

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**BİTKİ ÖZÜTLERİ VE DOĞAL ÜRÜNLERİN TEREYAĞININ BOZUNMASINI
ÖNLEYİCİ OLARAK KULLANILMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Uğur KARDİL

**OCAK 2016
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /

Tezin Savunma Tarihi : / /

Tez Danışmanı :

Trabzon

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan :

Üye :

Üye :

Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

‘Bitki Özütleri ve Doğal Ürünlerin Tereyağının Bozunmasını Önleyici Olarak Kullanılmaları’ adlı bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Öncelikle çalışma konusunun seçiminde bana yol gösteren, araştırmalarımın başlangıcından bitimine kadar yardım ve desteğini esirgemeyen ve bana araştırma zevki ve bilimsel düşünce disiplini aşılama için çaba gösteren, tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışmasını 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs programı kapsamında desteklemiş olan TÜBİTAK’ a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen Semra ALKAN TÜRKUÇAR, Ayça AKTAŞ KARAÇELİK, Zeynep AKAR, Derya CANSIZ ve Hacer DOĞAN’ a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam için gerekli olan tereyağını sağlayan ve desteklerini esirgemeyen, bölgemizde üretim yapmakta olan Kahvaltı Dünyası firmasına ayrıca teşekkür ederim.

Tüm çalışmam boyunca bana anlayış gösteren ve destek veren canım aileme, araştırmam süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemedikleri için teşekkürü bir borç bilirim.

Uğur KARDİL
Trabzon 2016

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bitki Özüleri ve Doğal Ürünlerin Tereyağının Bozunmasını Önleyici Olarak Kullanılmaları” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 28/01/2016

Uğur KARDİL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	IX
SUMMARY	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIV
SEMBOLLER DİZİNİ	XV
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Giriş.....	1
1.2 Serbest Radikaller ve Oluşum Mekanizmaları.....	2
1.2.1. Serbest Radikallerin Türleri	3
1.2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	4
1.2.1.2. Reaktif Azot Türleri (RAT).....	5
1.2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	5
1.2.2.1. Endojen Kaynaklar	5
1.2.2.2. Eksojen Kaynaklar	6
1.2.3. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri.....	6
1.2.4. Oksidatif Stres ve Buna Bağlı Oluşabilecek Rahatsızlıklar	7
1.3. Antioksidanlar	8
1.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması	8
1.3.1.1. Doğal Antioksidanlar	9
1.3.1.2. Yapay Antioksidanlar.....	10
1.3.2. Serbest Radikallerin Temizlenmesinde Etkili Moleküller	11
1.4. Gıdalar ve Antioksidanlar	12
1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	13
1.5.1. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi	13
1.5.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi	14

1.5.3.	Toplam Fenolik Madde Tayini.....	15
1.5.4.	Tiyosiyanat Yöntemi	15
1.5.5.	MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi	15
1.5.6.	Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi	16
1.5.7.	Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi	16
1.5.8.	Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi	17
1.5.9.	Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi	17
1.5.10.	Floresans Sönme Zamanı Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini	18
1.6.	Ekstraksiyon	18
1.6.1.	Ekstraksiyon Çeşitleri	18
1.6.1.1.	Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon	18
1.6.1.2.	Katı-Sıvı Ekstraksiyon	19
1.6.2.	Ekstraksiyon Yöntemi	19
1.7.	Yağ Oksidasyonu ve Oksidatif Kararlılık	20
1.7.1.	Oksidatif Bozunma Ürünleri	21
1.7.1.1.	Birincil Oksidatif Bozunma Ürünleri	21
1.7.1.2.	İkincil Oksidatif Bozunma Ürünleri	22
1.7.2.	Yağlarda Oksidatif Kararlılık Belirleme Yöntemleri	22
1.7.2.1.	Peroksit Değeri	22
1.7.2.2.	Tiyobarbitürik Asit (TBA) Değeri	23
1.7.2.3.	Konjuge Dien ve Trienlerin Belirlenmesi	23
1.7.2.4.	Para-anisidin değerinin belirlenmesi	23
1.7.2.5.	Serbest Yağ Asitleri Tayini	24
1.8.	Çalışılan Bitkiler ve Özellikleri	24
1.8.1.	Sarısabır Bitkisinin Özellikleri	24
1.8.2.	Isırgan Bitkisinin Özellikleri	25
1.8.3.	Sığır Kuyruğu Bitkisinin Özellikleri	25
1.8.4.	Ihlamur Bitkisinin Özellikleri	26
1.8.5.	Çoban Çantası Bitkisinin Özellikleri	27
1.8.6.	Ekinezya Bitkisinin Özellikleri	27
1.8.7.	Karahindiba Bitkisinin Özellikleri	28
1.8.8.	Kayın Bitkisinin Özellikleri	28
1.8.9.	Gülhatmi Bitkisinin Özellikleri	29

1.8.10. Ökse Otu Bitkisinin Özellikleri	30
1.8.11. Oğul Otu Bitkisinin Özellikleri	30
1.8.12. Ayva Yaprağı Bitkisinin Özellikleri	31
1.8.13. Zeytin Yaprağı Bitkisinin Özellikleri	31
1.8.14. Ebegümece Bitkisinin Özellikleri	32
1.8.15. Funda Bitkisinin Özellikleri	33
1.8.16. Papatya Bitkisinin Özellikleri	33
1.8.17. Sınırlı Ot Bitkisinin Özellikleri	34
1.8.18. Yeşil Çay Bitkisinin Özellikleri	34
1.8.19. Aslanpençesi Bitkisinin Özellikleri	35
1.8.20. Biberiye Bitkisinin Özellikleri	35
1.8.21. Ceviz Yaprağı Bitkisinin Özellikleri	36
1.8.22. Sarı Kantaron Bitkisinin Özellikleri	37
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	38
2.1. Kullanılan Cihazlar	38
2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler	39
2.3. Bitkilerin Temini ve Ekstraktların Hazırlanması	42
2.4. Antioksidan Aktiviteler	43
2.4.1. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi	43
2.4.1.1. Ön Denemeler	43
2.4.1.2. SC ₅₀ Değerinin Belirlenmesi	44
2.4.2. FRAP Yöntemi	44
2.4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı	46
2.5. Duyusal ve Görsel Analizler	47
2.6. Oksidatif Kararlılık Yöntemleri	48
2.6.1. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Değeri	48
2.6.2. Peroksit Değeri	49
2.6.3. Serbest Yağ Asitlerinin Belirlenmesi	49
3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR	51
3.1. Özütlemlerin Antioksidan Aktiviteleri	51
3.1.1. DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri	51
3.1.1.1. Sulu Ekstraktlarda DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri	52

