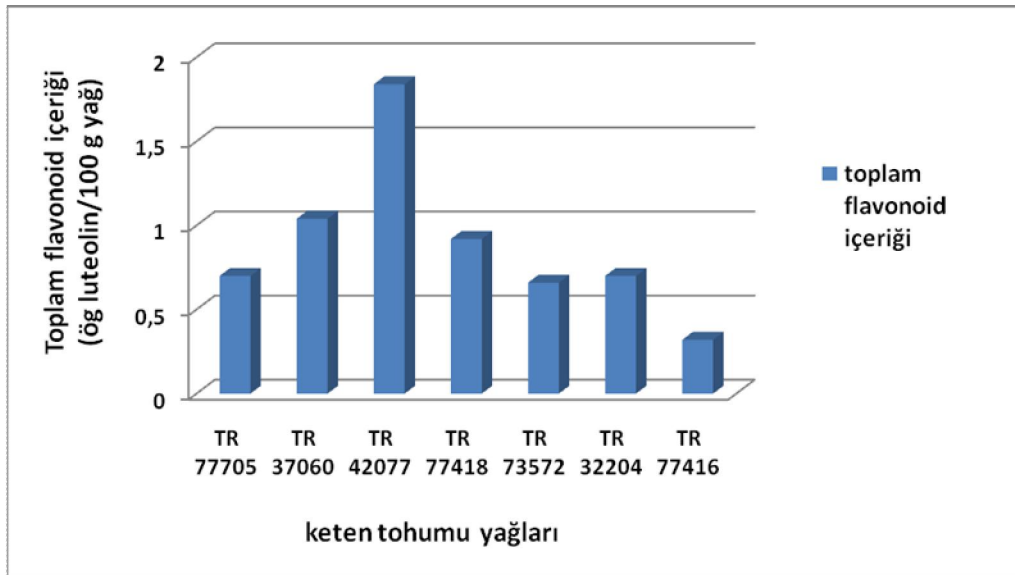
a-e aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Çalışmamızda yağsız keten tohumu unları flavonoid miktarı açısından incelendiğinde TR 77705, TR 42077 ve TR 73572 çeşitlerinde serbest flavonoid miktarı esterleşmiş flavonoid miktarından biraz daha yüksek saptanmıştır. Çizelge 20’de görüldüğü gibi yağsız keten tohumu unlarında toplam flavonoid miktarları luteolin eşdeğeri üzerinden 13.61-33.65 mg/100 g arasında değişmekte olup esterleşmiş ve serbest flavonoid miktarları ise sırayla 8.13-14.57 mg/100 g ve 5.48-19.08 mg/100 g arasında bulunmuştur. Keten tohumlarının serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarlarına kültürel çeşitliliğin etkisi önemlidir

($p<0,05$). Yağsız keten tohumu ununda serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları en yüksek TR 73572 çeşidinde saptanmış olup söz konusu çeşit serbest ve toplam flavonoid içeriği açısından diğer çeşitlerden farklılık göstermektedir ($p<0,05$). TR 77705 çeşidi ise ikinci en yüksek toplam flavonoid miktarına sahip keten tohumu olup serbest flavonoid miktarı açısından diğer çeşitler ile arasında istatistiki olarak fark vardır ($p<0,05$). Toplam flavonoid miktarı açısından ise TR 42077 çeşidi hariç diğer çeşitler ile arasında önemli fark bulunmuştur ($p<0,05$). TR 77705 ve TR 73572 çeşitleri arasında da serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları açısından önemli fark saptanmıştır ($p<0,05$).

Oomah et al. (1996) 4 farklı keten tohumu çeşidini 4 yıl (1989-1993) boyunca 4 farklı bölgeye ekmişlerdir. Keten tohumunun toplam flavonoid miktarına kültür çeşitliliğinin ve çevrenin etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Keten tohumlarının metanol ekstraktlarında flavonoid miktarlarının luteolin eşdeğeri üzerinden 35-71 mg/100g arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Şekil 21’de görüldüğü gibi keten tohumu yağlarının toplam flavonoid içeriği keten tohumu ununa kıyasla oldukça düşük bulunmuştur. Bu durum fenolik bileşiklerin yağda çözünmemesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 21. Keten tohumu yağlarında kuru madde bazında toplam flavonoid miktarları (mg luteolin/100g yağ)

Şekil 21’de görüldüğü gibi keten tohumu yağlarında luteolin eşdeğeri olarak toplam flavonoid miktarları 0.32-1.84 mg/100 g arasında değişmektedir. Keten tohumu yağında toplam flavonoid miktarı en yüksek 42077 keten çeşidinde

saptanmış olup söz konusu çeşit ile diğer çeşitler arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Choo ve ark. (2007) %2 keten tohumu küspesi içeren yedi adet keten tohumu yağından metanol çözeltisi kullanarak elde ettikleri ekstraktlarda toplam flavonoid miktarını luteolin eşdeğeri üzerinden 12,7-25,6 mg/100 g arasında değiştiğini saptamışlardır. Fakat, flavonoidlerin yağda çözünmediği göz önünde bulundurulduğunda söz konusu çalışmada keten tohumu yağında saptanmış toplam fenolik madde miktarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

TR 77705 ve TR 73572 çeşitlerinden üretilen filizlerin filizlenme süresince flavonoid miktarlarındaki değişimler sırasıyla Çizelge 21 ve 22’de gösterilmektedir. TR 77705 keten tohumu filizlerinin de serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları filizlenme süresine göre önemli düzeyde değişkenlik göstermekte ($p<0,05$) olup bu değerler Çizelge 21’de gösterilmektedir.

Çizelge 21. TR 77705 filizinde kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları (mg luteolin/100 g keten tohumu filizi)

Flavonoid miktarlar	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
Serbest	150.52±8.10 ^a	106.08±7.75 ^b	204.68±12.59 ^c	380.44±19.25 ^d	420.17±17.82 ^e
Esterleşmiş	80.65±4.15 ^a	59.73±3.63 ^b	103.18±5.17 ^c	72.13±4.39 ^d	123.05±5.64 ^e
Toplam	231.17 ^a	165.81 ^b	307.86 ^c	452.57 ^d	543.22 ^e

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-e aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Filizlendirme işlemi ile TR 77705 tohumların serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarlarında önemli düzeyde ($p<0,05$) artış olmuş ve filizlerin serbest flavonoid miktarının esterleşmiş flavonoid miktarından daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 21). TR 77705 keten tohumu filizlerinin serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları filizlenmenin 13. gününde en yüksek düzeye ulaşmış olup 13. gün ile diğer günler arasında önemli bir fark bulunmaktadır ($p<0,05$). TR 77705 keten tohumunun serbest flavonoid miktarı 13 günlük filizlerde 420.17 mg luteolin/100 g değerine ulaşırken, esterleşmiş flavonoid miktarı 123.05 mg luteolin/100 g düzeyine yükselmiştir. TR 77705 keten tohumunun 16.20 mg luteolin/100 g olan toplam flavonoid içeriği (Şekil 22) de 33.5 kat artarak 13 günlük filizlerde 543.22 mg luteolin/100 g değerine ulaşmıştır.

TR 73572 keten tohumu filizlerinin serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları filizlenme süresine göre filizlerde önemli düzeyde değişkenlik göstermekte ($p<0,05$) olup bu değerler Çizelge 22’de gösterilmektedir.

Çizelge 22. TR 73572 filizinde kuru madde bazında serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları (mg luteolin/100 g keten tohumu filizi)

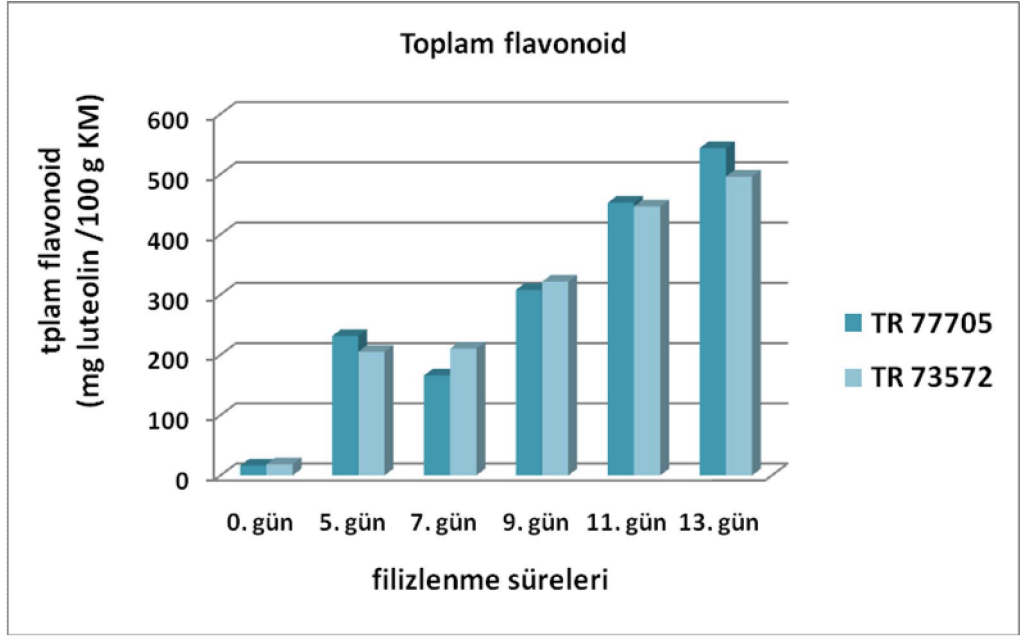
Flavonoid miktarları	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
Serbest	123.73±6.40 ^a	126.88±7.82 ^a	221.81±11.93 ^b	315.97±19.40 ^c	352.65±18.30 ^d
Esterleşmiş	81.49±5.01 ^a	83.80±4.27 ^a	99.77±6.07 ^b	130.37±6.65 ^c	143.30±8.90 ^d
Toplam	205.22 ^a	210.68 ^a	321.58 ^b	446.34 ^c	495.95 ^d

sonuçlar ($\pm$ standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-d aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Filizlenme işlemi ile TR 73572 tohumların serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarlarında önemli düzeyde ($p<0,05$) artış olmuş ve filizlerin serbest flavonoid miktarı esterleşmiş flavonoid miktarından daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 22). TR 73572 keten tohumu filizlerinin serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları filizlenmenin 13. gününde en yüksek düzeye ulaşmış olup 13. gün ile diğer günler arasında önemli bir fark saptanmıştır ($p<0,05$). TR 73572 keten tohumunun serbest flavonoid miktarı 13 günlük filizlerde 352.65 mg luteolin/100 g değerine ulaşırken, tohumun esterleşmiş flavonoid miktarı 143.30 mg luteolin/100 g düzeyine yükselmiştir. TR 73572 keten tohumunun 18.48 mg luteolin/100 g olan toplam flavonoid içeriği (Şekil 22) de 26.8 kat artarak 495.95 mg luteolin/100 g değerine ulaşmıştır.