3.1.1.2. Su ile Doyurulmuş Etil Asetat Ekstraktlarında DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri.....	53
3.1.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kuvveti	54
3.1.2.1. Sulu Ekstraktlarda Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kuvveti	54
3.1.2.2. Su ile Doyurulmuş Etil Asetat Ekstraktlarında Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Kuvveti	55
3.1.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı	56
3.1.3.1. Sulu Ekstraktlarda Toplam Fenolik Madde Miktarı	57
3.1.3.2. Su ile Doyurulmuş Etil Asetat Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Miktarı.....	58
3.2. Antioksidan Aktivite Yöntemlerinin Karşılaştırılması	59
3.2.1. Sulu Ekstraktlardaki Antioksidan Aktivite Yöntemlerinin Karşılaştırılması	59
3.2.2. Su ile Doyurulmuş Etil Asetatlı Ekstraktlardaki Antioksidan Aktivite Yöntemlerinin Karşılaştırılması	60
3.3. Su ve Su ile Doyurulmuş Etil Asetatlı Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması	62
3.4. Özütlerin Oksidasyona Karşı Aktiviteleri	63
3.4.1. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Değeri	63
3.4.2. Serbest Yağ Asitleri	66
3.4.3. Peroksit Değeri	69
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	70
5. KAYNAKLAR	72

ÖZGEÇMİŞ

ÖZET

BİTKİ ÖZÜTLERİ VE DOĞAL ÜRÜNLERİN TEREYAĞININ BOZUNMASINI ÖNLEYİCİ
OLARAK KULLANILMALARI

Uğur KARDİL

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2016, 74 Sayfa

Gıda teknolojisi açısından bakıldığında yağ ve yağ içeriği zengin ürünlerin oksidasyona uğrama olasılıkları oldukça fazladır. Oksidasyona uğrayan bu ürünlerin lezzet, renk, doku, koku ve besin değeri gibi karakteristik özellikleri bozulmaktadır. Antioksidanlar oksidatif ransidite ve oksipolimerizasyon sonucu oluşan bu bozunmaları önleyebilmektedirler. Tereyağı veya benzeri gıdalarda oksidasyonu önlemek adına BHT, BHA ve TBHQ başta olmak üzere birçok sentetik antioksidan kullanılmaktadır. Antioksidan olarak kullanılmakta olan bu kimyasalların sağlık açısından birçok zararlı etkisi bulunmaktadır. Hem bu zararlı etkileri giderip hem de oksidasyonu önleyebilmek adına bitki ve baharatlarda bulunan flavonoidler, fenolik asitler, vitaminler ve uçucu bileşikler gibi daha çok sekonder metabolit olan doğal antioksidanları kullanmak daha anlamlı olacaktır. Bu amaçla çalışmada tereyağının tadında, kokusunda ve renginde değişiklik yapmayacak 22 adet bitki temin edilip sulu ve su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktları hazırlandı. Bu numunelere in vitro antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla FRAP, DPPH ve Folin antioksidan aktivite testleri uygulandı. Bu çalışmaların ışığında yüksek antioksidan aktiviteye sahip bitki ekstraktları (UKS11, UKS15, UKS18, UKS19, UKS20, UKE15, UKE18, UKE19, UKE20) tereyağında oksidasyon ve acılaşmayı önlemek adına kullanılmak üzere seçildi. Seçilen bu bitki ekstraktlarının konsantrasyonları 200 ppm olacak şekilde tereyağına ilave edildi. Ayrıca bu numunelere paralel olarak tereyağına 200 ppm konsantrasyonda standart antioksidanlar BHT ve Trolox katılarak örnekleri hazırlandı. Hazırlanan tereyağı numunelerinde oksidasyonu takip etmek amacıyla TBA, PV ve FFA analizleri uygulandı. Takip edilen analiz sonuçlarından UKS15, UKS18, UKS20 ve UKE20 başta olmak üzere bitki ekstraktlarının birçoğunun tereyağında oksidasyonu önlemek üzere doğal antioksidan olarak kullanılabilceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Oksidasyon, Tereyağı

Master' s Thesis

SUMMARY

THE USE OF PLANT EXTRACTS AND NATURAL PRODUCTS IN PREVENTING THE DETERIORATION OF BUTTER

Uğur KARDİL

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK
2016, 74 Pages

In terms of food technology, probability of the fats and the products rich in fat to be oxidized is very high. Characteristic features such as flavor, color, tissue, odor and nutritional value of these oxidized products deteriorate. Antioxidants are known to prevent these deteriorations which occur as a result of oxidative rancidity and oxipolymerization. In order to prevent oxidation in butter and similar foods, many synthetic antioxidants, especially BHT, BHA and TBHQ, are used. The chemicals used as antioxidants have many harmful effects to health. The use of natural antioxidants that are mostly secondary metabolites such as flavonoids, phenolic acids, vitamins and volatile compounds found in herbs and spices will be more meaningful in both preventing these harmful effects and oxidations. For this purpose, 22 plants were obtained that do not make any changes in the taste, smell and color of butter, and their aqueous and water-saturated ethyl acetate extracts were prepared. In order to determine in vitro antioxidant activities of these samples, FRAP, DPPH, and Folin antioxidant activity tests were applied. In the light of these preliminary studies, plant extracts having high antioxidant activity (UKS11, UKS15, UKS18, UKS19, UKS20, UKE15, UKE18, UKE19, UKE20) were selected to be used in order to prevent oxidation and rancidity in butter. The selected plant extracts were added to the butter at 200 ppm concentration. In addition, the reference samples were prepared by adding BHT and Trolox standards to butter samples at 200 ppm concentration. In order to follow the oxidation in the butter samples prepared, TBA, PV and FFA analyses were applied. The results of the analyses revealed that many of the plant extracts and especially UKS15, UKS18, UKS20 and UKE20 can be used as a natural antioxidant in order to prevent oxidation of butter.

Key Words: Antioxidant, Oxidation, Butter

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Antioksidanların sınıflandırılması	8
Şekil 2.	Askorbik asitin yapısı	9
Şekil 3.	E Vitamininin yapısı	9
Şekil 4.	A vitamini öncül maddesi β -karotenin yapısı	10
Şekil 5.	Flavonoidlerin temel yapısı ve bazı substituentleri	10
Şekil 6.	BHT' nin peroksil radikali ile reaksiyonu	11
Şekil 7.	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü	14
Şekil 8.	Demir (III)'ün indirgenme reaksiyonu	15
Şekil 9.	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS ^{•+}) radikalinin formülü	16
Şekil 10.	Fikoeritrin molekülünün formülü	17
Şekil 11.	Neokuproin molekülünün formülü	17
Şekil 12.	Linoleik asitin oksidasyon basamakları	21
Şekil 13.	İkincil oksidasyon ürünlerinin oluşum mekanizmaları	22
Şekil 14.	Sarısabır (<i>Asphodelaceae</i>)	24
Şekil 15.	Isırgan otu (<i>Urtica</i>)	25
Şekil 16.	Sığır kuyruğu (<i>Scrophulariaceae</i>)	26
Şekil 17.	Ihlamur (<i>Tilia</i>)	26
Şekil 18.	Çoban çantası (<i>Capsella bursa-pastoris</i>)	27
Şekil 19.	Ekinezya (<i>Echinacea</i>)	27
Şekil 20.	Karahindiba (<i>Taraxacum officinale</i>)	28
Şekil 21.	Kayın (<i>Fagus</i>)	29
Şekil 22.	Gülhatmi (<i>Alcea rosea</i>)	29
Şekil 23.	Ökse otu (<i>Viscum album</i>)	30
Şekil 24.	Oğul otu (<i>Melissa officinalis</i>)	31
Şekil 25.	Ayva yaprağı	31
Şekil 26.	Zeytin yaprağı	32
Şekil 27.	Ebegümeçi (<i>Malva Vulgaris</i>)	32

Şekil 28. Funda (<i>Ericaceae</i>)	33
Şekil 29. Papatya (<i>Asteraceae</i>)	33
Şekil 30. Sınırlı ot (<i>Plantago Lanceolata</i>).....	34
Şekil 31. Yeşil çay (<i>Camellia sinensis</i>)	35
Şekil 32. Aslan pençesi (<i>Alchemilla vulgaris/arvensis</i>)	35
Şekil 33. Biberiye (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	36
Şekil 34. Ceviz yaprağı (<i>Junglans Regia</i>)	36
Şekil 35. Sarı kantaron (<i>Hypericum perforatum</i>)	37
Şekil 36. DPPH testi için hazırlanan tüpler	43
Şekil 37. Farklı konsantrasyondaki bir standardın 517 nm’de verdiği absorbans değerlerinin grafiğinden SC ₅₀ değerinin hesaplanması (SC ₅₀ = 0,0133 mg/mL)	51
Şekil 38. DPPH yöntemine göre, UKS11 kodlu sulu ekstraktın konsantrasyon- absorbans grafiği	52
Şekil 39. Sulu ekstraktların ve kullanılan standartların 517 nm’deki absorbansa dayalı DPPH radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC ₅₀ değerleri (birim, standartlar için mg/mL, numuneler için seyrelme oranı)	52
Şekil 40. DPPH yöntemine göre, UKE11 kodlu su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktının konsantrasyon-absorbans grafiği.....	53
Şekil 41. Su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktların 517 nm’deki absorbansa dayalı DPPH radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC ₅₀ değerleri (birim, standartlar için mg/mL, numuneler için seyrelme oranı).....	53
Şekil 42. FRAP yöntemine göre, Trolox konsantrasyonu-absorbans grafiği	54
Şekil 43. Sulu ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite).....	55
Şekil 44. FRAP yöntemine göre, Trolox konsantrasyonu-absorbans grafiği	55
Şekil 45. Su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktlarının Fe (III) indirgeme/antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)	56
Şekil 46. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit (GA) konsantrasyon- absorbans grafiği	57
Şekil 47. Folin-Ciocalteu yöntemine göre sulu ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	57
Şekil 48. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit (GA) konsantrasyon- absorbans grafiği.....	58

Şekil 49. Folin-Ciocalteu yöntemine göre su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları	58
Şekil 50. Sulu ekstraktların Toplam fenolik madde miktarı (TP) ve DPPH tayin sonuçlarının karşılaştırma grafiği.....	59
Şekil 51. Sulu ekstraktların FRAP ve Toplam fenolik madde miktarı (TP) tayin sonuçlarının karşılaştırma grafiği.....	59
Şekil 52. Sulu ekstraktların FRAP ve DPPH tayin sonuçlarının karşılaştırma grafiği.....	60
Şekil 53. Su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktlarda FRAP ve DPPH tayin sonuçlarının karşılaştırma grafiği.....	60
Şekil 54. Su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktlarda FRAP ve TP tayin sonuçlarının karşılaştırma grafiği.....	61
Şekil 55. Su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktlarda TP ve DPPH tayin sonuçlarının karşılaştırma grafiği.....	61
Şekil 56. Su ve su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktların SC ₅₀ değerlerinin karşılaştırılması	62
Şekil 57. Su ve su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktların FRAP değerlerinin karşılaştırılması	62
Şekil 58. Su ve su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktların Folin değerlerinin karşılaştırılması	62
Şekil 59. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin TBA değeri verileri	63
Şekil 60. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin TBA değeri artış oranları	64
Şekil 61. 25°C' de 30 gün takip edilen numunelerin TBA değeri verileri	64
Şekil 62. 25°C' de 30 gün takip edilen numunelerin TBA değeri artış oranları.....	65
Şekil 63. 4°C' de 30 gün takip edilen numunelerin TBA değeri verileri	65
Şekil 64. 4°C' de 30 gün takip edilen numunelerin TBA değeri artış oranları	66
Şekil 65. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin FFA değerleri	67
Şekil 66. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin FFA değerlerinin artış oranı	67
Şekil 67. 25°C' de 30 gün takip edilen numunelerin FFA değerleri	67
Şekil 68. 25°C' de 30 gün takip edilen numunelerin FFA değerlerinin artış oranı	68
Şekil 69. 4°C' de 30 gün takip edilen numunelerin FFA değerleri	68
Şekil 70. 4°C' de 30 gün takip edilen numunelerin FFA değerlerinin artış oranı	68
Şekil 71. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin PV verileri	69
Şekil 72. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin PV verilerinin artış oranları	69

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Reaktif oksijen türleri	4
Tablo 2. Reaktif azot türleri	5
Tablo 3. Denemelerde kullanılan cihazlar	38
Tablo 4. Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar	39
Tablo 5. Denemelerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları	40
Tablo 6. Kullanılan numunelerin çözücüleri ve kodları	41
Tablo 7. Frap testi için hazırlanan tüpler	45
Tablo 8. Toplam fenolik madde tayini için hazırlanan tüpler	46
Tablo 9. Ekstraktların duyuusal ve görsel analiz verileri	47

SEMBOLLER DİZİNİ

UV-VIS	: Ultraviyole-Görünür Bölge
ABS	: Absorbans
BHT	: Bütillendirilmiş hidroksitoluen
BHA	: Bütillendirilmiş hidroksianisol
TBHQ	: Tersiyer bütül hidrokinon
TPTZ	: 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine
FRAP	: Demir İndirgeme/Antioksidan Güç
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
SC₅₀	: Radikali %50 temizleyen numune konsantrasyonu (spektrofotometrik)
MDA	: Malondialdehit
TEAC	: Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Yöntemi
ORAC	: Oksijen Radikali Absorbans Kapasite Yöntemi
CUPRAC	: Bakır(II) İndirgeme Antioksidan Kapasite Yöntemi
TAR	: Toplam Antioksidan Cevap
TBA	: Tiyobarbitürik Asit Değeri
PV	: Peroksit Değeri
FFA	: Serbest Yağ Asitleri
G	: gram
H	: Hidrojen iyonu
M	: Molar
Mg	: Miligram
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
vd	: ve diğerleri
•	: Radikal
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µ	: Mikro
s	: Saniye

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Hayvansal bir gıda olan tereyağının hammaddesi süt yağı (%84) olup geri kalan kısmı su, süt şekeri, mineraller, kolesterol, suda çözülmüş vitaminler, asitler, aromalar ve proteinlerden oluşmaktadır. Tereyağının fiziksel özelliğini ise farklı zincir uzunluğunda ve farklı doygunluklardaki yağ asitlerinin yağlardaki kompozisyonu oluşturmaktadır. Gıda sektöründe vazgeçilmez olan tereyağının besin değeri de yaklaşık 740 kcal/100 gram'dır. Ayrıca tereyağı en yüksek protein içeriğine sahip yağ olarak bilinmektedir.