Şekil 22’de keten tohumu (0. gün) ve keten tohumu filizlerinin filizlenme süresince kuru maddede toplam flavonoid miktarlarındaki değişim görülmektedir.



Şekil 22. Keten tohumu (0. gün) ve keten filizinin filizlenme süresince kuru madde bazında toplam flavonoid miktarlarının karşılaştırılması

Şekil 22’den görüldüğü gibi keten tohumu filizlerinin toplam flavonoid miktarına kültürel çeşitliliğinin etkisinin önemli olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). TR 73572 tohumunun flavonoid miktarı TR 77705 keten tohumuna nazaran daha yüksek ($p<0,05$) olmasına karşın TR 77705 filizlerinin toplam flavonoid miktarı açısından daha zengin ($p<0,05$) olması dikkat çekicidir (Şekil 22). Her iki tohum çeşidinde de serbest, esterleşmiş ve toplam flavonoid miktarları 13. günde en yüksek düzeye ulaşmıştır.

3.6. Keten Tohumlarının ve Filizlerinin SDG Lignan İçeriği

Yerel keten tohumu çeşitlerinin yağı alınmış ununda saptanan SDG lignan miktarları Çizelge 23’de görülmektedir. Çizelge 23’de görüldüğü gibi yerel keten tohumlarının SDG lignan miktarları %5.87-23.84 mg/g değerleri arasında değişmekte olup tohumların SDG lignan içeriğine kültürel çeşitliliğin önemli etkisinin olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). TR 77705 ve TR 73572 çeşitleri en yüksek SDG lignan içeriğine sahip olup bu iki çeşit arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). TR 73572 çeşidinin SDG lignan içeriği TR 77705 çeşidinden yaklaşık iki kat daha yüksektir. Söz konusu çeşitler ile diğer çeşitler arasında da fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Keten tohumu yağında SDG lignan miktarları

HPLC/MS-MS cihazında 0,005 ppm olan teşhis limitinin altında kaldığı için saptanamamıştır.

Çizelge 23. Yağsız keten tohumu unlarında kuru madde bazında SDG lignan miktarları

Keten tohumu unları	SDG Lignan miktarları (mg/g)
TR 77705	23.84±1.91 ^a
TR 37060	8.63±0.99 ^b
TR 42077	10.83±0.77 ^c
TR 77418	10.12±0.48 ^c
TR 73572	11.24±0.18 ^c
TR 32204	9.10±0.15 ^c
TR 77416	5.87±0.69 ^d

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-d aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Keten tohumunun SDG lignan içeriği kültür çeşitliliğine, hasad yılına, hasad yerine göre değişkenlik gösterebilmektedir (Westcott and Muir, 1996; Thompson et al., 1997; Meagher et al., 1999). Yağı alınmış keten tohumu küspesinde SDG lignan miktarı 11.7–24.1 mg/g olarak değişmektedir (Wiesenborn et al., 2003). Madhusudhan et al. (2000) keten tohumu çeşitlerinde SDG lignan miktarını sırasıyla 12.9 ve 14.3 mg/g olarak saptamışlardır. Degenhardt et al. (2002) ise yaptıkları çalışmada keten tohumunun SDG lignan miktarını 5.5 mg/g olarak saptamışlar. Eliasson et al. (2003) 2000 yılına ait 10 çeşit keten tohumunun SDG lignan içeriğinin 13.3-25.9 mg/g arasında değiştiğini; 2001 yılına ait 17 çeşit tohumda ise SDG lignan miktarının 11.9-19.8 mg/g arasında olduğunu bildirmişlerdir ve çeşitler arasında farkın önemli olduğunu belirtmişler. Beejmohun et al. (2007) preslenmiş keten tohumu kekinde SDG lignan bileşiğini 16.1 mg/g olarak saptamışlardır.

TR 77705 ve TR 73572 çeşitlerinden üretilen filizlerin SDG lignan miktarları karşılaştırıldığında, her iki çeşidin filizlerinin SDG lignan içeriklerinin filizlenme süresine (p<0,05) ve kültürel çeşitliliğe (p<0,05) göre önemli düzeyde farklı olduğu görülmektedir (Çizelge 24).

Çizelge 24. Keten tohumu filizlerinin kuru madde bazında SDG lignan içerikleri

Filiz çeşitleri	SDG lignan içerikleri (µg/g keten filizi)				
	5. gün	7. gün	9. gün	11. gün	13. gün
TR 77705	6.26±0.13 ^a	84.95±3.11 ^b	6.09±0.52 ^a	67.73±2.10 ^c	719.02±2.82 ^d
TR 73572	190.06±2.41 ^a	45.46±1.20 ^b	120.42±1.34 ^c	366.49±2.71 ^d	309.66±2.24 ^e

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-e aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

TR 77705 ve TR 73572 çeşitlerinde filizlenme işlemi ile SDG lignan miktarları mg düzeyinden µg düzeyine gerilemiştir. TR 77705 TR ve 73572 çeşitlerinin filizlerinin söz konusu SDG lignan miktarları arasında önemli fark bulunmaktadır (p<0,05). Bu veriler incelendiğinde SDG lignan açısından zengin olan TR 77705 keten tohumunun söz konusu içeriğinin filizlenme işlemi ile oldukça düştüğü görülmekle birlikte diğer çeşide nazaran daha yüksek olduğu saptanmıştır. Literatürde keten tohumu filizlerinde SDG lignan miktarları ile ilgili bir araştırmaya rastlanmamıştır.

3.7. Keten Tohumundan SDG Lignan Bileşiğinin ASE 200 Cihazında Kritik Altı Su Ekstraksiyonu

Çalışmamızda keten tohumunun yapısındaki SDG lignan bileşiğinin ASE 200 cihazında en uygun kritik altı su ekstraksiyonu koşullarının belirlenmesi amacıyla materyal şekli, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, basınç, taze çözgen miktarı ve örnek miktarı parametreleri denenmiştir. Çalışma sonucunda aşağıda verilen bulgulardan da görülebileceği gibi en iyi çalışma materyalinin yağı alınmış parça küspe olduğu belirlenmiş ve ekstraksiyon işleminde etkin faktörlerin ise ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve örnek miktarı olduğu saptanmıştır.

3.7.1. Materyal şeklinin etkisi

ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu işleminde en uygun materyal şeklinin seçimi için öğütülmüş küspe, tane keten tohumu ve parça küspe örneklerine, materyallerin sıcaklıkla nasıl bir değişim göstereceğini belirlemek

amacıyla öncelikle cihazın çalıştığı en düşük sıcaklık olan 40°C’de ekstraksiyon uygulanmıştır (Çizelge 25).

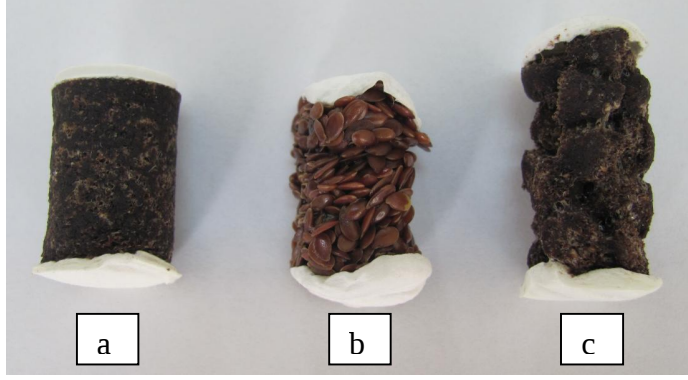
Çizelge 25. ASE 200 cihazında 40°C’de kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan materyal şekilleri ve sabit tutulan faktörler

Değiştirilen Faktör	Sabit tutulan Faktörler				
Materyal şekli	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon süresi (dak.)	Basınç (psi)	Taze çözgen miktarı (%)	Örnek miktarı (g)
●Öğütülmüş küspe ●Tane keten tohumu ●Parça küspe	40	15	1500	40	5

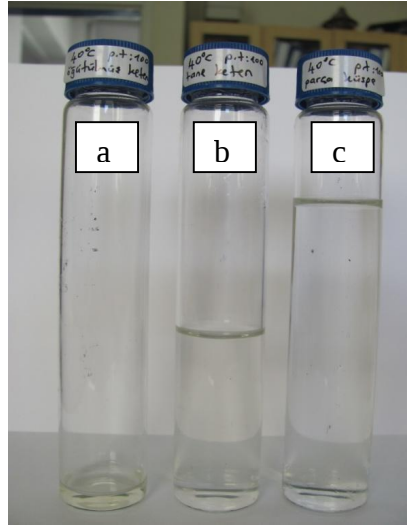
✓ Öğütülmüş keten tohumu küspesi ile 40°C’de yapılan denemelerde keten tohumunun içerdiği müsilaç nedeniyle öğütülmüş küспенin suyla şiştiği ve yüksek basınçla da sıkışması nedeniyle ekstraksiyon haznesinde silindir şeklinde kalıp oluşturduğu (Şekil 23a) görülmüştür. Bu nedenle ekstraksiyon haznesi içindeki suyun ekstrakt toplama şişesine geçişinin engellendiği ve buna bağlı olarak ekstrakt toplama şişesinde elde edilen ekstrakt miktarının çok az olduğu gözlenmiştir. (Şekil 24a).

✓ Tane keten tohumu ile 40°C’de yapılan denemelerde ekstraksiyon sırasında sistem iç basıncı belirlenen değerde sabit kalmış ve ekstraksiyon sonrasında yumuşak kalıp halinde tane keten tohumu (Şekil 23b) çıkmıştır. Bu durum ekstraksiyon haznesi içindeki suyun ekstrakt toplama şişesine geçişini biraz daha kolaylaştırmış ve bu doğrultuda elde edilen ekstrakt miktarının da arttığı görülmüştür (Şekil 24b).

✓ Parça keten tohumu küspesi ile 40°C’de yapılan ekstraksiyon denemeleri sonucunda Şekil 23c’de de görüldüğü gibi parça keten tohumu küspesinin suyla şiştiğinde arada büyük boşluklar kaldığı ve bu boşluk hacimlerinin sıcaklıkla daha da artması nedeniyle su ekstraktının metal hazneden daha kolay ekstrakt toplama şişesine aktarılabilirdiği ve buna bağlı olarak da alınan ekstrakt miktarının daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 24c).



Şekil 23. 40°C’de öğütülmüş kütpe (a), tane keten tohumu (b) ve parça küspenin (c) ekstraksiyon sonrasındaki görünüşleri



Şekil 24. 40°C’de öğütülmüş kütpe (a), tane keten tohumu (b) ve parça küspenin (c) ekstraktları

Çizelge 25’de gösterilen şartlarda elde edilen ekstraktlarda HPLC-MS/MS ile saptanan SDG lignan miktarları Çizelge 26’da gösterilmektedir.