Gıda teknolojisi açısından bakıldığında yağ ve yağ içeriği zengin ürünlerin oksidasyona uğrama olasılıkları oldukça fazladır. Bu ürünler havadaki oksijenle ve ışığın etkisiyle oksidasyona uğramakta olup kendiliğinden gerçekleşen bu olaya “otoksidasyon” denmektedir.

Lipid oksidasyonu yağların ve yağ içeren gıdaların depolanması ve imalatında lezzet, renk, doku, koku ve besin değeri gibi karakteristik özelliklerinin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle oksidasyon kararlılığını arttırmak için yağlarda uzun süredir bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve t-bütül hidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Antioksidanlar serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyici sistemler olarak bilinmektedirler. Ayrıca antioksidanlar, kanser dahil pek çok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonlarını önleyen, yok eden veya etkilerini azaltan moleküllerdir.

Gıda sanayinde yağların ve yağ içeren diğer gıdaların korunması ve raf ömrünün uzatılması için genellikle bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA) sentetik antioksidanları kullanılmaktadır. Gıdaları korumak ve onların raf ömrünü uzatmak için kullanılmakta olan bu sentetik antioksidanlar toksik ve kanserojen olduklarından dolayı çeşitli hastalıklara sebep olup ortalama insan ömrünü azaltmaktadırlar. Bu nedenle tüketiciler daha güvenilir olmaları ve sağlığa olumlu etkilerinden dolayı gıda endüstrisinde doğal katkıların kullanımını arzulamaktadırlar. Bu etkiler göz önüne alındığında araştırmacıların doğal kaynaklardan elde edilebilen yüksek

antioksidan aktiviteli ekstraktları sentetik antioksidanların yerine kullanmayı hedefledikleri açıkça gözükmemektedir.

Literatürde bitki ekstraktlarıyla yağların bozunmasını önlemek amacıyla yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Renata vd., 2014). Ancak tereyağı üretiminde kabul görmüş hiçbir uygulama olmadığından çalışmamızda bu eksikliğin giderilmesi amaçlanmakta ve tereyağı oksidasyonunu önlemek adına yeni doğal antioksidan özüt veya bileşiklerin belirlenmesi hedeflenmektedir.

Çalışmamızda tereyağının tadında, kokusunda ve renginde değişiklik yapmayacak 22 bitki aktarlardan temin edilip sulu ve etil asetatlı ekstraktları hazırlanmıştır. Bu numunelere in vitro antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla demir indirgeme/antioksidan güç (FRAP), DPPH radikal temizleme aktivitesi ve toplam fenolik içerik (Folin) antioksidan testleri uygulanmış olup bu bitki ekstraktlarının sentetik antioksidanlara alternatif olabilecek doğal antioksidan kaynağı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

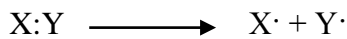
1.2. Serbest Radikaller ve Oluşum Mekanizmaları

Serbest radikaller, bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron içeren atom, molekül veya iyonlar olarak bilinmektedirler.

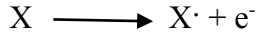
Kuantum kimyasına göre bir bağı yapısını ancak iki elektron oluşturmaktadır. Hatta bu elektronlar ters spinli olmalıdırlar. Elektronlardan biri saat yönünde dönerken diğeri bunun tersi yönde dönmektedir. İnsan vücudunda bulunan elektronların büyük çoğunluğu bu şekilde çiftler halinde bulunmakta olup oldukça kararlıdırlar (Akkuş, 1995).

Çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle çevrede ve hücrel koşullarda sürekli bir radikal oluşumu vardır. Serbest radikaller üç temel yolla oluşur.

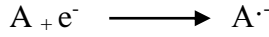
a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Bağı oluşturan elektronlardan her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa bu tür kırılma homolitik kırılma olarak adlandırılır ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Paylaşılmamış elektron taşıyan türler radikalik özellik gösterirler.



b) Nötr bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal olmayan bir molekülün elektron kaybedince dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalıyorsa oluşan bu yapı molekülün radikal formudur.



c) Nötr bir moleküle tek bir elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir.



Oksijen kaynaklı serbest radikaller biyolojik sistemlerin en önemli olanlarıdır. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında tek e^{-} aktarması sonucu oluşan bu radikaller; oksijenin kendisi (singlet oksijen), süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir (Günaydın ve Çelebi, 2003).

Moleküler oksijen eğer bir e^{-} alıyorsa süperoksit (O_2^{\cdot}), iki e^{-} alıyorsa hidrojen peroksit (H_2O_2), üç e^{-} alıyorsa hidroksil (OH^{\cdot}) radikali, dört e^{-} alıyorsa su (H_2O) oluşmaktadır (Lee vd., 2004).



1.2.1. Serbest Radikallerin Türleri

Hüresel koşullarda önemli miktar ve çeşitlilikte serbest radikal üretilmektedir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller ise oksijen ve azottan oluşan radikallerdir.

Reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin önlenemeyen oluşumları yanında canlı sistemlerde istemli üretimleri de mevcuttur. Örneğin savunma hücreleri (fagositler) yabancı organizmalara karşı O_2^- ve H_2O_2 üretirler. Ancak, bu üretimin fazlası canlının kendisine de zarar verebilir.

1.2.1.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijen bulunan bir ortamda fiziksel ve kimyasal etkenlerin sonucu zorunlu metabolik reaksiyonlar meydana gelmektedir. Bu reaksiyonlar sonucu oksijen radikalleri üretilmektedir. Oksijen radikalleri biyolojik sistemlerde bulunan en önemli serbest radikallerden bazıları olup bunlar “reaktif oksijen türleri (ROT)” olarak bilinmektedirler.

Olağan fizyolojik şartlarda ROT'nin üretimi ve yıkımı denge halindedir (Huang vd., 2005). Ancak içerden veya dışardan herhangi bir etken bu dengeyi bozabilir. Ayrıca yaşın ilerlemesiyle birlikte bu denge doğal olarak olumsuz yöne doğru ilerleyebilmektedir. Dengenin bozulmasıyla birlikte olumsuz yönde artış gösteren oksidatif stres birçok hastalığa sebebiyet verebilmektedir.

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)
Hidroksil (OH^{\bullet})	Hipokloröz Asit ($HOCl$)
Peroksil (RO_2^{\bullet})	Hipobromöz Asit ($HOBr$)
Alkoksil (RO^{\bullet})	Ozon (O_3)
Hidroperoksil (HO_2^{\bullet})	Singlet Oksijen (O_2^{\bullet})
Nitrik Oksit (NO^{\bullet})	Lipid Peroksit ($LOOH$)
Lipid Peroksil (LOO^{\bullet})	Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$)

1.2.1.2. Reaktif Azot Türleri (RAT)

Başlıca reaktif azot türleri nitrik oksit radikali ($\text{NO}\bullet$), peroksinitrit radikali ($\text{ONOO}\bullet$) ve azot dioksit radikalidir ($\text{NO}_2\bullet$).

Tablo 2. Reaktif azot türleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Nitrik Oksit ($\text{NO}\bullet$)	Nitröz Asit (HNO_2)
Azot Dioksit ($\text{NO}_2\bullet$)	Diazot Tetra Oksit (N_2O_4)
	Diazot Tri Oksit (N_2O_3)
	Peroksinitrit ($\text{ONOO}\bullet$)
	Peroksinitröz Asit (ONOOH)
	Nitroksil ($\text{NO}\bullet$)
	Nitril Klorür (NO_2Cl)
	Nitrotil Katyonu (NO^+)

1.2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller genel olarak bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip, kararsız, molekül ağırlığı düşük, kısa ömürlü ve etkin moleküller olarak bilinmektedirler. Birçok çevresel ve metabolik faktör serbest radikal oluşumunu tetiklemektedir. Bu serbest radikaller endojen ve eksojen kaynaklı faktörlere bağlı olarak hücrelerde oluşmaktadır.

1.2.2.1. Endojen Kaynaklar

Metabolizmada gerçekleşen bazı biyokimyasal olayların farklı basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Oluşan serbest radikaller organizmaya zarar verseler dahi metabolizma olaylarının sürdürülebilmesi için bunların oluşumu kaçınılmazdır (Halliwell vd.,2002).

Mitokondriyal elektron taşıma zinciri reaksiyonları, mikrozomal membran elektron taşıma zinciri reaksiyonları, oksidan enzimlerin reaksiyonları, ksantin oksidaz, dopamin β -hidroksilaz, D-amino asid oksidaz, urat oksidaz gibi enzimlerin reaksiyonları, hücre zincirine bağlı NADPH oksidaz, prostaglandin (PG) sentezi ve lipooksijenazların etkinliği ve otooksidasyon reaksiyonları serbest radikal oluşturan başlıca endojen kaynaklardır.

1.2.2.2. Eksojen Kaynaklar

Hastalıklar, fiziksel faktörler, çevresel faktörler ve bireysel hatalar eksojen kaynakların oluşumuna olanak sağlamaktadır.

Hücrelerin yaşlanması, aşırı stres yapmak, bilinçsiz yapılan egzersizler, doku hasarı ve kronik hastalıklar, diyetel antioksidanların alınmasını önleyen koşullar, yanlış beslenme, sigara dumanı, hava kirliliğine maruz kalmak ve yanlış ilaç kullanmak eksojen kaynaklara örnek verilebilir.

1.2.3. Serbest Radikallerin Zararlı Etkileri

Oldukça reaktif moleküller olan serbest radikaller eğer nötralize edilmezler ise vücutta çok ciddi hasarlara sebep olabilirler. Genel olarak hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (Onat, 2002).

Serbest radikallere karşı en hassas biyomoleküller lipidlerdir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerin başlatmış olduğu ve membranlarda mevcut olan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu kapsayan kimyasal bir olaydır.

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi amino asit bileşimine bağlıdır. Prolin, histidin, arginin, sistein ve metiyonin gibi protein yapısında bulunan aminoasitler radikal hasarına açıktır. Bu aminoasitlerin oksidasyonu proteinlerin parçalanmasına ve çapraz bağ oluşumuna sebep olmaktadır.

Hücrelerin genetik kodunu taşıyan nükleik asitler (DNA) de serbest radikallerden etkilenmektedir. DNA' yı etkileyen bu serbest radikaller hücrede mutasyon ve ölüme yol açarlar.

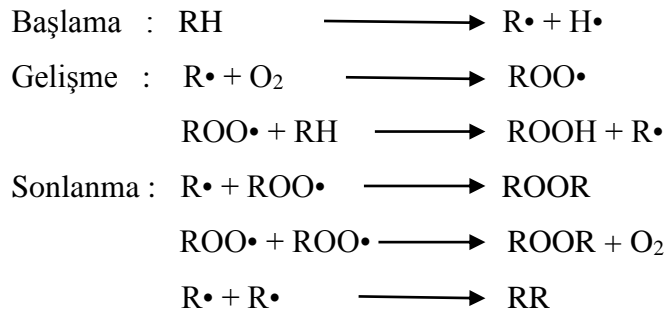
Serbest radikaller aynı zamanda karbohidratlara etki ederek çeşitli ürünler meydana getirirler. Oluşan bu ürünler çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

1.2.4. Oksidatif Stres ve Buna Bağlı Oluşabilecek Rahatsızlıklar

Oksidatif stres pek çok hastalığın gelişmesine yol açmaktadır. Oksijen kullanan metabolik yollardan kaynaklanan oksidatif stres prooksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Prooksidan sistem antioksidan sisteme baskın geldiğinde oksidatif stres meydana gelmektedir.

Biyomoleküllerin korunması bakımından metabolizmada üretilen serbest radikallerin fazlasının baskılanması hayati önem taşımaktadır. Radikalik tepkimelerin sonlanması için radikaller antioksidanlarla indirgenmeli, radikaller birbirleriyle tepkimeye sokulmalı veya ortamda tepkimeye girebilecek bileşik bırakılmamalıdır.

Radikal tepkimeleri basitçe üç basamakta meydana gelip ilk basamak zincir başlama basamağıdır. Burada sadece bağ kırılmasıyla ilk radikaller oluşur. İkinci basamak, zincir gelişme basamağı olup bu basamağın her birinde bir bağ kırılırken bir bağ oluşmaktadır. Son basamak olan zincir sonlanma basamağında yeni bağlar oluşurken hiç bağ kırılması olmaz.



Biyoloji ve tıpta yaşamsal öneme sahip olan radikal tepkimeleri yaşayan her canlıda her an gerçekleşmektedirler. Çünkü radikal oluşumu metabolizmanın normal akışı esnasında sürekli olarak meydana gelmektedir. Etkili reaktif olan radikaller canlıda kontrol edilemeyen hasarlara yol açabilmektedirler. Bu nedenle radikallerin ömrü kısaltan birçok hastalığın gelişimine yol açtığı düşünülmekte ve bu etkilerin yaşlanma sürecini hızlandırdığına inanılmaktadır.