Çizelge 26. 40°C ekstraksiyon sıcaklığında öğütülmüş kütpe, tane keten tohumu ve parça küspe ekstraktlarının SDG lignan miktarları

Materyal şekli	SDG lignan miktarları (mg/g)
Öğütülmüş kütpe	0.010±0.00 ^a
Tane keten tohumu	0.005±0.00 ^b
Parça küspe	0.013±0.00 ^a

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

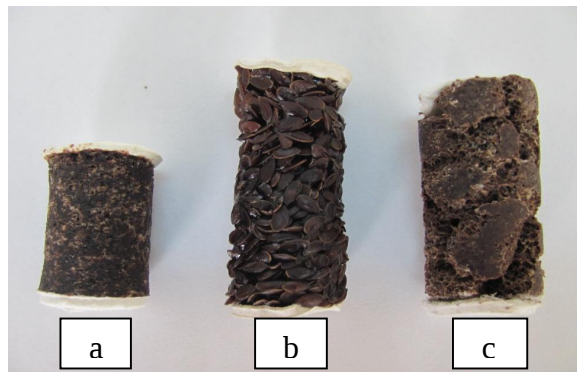
a-b aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Yağsız keten tohumu unlarının yüksek miktarda SDG lignan içerdiği (Çizelge 26) göz önüne alındığında, Çizelge 26’da görülen 40°C’de elde edilmiş ekstraktlardaki SDG lignan miktarlarının çok düşük olduğu ve parça küspe örneklerinde SDG lignan miktarının öğütülmüş küspeye göre biraz daha yüksek olduğu görülmektedir. 40°C denemelerde saptanan SDG lignan miktarının çok düşük olması ve incelenen literatürlerde (Cacae and Mazza, 2006; Ho et al., 2007) 120°C ve üzerindeki sıcaklıklarda daha iyi verim alındığının görülmesi nedeniyle 120°C’de aşağıda belirtilen ekstraksiyon koşullarında deneme yapılmıştır (Çizelge 27).

Çizelge 27. ASE 200 cihazında 120°C’de kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan materyal şekli ve sabit tutulan faktörler

Değiştirilen Faktör	Sabit tutulan Faktörler				
Materyal şekli	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon süresi (dak)	Basınç (psi)	Taze çözgen yüzdesi (%)	Örnek miktarı (g)
•Öğütülmüş küspe •Tane keten tohumu •Parça küspe	120	15	1500	40	5

ASE 200 cihazında öğütülmüş küspe ile 120°C’de yapılan denemelerde öğütülmüş küспенin metal hazne içinde kalıp haline (Şekil 25) gelerek sistem iç basıncını cihazın üst basınç sınırına olan 3000 psi değerine kadar yükselttiği ve ekstraksiyon işlemini engellediği görülmüştür. Bu nedenle ASE 200 cihazında öğütülmüş küspe ile 120°C ve üzerindeki sıcaklıklarda çalışılmayacağına karar verilmiş, tane keten tohumu ve parça küspe örnekleri analize alınarak birbirleriyle karşılaştırma yapılmıştır.



Şekil 25. 120°C’de öğütülmüş küspe (a), tane keten tohumu (b) ve parça küспенin (c) ekstraksiyon sonrasındaki görünüşleri

Çizelge 27’de belirtilen koşullarda ekstraksiyon işlemi uygulanan keten tohumu ve parça küspe örneklerine ait 120°C’de elde edilen su ekstraktlarındaki SDG lignan miktarları Çizelge 28’de gösterilmektedir.

Çizelge 28. 120°C ekstraksiyon sıcaklığında tane keten tohumu ve parça küspe ekstraktlarının SDG lignan miktarları

Materyal şekli	SDG lignan miktarları (mg/g)
Tane keten tohumu	0.55±0.00 ^a
Parça küspe	0.83±0.00 ^b

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

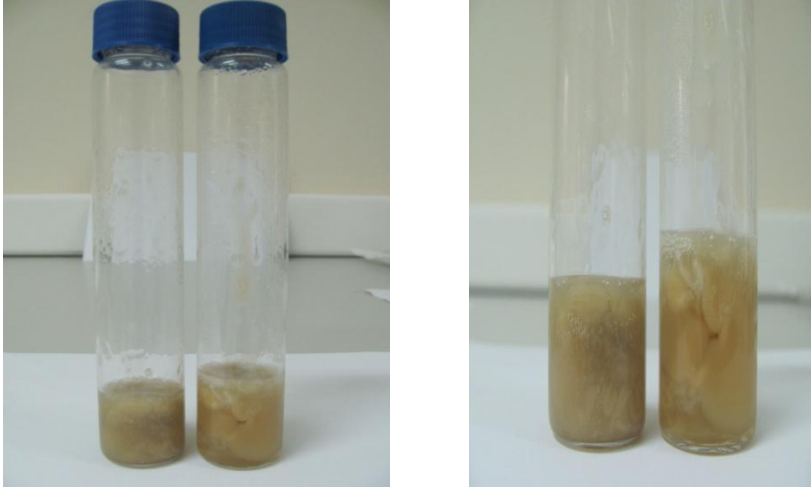
a-b aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Çizelge 28’de görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığı 40°C’den 120°C’ye yükseldiğinde ekstraktların SDG lignan içerikleri de artmış ve parça küspe ekstraktlarının SDG lignan içeriğinin tane keten tohumundan daha yüksek olduğu saptanmıştır (p<0,05).

Sıcaklık 20°C daha yükseltilerek 140°C’de yapılan denemelerde tane keten tohumu ve parça küспенin sıcaklığa karşı tepkisi incelendiğinde ise, tane keten tohumunun yapısındaki müsilağın 140°C’de yapışkan bir dokuya dönüşerek (Şekil 26) ekstraktlarda yapışkan kolloidal bir fazın oluşmasına (Şekil 27), metal haznelerde sızmaya ve sistem iç basıncının çok fazla yükselmesine neden olduğu görülmüştür.



Şekil 26. 140°C’de tane keten tohumunun ekstraksiyon sonrası görünümü



Şekil 27. 140°C’de tane keten tohumu ekstraktları

Bu denemeler sonucunda, ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu çalışmasında tane keten tohumu ve öğütülmüş küspe ile çalışılamayacağı sonucuna varılmış olup, bundan sonraki denemelere parça küspe ile devam edilmesine karar verilmiştir.

3.7.2. Ekstraksiyon sıcaklığının etkisi

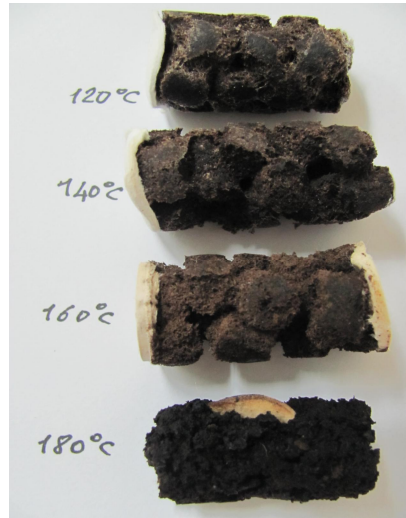
Kritik altı su ekstraksiyonu işleminde sıcaklık keten tohumunun yapısındaki bağları kırıp suyun yayılma gücünü ve seçiciliğini artırmaktadır (Çam ve Hışıl 2009). Çalışmamızın bu aşamasında ASE 200 cihazında, sıcaklık değerleri başlangıç olarak 120°C seçilmiş ve faktör seviyeleri 20°C artırılarak parça küspe örneklerinin 120, 140, 160 ve 180°C sıcaklıklarda ekstraksiyonu yapılmıştır. Sıcaklığın ekstraksiyon işlemi üzerine etkisini belirlemek amacıyla sıcaklık faktörü seviyeleri değiştirilirken diğer faktörler sabit tutulmuştur. Bu aşamada kullanılan sıcaklık seviyeleri ve sabit tutulan faktörler Çizelge 29’da verilmiştir.

Çizelge 29. ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan sıcaklıklar ve sabit tutulan faktörler

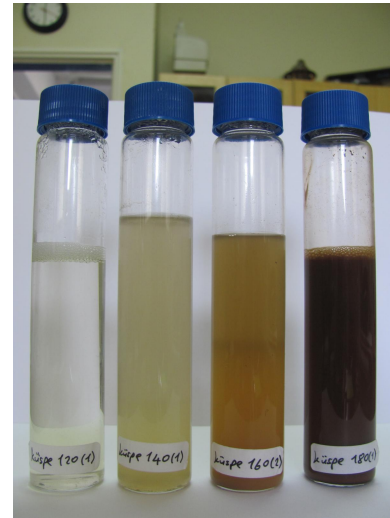
Değiştirilen Faktör	Sabit tutulan Faktörler				
Sıcaklık(°C)	Materyal	Ekstraksiyon süresi (dak)	Basınç (psi)	Taze çözgen yüzdesi (%)	Örnek miktarı (g)
120 140 160 180*	Parça küspe	15	1500	40	5

* En etkin seviye

Şekil 28’de parça keten tohumu küspesinin ekstraksiyon sonrası farklı sıcaklıklarda fotoğrafları görülmektedir. Ekstraksiyon sıcaklığı 120°C’den 160°C’e arttırıldıkça küspe parçaları daha fazla şişmekte ve ara boşluklar artmaktadır, bu da ekstraksiyon işlemi sırasında 1500 psi basıncın sabit kalmasını sağlamaktadır. 180°C’de ise küspe parçaları sıcaklık ve basınç nedeniyle çok fazla ufalansa da birbirlerine yapışmış formda olmadıkları için 1500 psi ekstraksiyon basıncının yine sabit kaldığı görülmektedir. 120, 140, 160 ve 180°C’lerde elde edilen ekstraktların görünümü incelendiğinde, 120°C de alınan ekstraktlar şeffaf renkte iken sıcaklık arttıkça su ekstraktlarının renginin koyu kahverengiye döndüğü görülmektedir (Şekil 29). Benzer durumun literatürde bazı çalışmalarda da bulunduğu saptanmış ve oluşan kahverengi rengin fenolik bileşiklerin oksidasyonundan ileri geldiği bildirilmiştir (Alonso-Salces et al., 2001; Çam ve Hışıl, 2009).



Şekil 28. 120°C, 140°C, 160°C ve 180°C’de ekstraksiyon sonrası parça küspeler



Şekil 29. 120°C, 140°C, 160°C ve 180°C’de parça küspe ekstraktları

Ekstraksiyon sıcaklığının değişimine bağlı olarak ekstraktların SDG lignan miktarları Çizelge 30’da gösterilmektedir.