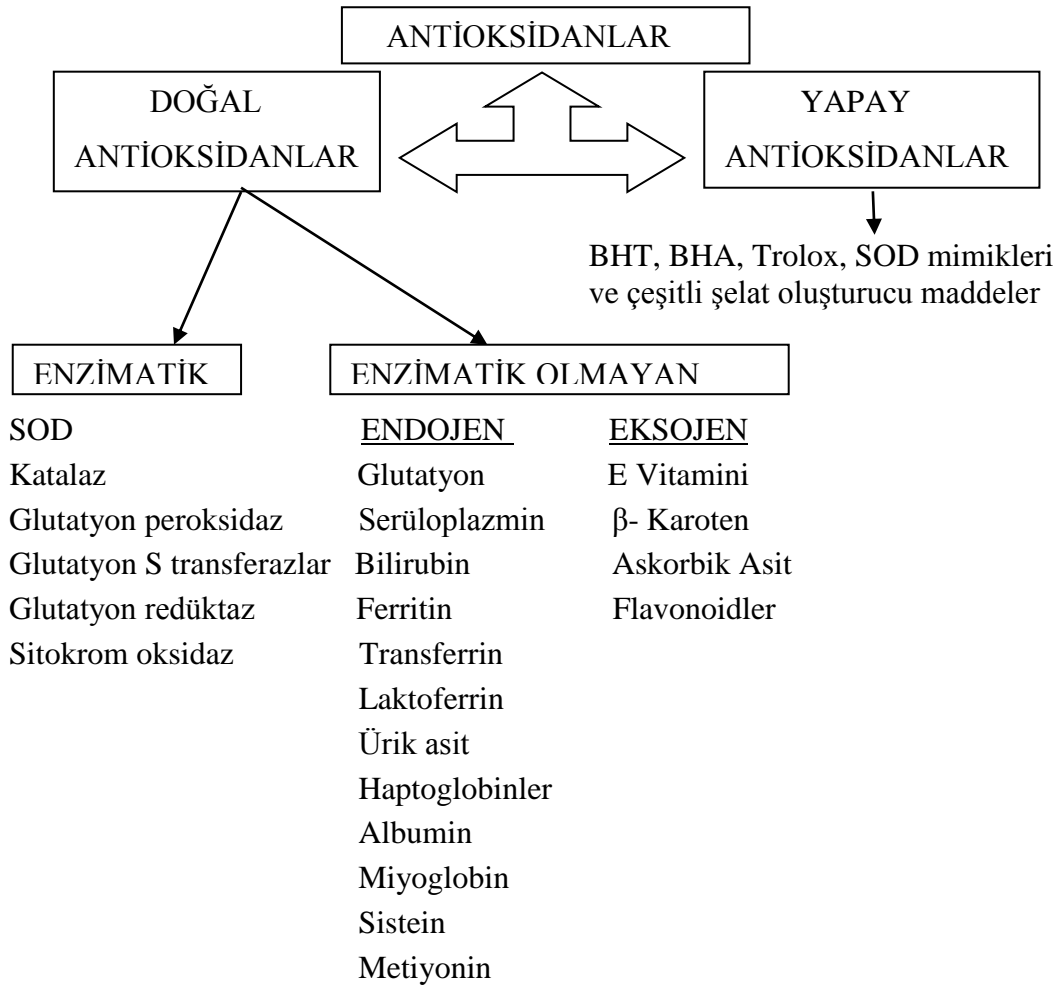
Oksidatif stres kalp krizi, ateroskleroz, hipertansiyon, diyabet, yaşlanma, kanser, parkinson, alzheimer, otoimmün bozukluklar, akut akciğer hasarı, akut solunum zorluğu, inflamasyon ve hiperoksi gibi hastalıklara neden olmaktadır (Ratnam vd., 2006).

1.3. Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla geliştirilen savunma sistemleri antioksidanlar olarak tanımlanırlar. Antioksidanlar oksidasyonu engelleyen veya azaltan kimyasal bileşenler olup dokularda oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerini önleyerek kanser, damar sertliği, kalp krizi gibi çeşitli hastalıklara karşı koruyucu etki gösterirler.

1.3.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar genel olarak doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar olmak üzere sınıflandırılmaktadırlar.



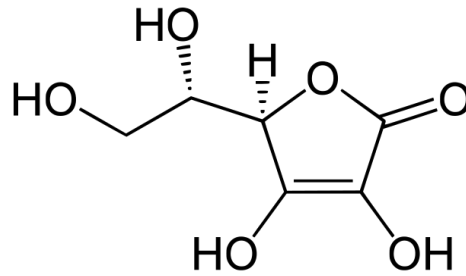
Şekil 1. Antioksidanların sınıflandırılması

Doğal antioksidanlar kendi içinde enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki ana grupta toplanmaktadırlar. Enzimatik olmayanlar da; endojen ve eksojen olarak sınıflandırılırlar. Eksojen olanlar vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanlarıdır.

1.3.1.1. Doğal Antioksidanlar

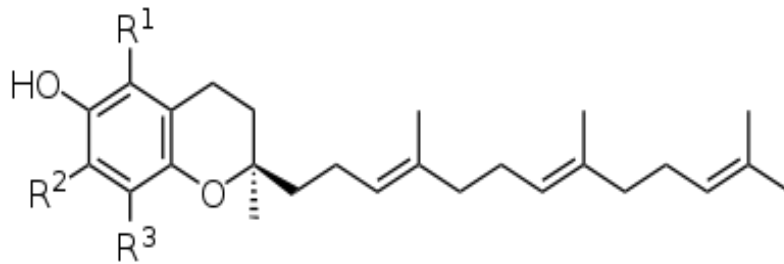
Doğal antioksidanlar bitki ve baharatlarda bulunan flavonoidler, fenolik asitler, vitaminler, uçucu bileşikler gibi daha çok sekonder metabolit olan bileşiklerdir.

Güçlü bir indirgeyici olan C vitamini (askorbik asit) organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonunda görev alır. Güçlü indirgen özelliğe sahip olması kuvvetli antioksidan olduğunu göstermekte olup $\text{HO}\cdot$ ve $\text{O}_2\cdot$ radikalleri ile reaksiyona girerek onları temizler.



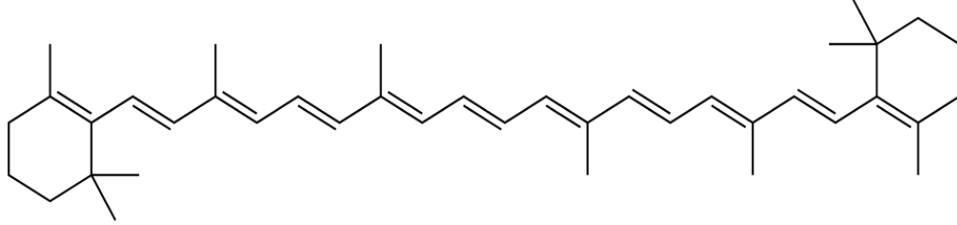
Şekil 2. Askorbik asitin yapısı

Doğada bulunan çok sayıdaki tokoferol formlarından biri olan α - tokoferol (E vitamini) biyolojik aktivitesi en fazla olanıdır. Yapısındaki fenolik hidroksil gruplu aromatik halka E vitamininin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur.



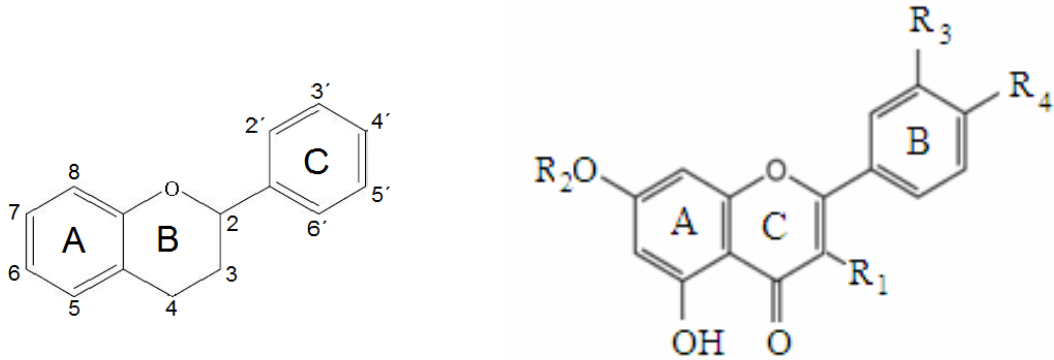
Şekil 3. E vitamini (5,7,8-trimetiltokol [α -tokoferol])' nin yapısı

β -Karoten (A vitamini öncül maddesi) ve polifenoller radikallerin temizlenmesinde ve zincir reaksiyonlarının durdurulmasında çok etkili ve enzimatik olmayan antioksidanlardır (Chen vd., 1988; Edge vd., 1997).



Şekil 4. A vitamini öncül maddesi β -karotenin yapısı

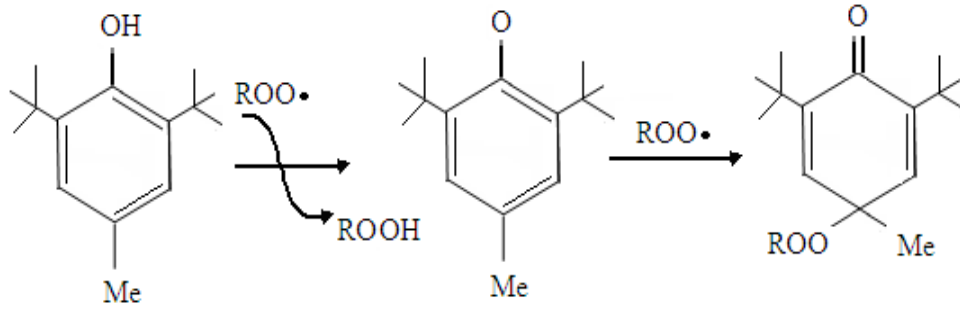
Bitki fitokimyasalları olan flavonoidler insanlar tarafından sentezlenememektedirler. Meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan flavonoidler içerdikleri C halkasındaki farklılıklara göre flavononlar, flavonlar, flavonoidler, antosiyanidinler, flavanlar ve izoflavonoidler şeklinde sınıflandırılırlar.



Şekil 5. Flavonoidlerin temel yapısı ve bazı substituentleri

1.3.1.2. Yapay Antioksidanlar

Gıdaları korumak amaçlı kullanılan sentetik antioksidanların başında bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propilgallat (PG) ve tert-bütül hidrokinon (TBHQ) gelmektedir. Peroksit radikalleriyle iki aşamada etkileşip onu daha az reaktif yapan 2,6 di-tert-bütül-4 metil fenol (BHT), çok önemli bir sentetik antioksidandır.



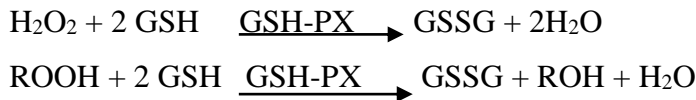
Şekil 6. BHT (2,6 di-tert-butil-4 metil fenol [butillenmiş hidroksitoluen])'nin peroksil radikali ile reaksiyonu

1.3.2. Serbest Radikallerin Temizlenmesinde Etkili Moleküller

Enzimatik antioksidan olan süperoksit dismutaz (SOD) organizmada substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir ve oksijenin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizler.



Glutatyon peroksidaz (GSH-PX) hücre içerisinde düşük konsantrasyonda meydana gelen peroksit ürünlerinin dismutasyonundan sorumlu iken katalaz (KAT) yüksek konsantrasyonda meydana gelen hidrojen peroksidin dismutasyonundan sorumlu olan enzimatik antioksidanlardır.



Yükseltgenmiş glutatyonun indirgenmiş glutatyona dönüşümünü sağlayan antioksidan ise glutatyon redüktazdır. Glutatyon S transferaz (GST) da lipid peroksitlerine karşı selenyum bağımsız GSH-PX aktivitesi göstererek antioksidan savunma mekanizması oluşturur.

Solunum zincirinin son enzimi olan mitokondriyal sitokrom oksidaz süperoksiti detoksifiye eder (Akkuş, 1995).

Bir peptit olan glutatyon (GSH) hücre içerisinde bulunan en önemli antioksidan moleküldür. Enzimatik olmayan endojen antioksidanlardan glutatyon hemoglobinin

oksidlenerek methemoglobine dönüşümüne engel olur. Ayrıca proteinlerdeki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur. C vitamininin oksidasyonu engelleyici etkiye sahip olan ürat, hidroksil, süperoksit, peroksit radikallerini ve singlet oksijeni temizler. Bilirubin süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı olarak görev yaparken albümin LOOH ve HOCl toplayıcısı olarak görev yapmaktadır. En zararlı serbest radikal olan hidroksil radikalini (OH•) ortadan kaldıran güçlü bir antioksidan olan melatonin (MLT) en güçlü antioksidan olarak kabul görmektedir.

1.4. Gıdalar ve Antioksidanlar

Lipid oksidasyonu gıdaların korunması ve depolanması sırasında meydana gelen önemli problemlerden biridir. Lipid oksidasyonu yağlarda acılaşmaya, yağ içeren gıdalarda ise renk, tat, koku, aroma, yapı bozulmalarına ve besinsel kalitenin azalmasına sebep olmaktadır.

Gıda sanayisinde oksidatif bozunmaları önlemek adına butillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) başta olmak üzere birçok sentetik antioksidan kullanılmaktadır. Gıdaların raf ömrünü uzatmak için kullanılmakta olan bu sentetik antioksidanlar toksik ve kanserojen olduklarından dolayı çeşitli hastalıklara sebep olup ortalama insan ömrünü azaltmaktadırlar. Bu sentetik antioksidanlar geniş bir şekilde gıdalarda, gıda paketlemede ve kozmetikte kullanılmaktadır. Tereyağı, kurabiye, granola barları, patates cipsi, margarin, mısır gevreği, dondurma, sakız, kek, yüz temizleyiciler, ruj, vücut yağları, güneş kremleri, nemlendiriciler ve parfümler de bu sentetik antioksidanları içermektedirler.

Doğal antioksidanlara oranla daha ucuz olmaları sebebiyle tercih edilen sentetik antioksidanlar sağlık açısından potansiyel risk oluşturmaktadırlar (Yagi, 1987; Pokorny, 1991). Dahası geniş çaplı kullanılmakta olan bu sentetik antioksidanların kolesterol artışı, karaciğer büyümesi ve kanser oluşumuna sebep olduğu farelerle yapılan hücre içi çalışmalarda tespit edilmiştir (Lindenschmidt vd., 1986). BHA yüksek dozda (1-2 %) idrar torbası kanseri (İmaida vd., 1983; 1984), düşük dozda (2-0.5 %) mide kanseri (Tsuda vd., 1984; Hirose vd., 1991) oluşumuna sebep olmaktadır. BHT deneysel çalışmalarda kullanılmış ve akciğer iltihabına (Kisley vd., 2002) böbrek ve karaciğer hasarına (Frag vd., 2003) sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca serum analizlerinde triaçilgliserol (TGA), çok

düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL kolesterol) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL kolesterol) konsantrasyonu artışına sebep olduğu görülmektedir (Faine vd., 2006). TBHQ fareler üzerinde yapılan çalışmalarda kullanılmış olup mide, böbrek ve idrar torbasında doku bozulmalarına sebep olduğu gözlenmiştir (Li vd., 2002; Tamano vd., 1987).