Çizelge 30. Parça keten tohumu küspesi örneklerinden farklı sıcaklıklarda elde edilen su ekstraktlarının SDG lignan içerikleri

Ekstraksiyon sıcaklıkları (°C)	SDG lignan miktarları (mg/g)
120	0.83±0.00 ^a
140	2.20±0.03 ^b
160	4.87±0.10 ^c
180	12.94±0.30 ^d

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-d aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Çizelge 30’da görüldüğü gibi, parça keten tohumu küspesi örneklerinden elde edilen su ekstraktlarının SDG lignan içerikleri ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça artmaktadır. En yüksek SDG lignan miktarı 180°C’de elde edilen ekstraktlarda saptanmış olup bu miktar ile diğer sıcaklıklardaki ekstraktlarda elde edilen SDG lignan miktarları arasındaki fark istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur (p<0,05). Sonuç olarak bir sonraki aşama olan ekstraksiyon süresi denemesi için 180°C ekstraksiyon sıcaklığı sabit faktör olarak seçilmiştir.

Cacae and Mazza (2006) keten tohumundan SDG lignan bileşimini kritik altı su ile ekstrakte etmek için pilot tipi düzenek ile yaptıkları çalışmada, 100°C, 120°C, 140°C ve 160°C sıcaklık değerlerini kullanmışlar ve sıcaklık yükseldikçe SDG lignan miktarının arttığını saptamışlardır. Aynı cihazla yapılan diğer bir çalışmada ise öğütülmüş keten tohumu küspesinden SDG lignan bileşimini kritik altı su ile ekstrakte etmek için 130°C, 160°C ve 190°C sıcaklık değerleri denemiş ve en yüksek SDG lignan miktarı 160-190°C aralığında saptanmıştır (Ho et al., 2007).

3.7.3. Ekstraksiyon süresinin etkisi

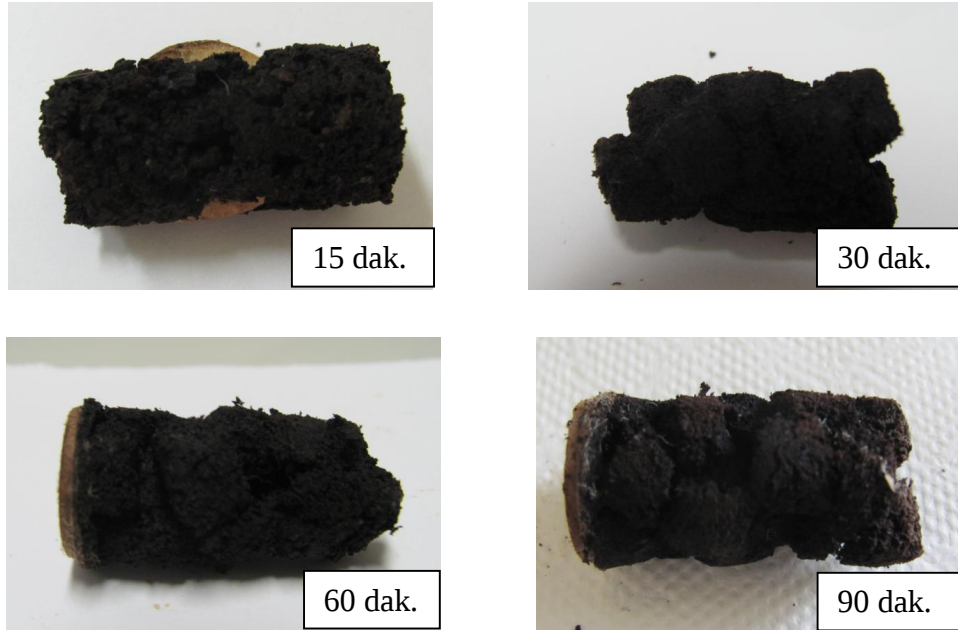
ASE 200 cihazında parça keten tohumu küspesinden SDG lignan bileşiminin kritik altı su ile ekstraksiyonu işleminde ekstraksiyon süresinin etkisini saptamak amacıyla 15, 30, 60 ve 90 dak. parametreleri denenmiştir (Çizelge 31).

Çizelge 31. ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon süreleri ve sabit tutulan faktörler

Değiştirilen Faktör	Sabit tutulan Faktörler				
Ekstraksiyon süresi (dak.)	Materyal	Sıcaklık (°C)	Basınç (psi)	Taze çözgen yüzdesi (%)	Örnek miktarı (g)
15* 30 60 90	Parça küspe	180	1500	40	5

* En etkin seviye

Küspe parçalarının 15, 30, 60 ve 90 dak. ekstraksiyonu sonrasında çekilen fotoğraflar incelendiğinde, ekstraksiyon süresi arttıkça küspe parçalarının kekleşerek şeklini koruduğu görülmekle birlikte her parçanın partüküllü bir yapıya dönüştüğü görülmektedir (Şekil 30). Bu partiküller gevşek yapıda olduğu için ekstraksiyon süreleri boyunca ASE 200 cihazında 1500 psi basınç değeri sabit kalmıştır. Söz konusu ekstraksiyon sürelerinde elde edilen ekstraktların fotoğrafları ise Şekil 31’de gösterilmektedir.



Şekil 30. Parça küspe ekstraktlarının 180°C’de 15, 30, 60 ve 90 dak. seviyelerinde ekstraksiyon sonrası görünüşleri



Şekil 31. Parça küspe ekstraktlarının 180°C’de 15, 30, 60 ve 90 dak. seviyelerdeki ekstraktları

Değişen ekstraksiyon sürelerine göre ekstraktların SDG lignan içerikleri Çizelge 32’de gösterilmektedir.

Çizelge 32. Parça keten tohumu küspesi örneklerinden farklı ekstraksiyon sürelerinde elde edilen su ekstraktlarının SDG lignan içerikleri

Ekstraksiyon süreleri (dak.)	SDG lignan miktarları (mg/g)
15	12.90±0.30 ^a
30	10.63±0.31 ^b
60	8.44±0.16 ^c
90	8.43±0.21 ^c

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-c aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Çizelge 32’den görüldüğü gibi, 15 dak. ekstraksiyon yapılmış parça küspe ekstraktlarının en yüksek miktarda SDG lignan içerdiği saptanmış olup 30 ve 60 dak. ekstraksiyon sürelerinde elde edilen ekstraktlar ile arasında önemli fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Ekstraksiyon süresi arttıkça su ekstraktlarındaki SDG lignan miktarının azaldığı görülmüştür. Bu azalmanın, keten tohumunun yapısındaki SDG lignan bileşiğinin ekstraksiyon süresinin uzamasına (15 dak.’dan 90 dak.’ya doğru) bağlı olarak daha uzun süre ısı muamelesine maruz kalmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, ekstraksiyon süresinin uzamasına bağlı olarak küspe parçalarının kekleşerek bir kalıp oluşturması nedeniyle suyun materyal içine yeterince nüfuz edemediği ve bundan dolayı ekstraksiyon işleminin olumsuz etkilendiği düşünülmektedir.

Cacae ve Mazza (2006) pilot tipi düzenekte tane keten tohumu ile yaptıkları kritik altı su ekstraksiyonu çalışmasında, 140°C’de 60-80 dak. arasında en yüksek SDG lignan miktarını elde ettiklerini belirtmişlerdir. Aynı cihazla yapılan bir diğer çalışmada ise, öğütülmüş keten tohumu küspesi kullanılmış ve en yüksek SDG lignan miktarlarının 160°C’de 100 dak. ve 190°C’de 30 dak. sürelerde elde edildiği bildirilmiştir (Ho et al. 2007).

3.7.4. Basıncın etkisi

Kritik altı su ekstraksiyonu işleminde basıncın işlevi suyu ekstraksiyon sıcaklığında sıvı halde tutmaktır (Palma et al., 2001). Çalışmamızda ASE 200 cihazında 1500 ve 2000 psi basınç değerleri denenmiştir. Bu aşamada kullanılan basınç seviyeleri ve sabit tutulan faktörler Çizelge 33’de verilmiştir.

Çizelge 33. ASE 200 cihazındaki kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon basınçları ve sabit tutulan faktörler

Değiştirilen Faktör	Sabit tutulan Faktörler				
Basınç (psi)	Materyal	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon süresi (dak)	Taze çözgen yüzdesi (%)	Örnek miktarı (g)
1500* 2000	Parça küspe	180	15	40	5

* En etkin seviye

Denemeler sırasında, ASE cihazının 1500 psi basınç değerinde normal olarak çalışmasını sürdürdüğü ve sonlandırıdığı gözlenirken, 2000 psi basınç değerinde işlem sonunda cihazın iç basıncının düşmesi oldukça uzun zaman almıştır. Ekstraktlardaki SDG lignan miktarları Çizelge 34’de görülmektedir.

Çizelge 34. 1500 ve 2000 psi basınçlarda elde edilen su ekstraktlarındaki SDG lignan miktarları

Basınç (psi)	SDG lignan miktarları (mg/g)
1500	12.92±0.27 ^a
2000	11.51±0.13 ^b

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-b aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler p<0,05 düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Çizelge 34'den görüldüğü gibi, elde edilen ekstraktların SDG lignan miktarları 1500 psi basınçta 2000 psi basınca göre daha yüksek saptanmıştır ($p<0,05$). Literatürde taranan ASE çalışmaların çoğunda basınç faktörü sabit değerde tutulmuş ve 1500 psi basınç değeri kullanılmıştır (Ju ve Howard, 2005; Herrero et al., 2005; Rodríguez-Meizoso et al., 2006; Monrad et al., 2010). Kritik altı su ekstraksiyonu işleminde basıncın daha yüksek değerlerde olmasının ekstraksiyon verimine herhangi bir etkisinin olmadığını belirten çalışmalar da bulunmaktadır (Li et al., 2006; Luthria, 2008; Çam ve Hışıl, 2009).

3.7.5. Taze çözgen miktarının etkisi

ASE 200 cihazında ekstraksiyon süresinin bitiminde ekstraksiyon işleminin yapıldığı metal haznenin içine taze çözücü püskürtme imkanı mevcuttur. Taze çözgen miktarı ekstraksiyon haznesinin hacminin %5-150'si kadar olabilmektedir. Ekstraksiyon süresi sonunda ekstrakt, ekstrakt toplama şişesine alınmaya başlanır bu arada statik valf açılır ve metal haznesinin kapasitesinin (33 ml) belirlenen yüzdesinde sisteme tekrar taze su verilir. Çalışmada 3 farklı seviyede taze çözgen miktarı denenmiş olup bu seviyeler ve sabit tutulan faktörler Çizelge 35'de gösterilmektedir.

Çizelge 35. ASE 200 cihazındaki kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan taze çözgen miktarları ve sabit tutulan faktörler

Değiştirilen Faktör	Sabit tutulan Faktörler				
Taze çözgen miktarı (%)	Materyal	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon süresi (dak.)	Basınç (psi)	Örnek miktarı (g)
5 40* 100	parça küspe	180	15	1500	5

* En etkin seviye

%5, 40 ve 100 taze çözgen miktarları kullanılarak elde edilen ekstraktların SDG lignan içerikleri Çizelge 36'da gösterilmektedir.

Çizelge 36. %5, 40 ve 100 oranlarında taze çözgen miktarı kullanılarak elde edilen su ekstraktlarındaki SDG lignan miktarları

Taze çözgen yüzdesi (%)	SDG lignan miktarları (mg/g)
5	12.44±0.27 ^a
40	12.92±0.28 ^a
100	12.63±0.28 ^a

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-b aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p < 0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Çizelge 36'dan görüldüğü gibi elde edilen ekstraktların SDG lignan içerikleri taze çözgen miktarlarına göre farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$). Bu nedenle taze çözgen miktarı faktörü bundan sonraki denemelerde, bundan önceki denemelerde de kullanılmış olan %40 taze çözgen miktarı alınacaktır.

Literatürde yapılan taramalarda Çam ve Hışıl (2009) çalışmalarında taze çözgen miktarının ekstraksiyon işlemini etkilemediğini belirtirken, bazı çalışmalarda taze çözgen miktarı bir faktör olarak ele alınmamış ve sabit değerler kullanılmıştır (Ju and Howard, 2005; Herrero et al., 2005; Rodríguez-Meizoso et al., 2006; Monrad et al., 2010).

3.7.6. Örnek miktarının etkisi

ASE cihazında kritik altı su ekstraksiyonu işleminde örnek miktarının artırılmasının SDG lignan bileşiğinin ekstraksiyonuna etkisinin saptanması amacıyla 5 ve 10 g parça küspe örnekleri materyal olarak kullanılmıştır (Çizelge 37).

Çizelge 37. ASE 200 cihazındaki kritik altı su ekstraksiyonunda kullanılan örnek miktarları ve sabit tutulan faktörler

Değiştirilen Faktör	Sabit tutulan Faktörler				
Örnek miktarı (g)	Materyal	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon süresi (dak.)	Basınç (psi)	Taze çözgen yüzdesi (%)
5* 10	Parça küspe	180	15	1500	40

* En etkin seviye

Elde edilen su ekstraktlarının SDG lignan içerikleri Çizelge 38'de gösterilmektedir.

Çizelge 38. 180°C’de 5 ve 10 g örnek miktarı kullanılarak elde edilen ekstraktlardaki SDG lignan miktarları

Örnek miktarı (g)	SDG lignan miktarları (mg/g)
5	12.94±0.28 ^a
10	7.30±0.11 ^b

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-b aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Çizelge 38’den görüldüğü gibi, elde edilen ekstraktların SDG lignan içerikleri 5 g parça küspe kullanıldığında daha yüksek saptanmıştır ($p<0,05$). Metal hazne içindeki örnek miktarının artması fakat çözgen miktarının aynı olması nedeniyle küspe/su oranı artmakta bu da SDG lignan bileşiğinin ekstraksiyonunu zorlaştırmaktadır. Luthria (2008) yaptığı çalışmalarda örnek miktarının önemli bir faktör olduğunu ve optimize edilmesi gerektiğini bildirmiş, Alonso-Salces et al. (2001) ve Li et al. (2006) ise örnek miktarının bir faktör olarak önemli olmadığını bunun yerine örnek/çözücü oranının daha önemli bir faktör olduğunu belirtmişlerdir. Çam ve Hışıl (2009) ise çalışmasında örnek miktarının etkin bir faktör olmadığını saptamış olup mümkün olduğunca örneği iyi temsil edecek ve alınan ekstraktların da ilgili bileşenler açısından konsantre olduğu uygun bir örnek miktarının seçilmesi gerektiğini belirtmiştir. Bazı çalışmalarda ise örnek miktarı sabit değerde tutulmuştur (Ju and Howard, 2005; Herrero et al., 2005; Rodríguez-Meizoso et al., 2006; Monrad et al., 2010).

Çalışmanın buraya kadar olan kısmında, ASE 200 cihazında keten tohumunun yapısında bulunan SDG lignan bileşiğinin kritik altı su ekstraksiyonu işleminde etkin faktörlerin belirlenmesi çalışmasında, etkin faktörler; ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve örnek miktarı olarak belirlenmiştir. Parça küspede en yüksek SDG lignan miktarı 12.94 mg/g küspe olarak 5 g materyal kullanılarak 180°C sıcaklıkta ve 15 dak. ekstraksiyon süresinde elde edilmiştir (Çizelge 30). Bu veriler doğrultusunda, kritik altı su ekstraksiyonunda ekstraksiyon verimine ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin etkisini daha iyi saptamak için ASE 200 cihazında yeniden çeşitli ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi seviyelerinde ekstraktlar elde edilerek, bu ekstraktlardaki SDG lignan miktarları saptanmıştır.

3.7.7. Etkin faktörler arasındaki etkileşim

15 dak. ekstraksiyon süresinde, parça küspeden SDG lignan bileşiği en yüksek 180°C sıcaklıkta elde edilmiş olup ikinci en yüksek değere 160°C sıcaklıkta ulaşılmıştır. Bu nedenle 160°C sıcaklıkta gerçekleştirilen kritik altı su ekstraksiyonu işlemi, 15 dak. olan ekstraksiyon süresi arttırılarak 30 ve 60 dak. sürelerde de tekrarlanmıştır (Çizelge 39). 180°C sıcaklıkta en yüksek SDG lignan bileşiği 15 dak. seviyesinde bulunmuştur ve ekstraksiyon süresinin artmasıyla elde edilen SDG lignan miktarının azaldığı saptanmıştır. Ekstraksiyon süresinin azaltılmasının etkisini de belirlemek amacıyla 180°C sıcaklıkta 5 dak. ekstraksiyon süresi de denenmiştir (Çizelge 41). Ayrıca ASE cihazında, 160 ve 180°C arasında kalan 170°C sıcaklık seviyesinde de 5, 15, 30 ve 60 dak. ekstraksiyon sürelerinde kritik altı su ekstraksiyonu işlemi yapılmıştır (Çizelge 40).

Çizelge 39. 160°C ekstraksiyon sıcaklığında elde edilen ekstraktların ekstraksiyon süresi seviyelerinde SDG lignan miktarları

Ekstraksiyon süreleri (dak.)	SDG lignan miktarları (mg/g)
15	7.61±0.17 ^a
30	9.41±0.17 ^b
60	13.73±0.28 ^c

sonuçlar ($\pm$ standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-c aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Parça küspeden 160°C ekstraksiyon sıcaklığında 15, 30 ve 60 dak. ekstraksiyon sürelerinde elde edilen ekstraktların SDG lignan miktarları ekstraksiyon süresi arttıkça artmaktadır. Su ekstraktlarındaki en yüksek SDG lignan miktarı 60 dak. ekstraksiyon süresinde 13,73 mg/g olarak elde edilmiş olup 60 dak. ile diğer ekstraksiyon süreleri arasındaki fark önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 40. 170°C ekstraksiyon sıcaklığında elde edilen ekstraktların ekstraksiyon süresi seviyelerinde SDG lignan miktarları

Ekstraksiyon süreleri (dak.)	SDG lignan miktarları (mg/g)
5	7.63±0.20 ^a
15	12.60±0.27 ^b
30	12.32±0.29 ^b
60	11.20±0.17 ^c

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-c aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Parça küspeden 170°C ekstraksiyon sıcaklığında 5, 15, 30 ve 60 dak. ekstraksiyon sürelerinde elde edilen ekstraktların SDG lignan miktarları 15 dak. sürede en yüksek düzeye ulaştıktan sonra azalmaya başlamıştır. 15 ve 30 dak. ekstraksiyon süreleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmaktadır ($p>0,05$).

Çizelge 41. 180°C ekstraksiyon sıcaklığında elde edilen ekstraktların ekstraksiyon süresi seviyelerinde SDG lignan miktarları

Ekstraksiyon süreleri (dak.)	SDG lignan miktarları (mg/g)
5	10.32±0.27 ^a
15	12.94±0.33 ^b
30	10.63±0.20 ^a

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

a-b aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler $p<0,05$ düzeyinde birbirinden farklıdır (n=3)

Parça küspeden 180°C ekstraksiyon sıcaklığında 5, 15 ve 30 dak. ekstraksiyon sürelerinde elde edilen ekstraktların SDG lignan miktarları da 15 dak. sürede en yüksek düzeye ulaşmıştır ve diğer ekstraksiyon süreleri ile arasında önemli fark saptanmıştır ($p<0,05$).

160, 170 ve 180°C ekstraksiyon sıcaklıklarında en yüksek SDG lignan miktarları sırasıyla 60, 15 ve 15 dak. ekstraksiyon sürelerinde elde edilmiştir. Kısa ekstraksiyon süresi göz önünde bulundurulduğunda 170°C ve 180°C ekstraksiyon sıcaklıklarında elde edilen ekstraktların SDG lignan miktarları birbirleriyle karşılaştırılmış ve aralarında istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Bu veriler doğrultusunda ASE 200 cihazında parça

küspeden en yüksek SDG lignan bileşiğinin kritik altı su ile eldesi için en uygun ekstraksiyon sıcaklığı 170°C ve ekstraksiyon süresi 15 dak. olarak saptanmıştır.

Çalışmamızda, ASE 200 cihazında en uygun ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi koşullarında SDG lignan bileşiğinin kritik altı su ekstraksiyonu verimi, materyal olarak seçilen TR 77705 keten tohumu çeşidinin yağı alınmış küspesinde hesaplanmıştır. Çizelge 42’de küspeden kimyasal yöntemle metanol çözeltisi ile ve ASE 200 cihazında kritik altı su ile 170°C ve 15 dak. sürede elde edilen ekstraktlardaki SDG lignan miktarları gösterilmektedir.

Çizelge 42. Parça küspeden metanol ekstraksiyonu ve kritik altı su ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlardaki SDG lignan miktarları

Ekstraktlar	SDG lignan miktarları (mg/g)
Metanol ekstraktı	17.83±0.28
Kritik altı su ekstraktı	12.60±0.27

sonuçlar (±standart sapma değeri) olarak verilmiştir

Küspede kimyasal yöntemle (metanol ile) ekstrakte edilen SDG lignan miktarı 17,83 mg/g iken ASE 200 cihazında elde edilen su ekstraktlarında SDG lignan miktarı 12,60 mg/g olarak saptanmıştır. Bu durumda parça küspeden SDG lignan bileşiğinin ASE 200 cihazında cihazında kritik altı su ile ekstraksiyon verimi %69.63 olarak belirlenmiştir.

4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırma sonucunda, keten tohumunun içerdiği söz konusu biyoaktif bileşikler üzerine kültürel çeşitliliğin etkisi önemli bulunmuştur. Çeşitlerimiz arasında TR 77705 yerel çeşidinin diğer çeşitlere kıyasla yüksek toplam fenolik madde ve SDG lignan içerdiği, TR 73572 yerel tescilli çeşidimizin ise toplam flavonoid, toplam yağ, doymamış yağ asidi ve α -linolenik asit içeriğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

TR 77705 ve TR 73572 keten tohumu çeşitlerinin filizlerinin biyoaktif bileşik içeriğine filizlenme süresinin ve kültürel çeşitliliğin etkisi önemli bulunmuştur. Filizlendirme işlemi ile keten tohumlarının toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarları yüksek oranda artarken, toplam yağ ve SDG lignan içeriklerinde önemli düzeyde düşme saptanmıştır. Filizlendirme işlemi süresince ise filizlerin doymamış yağ asidi ve α -linolenik asit içeriklerinde önemli düşme olduğu belirlenmiştir. Her iki çeşit için de filizlerin 5. günde doymamış yağ asidi, α -linolenik asit ve toplam yağ içerikleri en yüksek düzeyde bulunurken, 13 günlük filizlerin toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarı açısından daha zengin olduğu görülmüştür. Genel olarak TR 77705 çeşidinin filizlerinin toplam flavonoid, doymamış yağ asidi ve α -linolenik asit içeriği açısından zenginliği dikkat çekerken, TR 73572 çeşidinin filizlerinin ise toplam fenolik madde miktarı açısından daha zengin olduğu saptanmıştır.

Keten tohumunun yapısındaki SDG lignan bileşiğinin ASE 200 cihazında kritik altı su ekstraksiyonu işlemini etkileyebilecek faktörler olarak materyal şekli, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, basınç, taze çözgen miktarı ve örnek miktarı parametreleri denenmiştir. Denemeler sonucunda en iyi çalışma materyalinin yağı alınmış parça küspe olduğu belirlenmiş olup, ekstraksiyon işleminde etkin faktörler ise ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve örnek miktarı olarak saptanmıştır. Parça keten tohumu küspesinden kritik altı su ile SDG lignan bileşiğinin ekstraksiyonunda en yüksek ekstraksiyon verimi; 5 g örnek, 170°C sıcaklık, 15 dak. ekstraksiyon süresi, 1500 psi basınç ve %40 taze çözgen miktarı kullanılan çalışma koşullarında %69.63 olarak saptanmıştır.

Bu araştırmada elde edilen bulgular doğrultusunda;

- ✓ biyoaktif bileşiklerce zengin olan TR 73572 ve TR 77705 keten tohumu çeşitlerinin kültür olarak yetiştirilmesi, bu çeşitlerin ve ürünlerinin ülke içinde ve dışında satışa sunumunun sağlanması ve fonksiyonel gıdalarda bu çeşitlerin kullanılmasının teşvik edilmesi,
- ✓ keten tohumu filizlerinin; taze olarak tüketilmek üzere piyasaya sunulması, gıda sektöründe fonksiyonel gıdaların içerisine katılması

ile insanlara yeni ürünler sunularak ülke insanının beslenmesine katkıda bulunulacağı ve ülke ekonomisine geniş bir alanda önemli bir artı değer katılacağı düşünülmektedir. Ayrıca,

- ✓ kritik altı su ekstraksiyonu ile elde edilecek SDG lignanın antioksidan, antibakteriyel, antiviral ve antifungal özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde doğal antioksidan ve antimikrobiyal olarak önemli bir kullanım alanına sahip olabileceği düşünülmektedir.

Söz konusu araştırmanın devamında yerel keten tohumu eşitlerimizde bulunan fenolik asit ve flavonoid bileşiklerinin tanımlanması ve bunların çeşide göre değişimlerinin saptanması yararlı olacaktır. Ayrıca başka filizlendirme koşulları da denenerek bu koşulların filiz kalitesine ve filizin biyoaktif bileşik içeriğine etkisi ile ilgili çalışmalar da yapılmalıdır. Gerçekleştirilen araştırma ve bunun devamında yapılacak çalışmalarla keten tohumunun anavatanı sayılan ülkemizde bu konudaki tarımın ve sanayiinin n açılacak tüketici açısından fonksiyonel gıda çeşitliliğine de katkıda bulunulacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adlercreutz H.**, 2002, Phyto-oestrogens and cancer, *Lancet Oncol.*, 3:364–373.
- Alonso-Salces, R.M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L.A, Gallo, B. and Vicente, F.**, 2001, Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple, *Journal of Chromatography A*, 933:37-43.
- Alvarez-Jubete, L., Wijngaard, H., Arendt, E.K., Gallagher, E.**, 2010, Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking, *Food Chemistry*, 119:770–778.
- Wapedia**, 2011, “Flax plant”, <http://wapedia.mobi/en/Flax>. (erişim tarihi: 5 Şubat 2011).
- FAO**, 2011, Food and Agricultural Organization of United Nations: Economic And Social Department: The Statistical Division. www.fao.org. (erişim tarihi: 5 Şubat 2011).
- AOAC**, 1998. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, Washington D. C., USA.
- Ayala, R. S., Luque de Castro, M.D.**, 2001, Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils, *Food Chemistry*, 75:109–113.
- Badshah, A., Zeb, A., & Sattar, A.**, 1991, Effect of soaking, germination and autoclaving on selected nutrients of rapeseed, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 34:446–448.
- Başer, K. H. C.**, 2002. Fonksiyonel gıdalar ve nutrasötikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, 29-31 Mayıs.
- Bhatty, R.S.**, 1995, Nutrient Composition of Whole Flaxseed and Flaxseed Meal. In: Cunnane, S.C., Thompson, L.U. (Eds.), *Flaxseed in Human Nutrition*, AOCS Press, Champaign, USA, p. 22–42.
- Batta, S. K., Ahuja K. L, Laban K. S.**, 1985, Variability in oil content and fatty acid composition in linseed (*Linum usitatissimum L.*), *Ann Biol.*, 1:80-85.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M. and Mesnard, F.,** 2007. Microwave-assisted extraction of the Main phenolic compounds in flaxseed, *Phytochem. Anal.*, 18: 275–282.
- Berner, L. A. and O'Donnell, J. A.,** 1998, Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods, *International Dairy Journal*, 8:355-362.
- Bibi, N., Aurang, Z., Amal, B. K. and Mohammad, S. K.,** 2008, Effect of germination time and type of illumination on proximate composition of chickpea seed (*Cicer arietinum* L.), *Am. J. Food Technol.*, 3:24-32.
- Bloedon, L. T. and Szapary, O.P,** 2004. Flaxseed and cardiovascular risk. *Nutrition Reviews*. 62:18-27.
- Bozan, B. and Temelli, F.,** 2008. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils, *Bioresource Technology*, 99:6354-6359.
- Bozkurt, D. ve Kurt, O.,** 2007, Keten (*Linum Usitatissimum* L.)'in verim ve verim unsurlarına ekim zamanı ve toprak sıcaklığının etkisi, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 22(1):20-25.
- Cacace, J.E., Mazza, G.,** 2006, Pressurized low polarity water extraction of lignans from whole flaxseed, *Journal of Food Engineering*, 77:1087-1095.
- Canadian Organic Sprout Company,** 2003, “Flax sprout”, World Intellectual Property Organization, <http://www.freepatentsonline.com/20040191396.pdf> (erişim tarihi:19 Şubat 2011)
- Chen, J., Stavro, P. M., Thompson L. U.,** 2002, Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor, *Nutr. Cancer*, 43:187-192.
- Chen, J., Thompson, L. U.,** 2003, Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration in vitro, *Breast Cancer Res. Treat*, 80:163-170.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Choo, W. S., Birch, J., Dufour, J. P.**, 2007, Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:202-211.
- Collins, T. F. X., Sprando, R. L., Black, T. N., Olejnik, N., Wiesenfeld, P. W., Babu, U. S., Bryant, M., Flynn, T. J., and Ruggles, D. I.**, 2003, Effects of flaxseed and defatted flaxseed meal on reproduction and development in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 41:819-834.
- Coşkun, Y., and Karababa, E.**, 2007, Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.), *Journal of Food Engineering*, 78:1067-1073.
- Çam, M. ve Hışıl, Y.**, 2009, Basınçlı Solvent Ekstraktörü Kullanılarak Nar Kabuğu ve Çekirdeğinin Antioksidan Bileşiklerinin Su ile Ekstraksiyonu, Doktora tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 245s.
- Çam, M., Hışıl, Y., Durmaz, G.**, 2009, Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods, *Food Chemistry*, 112:721-726.
- Dabrowski, K. J., Sosulski, F. W.**, 1984, Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds, *J. Agric. Food Chem.*, 32:128-130.
- Degenhardt, A., Habben, S., Winterhalter, P.**, 2002, Isolation of the Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside from Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) by High-Speed Counter-Current Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 943:299-302.
- Doblado, R., Frías, J., Vidal-Valverde, C.**, 2007, Changes in vitamin C content and antioxidant capacity of raw and germinated cowpea (*Vigna sinensis* var. carilla) seeds induced by high pressure treatment, *Food Chemistry*, 101:918-923.
- Dueñas, M., Hernández T., Estrella, I., Fernández, D.**, 2009, Germination as a process to increase the polyphenol content and antioxidant activity of lupin seeds (*Lupinus angustifolius* L.), *Food Chemistry*, 117:599-607.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Eikani, M. H., Golmohammad, F., Rowshanzamir, S.,** 2007, Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.), *Journal of Food Engineering*, 80:735–740.
- Eliasson, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R., A man, P.,** 2003, High-performance liquid chromatographic analysis of secoisolariciresinol diglucoside and hydroxycinnamic acid glucosides in flaxseed by alkaline extraction, *J. Chromatography A*, 1012:151-159.
- Eşiyok, D. ve Bozokalfa, M. K.,** 2002, Sebze olarak kullanılan çimlendirilmiş tohumlar, *Dünya Gıda Dergisi*, 06:84-88.
- Evans, B., Griffiths, K., Morton, M. S.,** 1995, Inhibition of 5 areductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids, *J. Endocrinol.*, 147:295–302.
- Green, A. G., and Marshall, D. R. ,** 1981,Variation for oil quantity and quality in linseed (*Linum usitatissimum*), *Australian Journal of Agricultural Research*, 32(4): 599-607.
- Hahm, T. S., Park, S.J., Lo, Y. M.,** 2009, Effects of germination on chemical composition and functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds, *Bioresource Technology*, 100:1643–1647.
- Hata, S., Wiboonsirikul, J., Maedab, A., Kimura, Y., Adachi, S.,** 2007, Extraction of defatted rice bran by subcritical water treatment, *Biochemical Engineering Journal*, 40 (1):44-53.
- Herrero, M., Martín-Álvarez, P. J., Señoráns, F. J., Cifuentes, A., Ibáñez, E.,** 2005, Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga, *Food Chemistry*, 93:417–423.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E.,** 2006, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae, *Food Chemistry*, 98:136–148.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Ho, C. H.L., Cacacea, J. E., Mazza, G.,** 2007, Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water, *LWT*, 40: 1637–1647.
- Hosseinian, F. S., Muir, A. D., Westcott, N. D., and Krol, E. S.,** 2006, Antioxidant Capacity of Flaxseed Lignans in Two Model Systems, *JAOCs*, 83 (10):835-840.
- Hu, C., Yuan, Y. V., Kitts, D. D.,** 2007, Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro, *Food and Chemical Toxicolog.*, 45 (11):2219-2227.
- Ibanez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Caverro, S., Reglero, G., Hawthorne, S. B.,** 2003, Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants, *J. Agric. Food Chem.*, 51:375-382.
- ISTA,** 1985, “Flax seed sprouts”, International rules for seed testing. Seed Science and Technology.
- Jiménez-carmonaa, M. M., Uberab, J. L., Luque de Castroa, M. D.,**1999, Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil, *Journal of Chromatography A*, 855:625–632.
- Johnsson, P., Peerlkampa, N., Kamal-Eldina, A., Andersson, R. E., Anderssona, R., Lundgren, L. N., Åman, P.,** 2002, Polymeric fractions containing phenol glucosides in flaxseed, *Food Chemistry*, 76:207–212.
- Ju, Z.Y., and Howard, L.R.,** 2005, Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:5207-5213.
- Kamal-eldin, A., Peerlkamp, N., Johnson, P., Andersson, R., Andersson, R. E., Lundgren, L. N., Aman, P.,** 2001, An Oligomer from Flaxseed Composed of Secoisolariciresinoldiglucoside and 3-Hydroxy-3-Methyl Glutaric Acid Residues, *Phytochem.*, 58:587-590.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Karaca, E. ve Aytaç, S.**, 2007, Yağ bitkilerinde yağ asitleri kompozisyonu üzerine etki eden faktörler, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 22(1):123-131.
- Khattak, A. B., Zeb, A., Bibi, N., Khalil, S.A., Khattak, M. A.**, 2007a, Influence of germination techniques on phytic acid and polyphenols content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts, *Food Chemistry*, 104 (3):1074-1079.
- Khattak, A. B., Zeb, A., Khan, M., Bibi, N., Ihsanullah, Khattak, M. S.**, 2007b, Influence of germination techniques on sprout yield, biosynthesis of ascorbic acid and cooking ability, in chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Food Chemistry*, 103 (1):115–120.
- Khattak, A. B., Zeb, A., Bibi, N.**, 2008, Impact of germination time and type of illumination on carotenoid content, protein solubility and in vitro protein digestibility of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts, *Food Chemistry*, 109:797-801.
- Khalil, A. W., Zeb, A., Mahmood, F., Tariq, S., Khattak, A. B., Shah, H.**, 2007, Comparision of sprout quality characteristics of desi and kabuli type chickpea cultivars (*Cicer arietinum* L.), *LWT*, 40:937-945.
- Kim, S. L., Kim, S. K., Park, C. H.**, 2004a, Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable, *Food Research International*, 37:319–327.
- Kim, E. H., Kim, S. H., Chung, J. I., Chi, J. H., Kim, Y. A., Chung, I. M.**, 2004b, Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions, *Eur Food Res Technol.*, 222:201–208.
- Kim, S. J., Zaidul, I.S.M., Suzuki, T., Mukasa, Y., Hashimoto, N., Takigawa, S., Noda, T., Matsuura-Endo, C., Yamauchi, H.**, 2008, Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts, *Food Chemistry*, 110 (4):814-820.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Kitts, D. D., Yuan Y. V., Wijekremene, A. N., Thompson, L. U.**, 1999, Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone, *Mol. Cell. Biochem.*, 202:91–100.
- Konuklugil, B. ve Bahadır, Ö.**, 2004, *Linum usitatissimum* L.'nin kimyasal bileşikleri ve biyolojik aktiviteleri, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 33 (1):63-84.
- Korthals, M.**, 2002, The struggle over functional foods: Justice And The Social Meaning Of Functional Foods, *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 15:315-324.
- Krist, S., Stuebiger, K., Bail, S., Unterweger, H.**, 2006, Analysis of volatile compounds and triacylglycerol composition of fatty seed oil gained from flax and false flax. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 108:48–60.
- Kubátová, A., Lagadec, A. J. M., Miller, D. J. and Hawthorne, S. B.**, 2001, Selective extraction of oxygenates from savory and peppermint using subcritical water, *Flavour And Fragrance Journal Flavour Fragr. J.*, 16:64–73.
- Kurt, O., Yılmaz, S., Demir, A.**, 2005, Keten'in verim ve verim unsurları ile ham yağ oranına bitki büyüme düzenleyicisi uygulama zamanı ve azotlu gübre dozu uygulamasının etkileri, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 20(3):16-22.
- Kurt, O., Doğan, H. ve Demir, A.**, 2006, Samsun ekolojik koşullarına uygun kışlık keten çeşitlerinin belirlenmesi üzerinde bir araştırma, *OMÜ Zir. Fak. Dergisi*, 21(1):1-5.
- Lee, S. J., Ahn, J. K., Kahnh, T. D., Chun, S. C., Kim, S. L., RO, H. M., Song, H. K., Chung I. M.**, 2007, Comparison of isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) sprouts grown under two different light conditions, *J. Agric. Food Chem.*, 55:9415–9421.
- Lemay, A., Dodin, S., Kadri, N., Jacques, H., Forest, J. C.**, 2002, Flaxseed dietary supplement versus hormone replacement therapy in hypercholesterolemic menopausal women, *Obstet. Gynecol.*, 100:495–504.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Li, D., Yee, J.A., Thompson, L. U., Yan, L.,** 1999, Dietary supplementation with secoisolariciresinol diglycoside (SDG) reduces experimental metastasis of melanoma cells in mice, *Cancer Lett.*, 142:91–96.
- Li, P., Li, S.P., Lao, S.C., Fu, C.M., Kan, K.K.W., and Wang, Y.T.,** 2006, Optimization of pressurized liquid extraction for Z-ligustilide, Z-butylidenephthalide and ferulic acid in *Angelica sinensis*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40:1073-1079.
- Liggins, J., Grimwood, R., and Bingham, S. A.,** 2000, Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples, *Anal. Biochem.*, 287:102–109.
- Lucas, E. A., Lightfoot, S. A., Hammond, J. L., Devareddy, L., Khalil, D. A., Daggy, B. P., Smith, B. J., Westcott, N., Mocanu, V., Soung do, Y., Arjmandi, B. H.,** 2004, Flaxseed reduces plasma cholesterol and atherosclerotic lesion formation in ovariectomized Golden Syrian hamsters, *Atherosclerosis*, 173:223–229.
- Łukaszewicz, M., Szopa, J., Krasowska, A.,** 2004, Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants, *Food Chemistry*, 88:225–231.
- Luque de Castro, M. D., Jimenez Carmona, M. M., & Fernandez Perez, V.,** 1999, Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants, *Trends in Analytical Chemistry*, 18:708–716.
- Luthria, D. L.,** 2008, Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor, *Food Chemistry*, 107:745-752.
- Madhusudhan, B., Wiesenborn, D., Schwarz, J., Tostenson, K., Gillespie, J. A.,** 2000, Dry mechanical method for concentrating the lignan secoisolariciresinol diglucoside in flaxseed, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 33:268-275.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Mao, J. J., Dong, J. F., & Zhu, M. Y.**, 2005, Effect of germination conditions on ascorbic acid level and yield of soybean sprout, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85:943–947.
- Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P., Li, B.W.**, 1999, Isolation and characterization of the lignans, isolaricresinol and pinoresinol, in flaxseed meal, *J. Agric. Food Chem.*, 47:3173–3180.
- Meagher, L., and Beecher, G. R.**, 2000, Assessment of Data on the Lignan Content of Foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, 13:935-947.
- Medina, L. S. A.**, 2006, Phenolic Compounds: Their Role During Olive Oil Extraction and in Flaxseed-transfer and Antioksidant Function. Doctorate thesis. University of Lleida Agronoöical, Forestal and Food Systems Doctorate Program Food Technology Department Lleida, Spain, 211p.
- Milder, I.**, 2007, Lignan Intake in the Netherlands and its Relation with Mortality. Doctorate thesis. Thesis Wageningen University, the Netherlands, Dutch, 159p.
- Monrad, J. K., Howard, L. R., King, G. J. W., Srinivas, K., Mauromoustakos, A.**, 2010, Subcritical Solvent Extraction of Procyanidins from Dried Red Grape Pomace, *J. Agric. Food Chem.*, 58 (7):4014–4021.
- Moriyama, M., Oba, K.**, 2004, Sprouts as antioxidant food resources and young people's taste for them, *BioFactors*, Volume 21, Numbers 1-4, p. 247-249.
- Nonogaki, H., Bassel, W. G., Bewley, J. D.**, 2010, Germination-still a msytery. *Plant Science*, 179 (6):574-581.
- Ntiamoah, C., Rowland, G.G., Taylor, D.C.**, 1995, Inheritance of elevated palmitic acid in flax and its relationship to the low linolenic acid, *Crop Science*, 35(1):148-152,
- Onurlubaş, H. E., Kızılaslan, H.**, 2007, “Türkiye’de bitkisel yağ sanayindeki gelişmeler ve geleceğe yönelik beklentiler”, Sayfa: 23, (erişim tarihi 5 Şubat 2011), http://www.aeri.org.tr/PDF/Y.No.157_B.Yag.San.Gel.Beklentiler_2007.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Oomah, B. D., Kenaschuk, E. O., Mazza, G.,** 1995, Phenolic Acids in Flaxseed, *J. Agric. Food Chem.*, 43:2016-2019 .
- Oomah, B. D., Mazza, G., Kenaschuk, E. O.,** 1996, Flavonoid content of flax seed. Influence of cultivar and environment, *Euphytica.*, 90:163-167.
- Oomah, B. D. and Mazza, G.,**1997, Effect of dehulling on chemical composition and physical properties of flaxseed, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 30:135–140.
- Orcheson, L., Rickard, S. E., Seidl, M. M., and Thompson L.U.,** 1998, Flaxseed and its mammalian lignan precursor cause a lengthening or cessation of estrous cycling in rats, *Cancer Letters*, 125:69-76.
- Özel, M. Z., Gogus, F., Lewis, A.C.,** 2003, Subcritical water extraction of essential oils from *Thymbra spicata*, *Food Chemistry*, 82:381–386.
- Palma, M., Pineiro, Z. and Barroso, C.G.,** 2001, Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents, *Journal of Chromatography A*, 921: 169-174.
- Paśko, P., Barton, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S., Folta, M., Zachwieja, Z.,** 2009, Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth, *Food Chemistry*, 115:994–998.
- Pekkarinen, S.S., Heinonen, I.M., Hopia, A.I.,** 1999, Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+)-catechin as antioxidants in methyl linoleate, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79:499–506.
- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., García-Viguera, C.,** 2011, Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars, *Food Chemistry*, 125:348–354.
- Plaz, L., de Ancos, B., Pilar Cano, M.,** 2003, Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*.L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method, *Eur Food Res Technol.*, 216:138–144.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Popova, I., E., Hall, C., Kubátová, A.,** 2009, Determination of lignans in flaxseed using liquid chromatography with time-of flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216:217-229.
- Prasad K.,** 1997, Hydroxyl radical scavenging property of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) isolated from flaxseed, *Mol. Cell. Biochem.*, 168:117–123.
- Prasad K.,** 1999, Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed, *Circulation*, 99:1355–1362.
- Prasad K, Mantha S.V., Muir A.D., Westcott N.D.,** 2000, Protective effect of secoisolariciresinol diglucoside against streptozotocin-induced diabetes and its mechanism, *Mol Cell Biochem.*, 206:141–50.
- Qiu, S. X., Lu, Z. Z., Luyengi, L., Lee, S.K., Pezzuto, J.M., Farnsworth, N.R., Thompson, L.U., Fong, H.H.S.,** 1999, Isolation and characterization of flaxseed (*Linum usitatissimum*) constituents, *Pharm. Biol.*, 37:1–7.
- Rangsriwong, P., Rangkadilok, N., Satayavivad, J., Goto, M., Shotipruk, A.,** 2009, Subcritical water extraction of polyphenolic compounds from *Terminalia chebula* Retz. Fruits, *Separation and Purification Technology*, 66:51–56.
- Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E.,** 2006, Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano, Chemical and functional characterization, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41:1560–1565.
- Rowland, G.G.,** 1994, Edible oil flax: new uses for an old crop. *Plant Biotechnol Inst Bull Aug*, National Council of Canada, University of Saskatchewan, Saskatoon, 1–3 p. (Wakjira ve ark., 2004’den alınmıştır).
- Rowland, G. G., McHughen, A., McOnle, C.,** 1988, Field evaluation in non-saline soils of a somaclonal variant of McGregor flax selected for salt tolerance in vitro, *Can J. Plant Sci.*, 68:345-349.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Röbbelen, G., Downey, R. K., Ashi, A.,** 1989, Oil Crops of the World. McGraw-Hill Inc. (Kurt ve ark., 2006'dan alınmıştır).
- Rudnik, E., Szczucinska, A., Gwardiak, H., Szulc, A., Winiarska, A.,** 2001, Comparative studies of oxidative stability of linseed oil, *Thermochimica Acta*, 370:135-140.
- Saarinen, N. M., Warri, A., Makela, S. I., Eckerman, C., Reunanen, M., Ahotupa, M., Salmi, S. M., Franke, A. Kangas, A., Santti, L.,** 2000, Hydroxymatairesinol, a novel enterolactone precursor with antitumor properties from coniferous tree (*Picea abies*), *Nutr. Cancer.*, 36:207–216.
- Saldamlı, İ.,** 2005, Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 463-466 s.
- Sattar, A., Badshah, A., & Zeb, A.,** 1995, Biosynthesis of ascorbic acid in germinating rapeseed cultivars, *Plant Food for Human Nutrition*, 47:63–70.
- Schrader, W.L.,** 2002, Sprout production in California. University of California, Publication 8060, 6. p, (<http://anrcatalog.ucdavis.edu>).
- Schoenrock, U., Untiedt, S., Kux, U., Inoue, K.,** 1997, Application of ferulic acid glucosides as anti-irritants in cosmetic and topical dermatological preparations. German patent. 14 pp, AN 1997:708582. (Beejmohun ve ark., 2007'den alınmıştır).
- Sharma, V., Kundu, P.P.,** 2006, Addition polymers from natural oils-A review, *Prog. Polym. Sci.*, 31:983–1008.
- Shotipruk, A., Kiatsongserm, J., Pavasant, P., Goto, M., Sasaki, M.,** 2004, Pressurized Hot Water Extraction of Anthraquinones from the Roots of *Morinda citrifolia*, *Biotechnol. Prog.*, 20:1872-1875.
- Sicilia, T., Niemeyer, H. B., Honig, D. M., Metzler, M.,** 2003, Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 51:1181-1188.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Silva, F.A.M., Borges, F., Guimaraes, C., Lima, J., Matos, C., Reis, S.**, 2000, Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:2122–2126.
- Smith, V. H. and Jimmerson, J.**, 2005, “Flaxseed”, Agricultural Marketing Policy Center. Briefing No. 56, November, (www.ampc.montana.edu) (erişim tarihi: 7 Ocak 2011)
- Struijs, K., Vincken, J. P., Verhoef, R., Willemiek, H.M., Casteren, O., Voragen, A. G. J., Gruppen, H.**, 2007, The flavonoid herbacetin diglucoside as a constituent of the lignan macromolecule from flaxseed hulls, *Phytochemistry*, 68:1227–1235.
- Suslow, T., Cantwell, M.**, 2002, Seed Sprouts. University of California, (<http://postharvest.ucdavis.edu>) (erişim tarihi: 7 Ocak 2011)
- Thompson, L. U.**, 2003, Flaxseed, Lignans, and Cancer. In S. C. Cunnane, & L. U. Thompson (Eds.), *Flaxseed in human nutrition*, AOCS Press, 195–222 p.
- Thompson, L. U., Rickard, S., Orcheson, L., & Seidl, M.**, 1996a, Flaxseed and its lignan and oil components reduce mammary tumor growth at a late stage of carcinogenesis, *Carcinogenesis*, 17:1373–1376.
- Thompson, L. U., Seidl, M. M., Rickard, S. E., Orcheson, L. J., Fong, H. H. S.**, 1996b, Antitumorigenic effect of a mammalian lignan precursor from flaxseed, *Nutr. Cancer*, 26:159–165.
- Thompson, L. U., Rickard, S. E., Cheung, F., Kenaschuk, E. O., Obermeyer, W. R.**, 1997, Variability in anticancer lignan levels in flax seed, *Nutr. Cancer*, 27: 26–30.
- Tour'E, A., and Xueming, X.**, 2010, Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits, *Food Science and Food Safety*, 9:261-269.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Tüik**, 2011. Türkiye İstatistik Kurumu, Yağlı tohumlar veri tabanı, www.tuik.gov.tr (erişim tarihi, 5 Şubat 2011).
- Türkel, F.**, 2007, “Keten”, <http://patronlar.blogspot.com/2007/10/keten-bitkisini-ve-tohumunda-ok-i-var.html>, (erişim tarihi, 7 Ocak, 2011).
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Lakka, T. A., van der Lee, M., Adlercreutz, H. & Salonen, J. T.**, 1999, Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: a prospective population-based case-control study, *Lancet.*, 354:2112–2115.
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Nurmi, T., Kaikkonen, J., Roberts, L. J., Morrow, J. D., Adlercreutz, H., Salonen, J. T.**, 2002, Association between low serum enterolactone and increased plasma F2- isoprostanes, a measure of lipid peroxidation, *Atherosclerosis*, 160:465–469.
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Rissanen, T. H., Adlercreutz, H., Salonen, J.T.**, 2003, Risk of cardiovascular disease-related and allcause death according to serum concentrations of enterolactone: Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study, *Arch. Intern. Med.*, 163:1099–1104.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D.**, 1998, Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (10):4113–4117.
- Wikipedi**, 2011, “Keten”, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Keten> (erişim tarihi: 7 Ocak 2011).
- Wakjira, A., Labuschagne, M. T., Hugo, A.**, 2004, Variability in oil content and fatty acid composition of Ethiopian and introduced cultivars of linseed, *J Sci Food Agric.*, 84:601–607.
- Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F.**, 1994, Alkanol ammonia water/hexane extraction of flaxseed, *Food Chemistry*, 49:39–44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Wanasundara, P.K.J.P.D., Wanasundara, U.N., Shahidi, F.,** 1999a, Changes in Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seed lipids during germination, *JAOCS.*, 76:41–48.
- Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F. Brosnan, M.E.,** 1999b., Changes in Flax (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination., *Food Chemistry*, 65:289-295.
- Wang, B., Li, D., Wang, L. J., Huang, Z.G., Zhang, L., Chen, X.D., Mao, Z.H.,** 2007, Effect of moisture content on the physical properties of fibered flaxseed, *International Journal of Food Engineering*, 3 (5):1–11.
- Webb, A. L. and McCullough, M. L.,** 2005, Dietary lignans: potential role in cancer prevention, *Nutrition and Cancer*, 51(2):117–131.
- Westcott, N. D., & Muir, A.D.,** 1996, Process for extracting and purifying lignans and cinnamic acid derivatives from flaxseed (PCTpatent No.WO9630468A2) (Johnsson ve ark., 2002'den alınmıştır).
- Wiboonsirikul, J., Kimura, Y., Kadota, M., Morita, M., Tsuno, T., Adachi, S.,** 2007, Properties of extracts from defatted rice bran by its subcritical water treatment, *J. Agric. Food Chem.*, 55:8759–8765.
- Wiesenborn, D., Tostenson, K., Kangas, N.,** 2003, Continuous abrasive method for mechanically fractionating flaxseed, *JAOCS.*, 80:295–300.
- Willför, S. M., Smeds, A. I., Holmbom, B. R.,** 2006, Chromatographic analysis of lignans, *Journal of Chromatography A*, 1112:64-77.
- Yıldırım, M. U.,** 2005, Seçilmiş Alternatif Keten (*linum usitatissimum* l.) Hatlarının Verim ve Verim Öğeleri Bakımından Karşılaştırılması, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, 95s.
- Yang, Y., Belghasi, M., Lagadec, A., Miller, D. J., & Hawthorne, S. B.,** 1998, Elution of organic solutes from different polarity sorbents using subcritical water, *Journal of Chromatography*, 810:149–159.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

- Yang, Y., Kayan, B., Bozer, N., Pate, B., Baker, C., Gizir, A. M.,** 2007, Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water, *Journal of Chromatography A*, 1152:262–267.
- Zanabria, E. R., Katarzyna, N., De Jong, L. E. Q., Birgit, H. B. E., & Robert, M. J. N.,** 2006, Effect of food processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) IKMP-5 on the level of phenolics, phytate, iron and zinc, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:1391–1398.
- Zieliński, Henryk., Frias, J., Piskula, M. K., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C.,** 2005, Vitamin B1 and B2, dietary fiber and minerals content of Cruciferae sprouts, *Eur Food Res Technol.*, 221:78–83