Gıda katkı maddelerinin insan sağlığını tehdit eden negatif etkileri zaman zaman gazete ve televizyonlara haber olmakta, tüketici de bu durumdan olumsuz etkilenmektedir. Daha güvenilir olmaları ve sağlığa olumlu etkilerinden dolayı gıda endüstrisinde doğal katkıların kullanımını arzulamaktadırlar. Son yıllarda tüketici beklentileri yapay katkı maddeleri kullanılmayan doğal ve organik ürünlere odaklanmaktadır. Bu amaçla gıdalarda kullanılmakta olan katkı maddeleri yerine doğal antioksidan bileşiklerin tercih edilmesi hem tüketici beklentilerini yerine getirmekte hem de sağlığımızı olumlu etkilemektedir. Bununla birlikte kullanılmakta olan sentetik antioksidanların sağlığa zararlı etkilerinden dolayı araştırmacıların çalışmaları bitkilerde bulunan antioksidanlar üzerine yoğunlaşmaktadır (Skrede vd., 2004). Son zamanlarda bu yüzden antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri göz önüne alınarak birçok bitki ekstraktı çalışılmakta ve bunlar kontrollerle karşılaştırılmaktadır (Nadeem vd., 2013; Renata vd., 2014; Nilkanth vd., 2012).

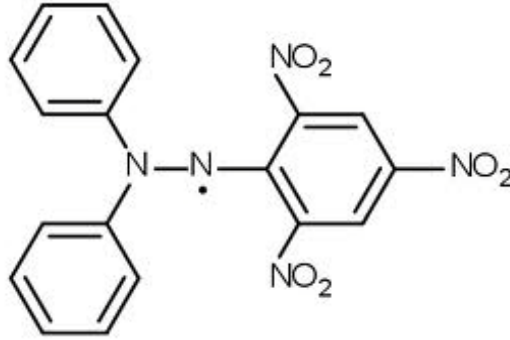
1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidanlar oksidatif strese bağlı olarak oluşabilecek hasarları önlemek amacıyla kullanılmaktadırlar. Birçok maddenin bu amaçla kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmek için fazla sayıda antioksidan tayin yöntemi geliştirilmiştir. Yaygın kullanılmakta olan bu yöntemlerin bir kısmı şu şekilde sıralanmaktadır.

1.5.1. DPPH• Radikali Temizleme Aktivitesi Yöntemi

Ticari olarak satılan bir serbest radikal olan DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) 517 nm'de maksimum absorbans oluşturmaktadır (Cuendet vd., 1997). DPPH' tan kaynaklanan mor rengin şiddeti antioksidanlarla muamele edilince giderek azalır absorbansın düşmesine neden olmaktadır. Konsantrasyonları farklı olan numunelere eklenen DPPH'nin absorbansında meydana gelen değişim ölçülüp, absorbans değerlerine

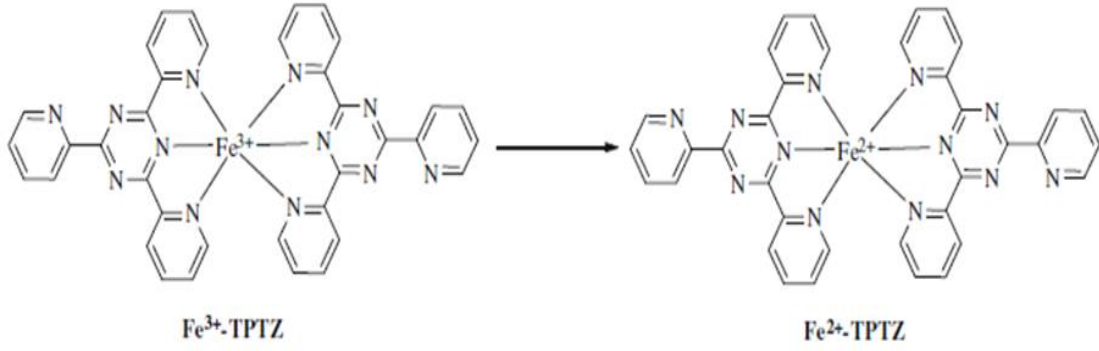
karşılık gelen konsantrasyonlarla grafik çizilmektedir. Oluşan grafikte $y=ax+b$ denkleminden faydalanılarak DPPH konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı $\mu\text{g/mL}$ cinsinden belirlenip SC_{50} değeri olarak ifade edilmektedir (İskefiyeli, 2014). Bu yöntemde antioksidan molekülün yapısı ve boyutu test sonucunu etkilediğinden önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır. Fakat bu yöntem kolay olması ve kısa sürmesi sebebiyle radikal temizleme aktivite tayinlerinde sıklıkla kullanılmaktadır.



Şekil 7. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin formülü

1.5.2. Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet (FRAP) Yöntemi

Bileşenin toplam indirgenme kapasitesinin dolaylı yollarla belirlendiği bu yöntem Oyaizu tarafından oluşturulmuştur (Oyaizu, 1986). Bu yöntem Fe^{+3} ün Fe^{+2} ye indirgenmesi sonucu oluşan renk değişiminin 595 nm’ de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Sonuçların yorumu indirgeme potansiyeli yüksek standart antioksidanlardan troloks ve askorbik asitle mukayese edilerek belirlenir. Sıklıkla tercih edilen bu yöntemde 2, 4, 6-tripiridil-*s*-triazin (TPTZ)’ in $Fe(III)$ tuzu kullanılmaktadır. FRAP yöntemiyle redoks potansiyeli 0,7 V’ tan daha düşük olan bileşikler antioksidan olarak belirlenebilmektedir. Polifenolik bileşenlerde hidroksilasyon ve konjugasyonun miktarı bu yöntemde aktiviteye etki etmektedir. FRAP yöntemi ile H transferi ile radikal temizleyen tiyol ve proteinlerin antioksidan kapasitesi belirlenmemektedir.



Şekil 8. Demir (III)'ün indirgenme reaksiyon

1.5.3. Toplam Fenolik Madde Tayini

Su ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin reaktifi ile muamelesi sonucu renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 700 nm' de maksimum absorban oluşturmaktadır (Slinkard ve Singleton, 1977). Adından tam olarak anlaşılmasa da bu yöntem numunenin indirgenme kapasitesini belirlediği için aslında bir antioksidan tayin yöntemidir.

1.5.4. Tiyosiyanat Yöntemi

Bu yöntem Tween-20, linoleik asit ve fosfat tamponu ile oluşturulan emülsiyonda bulunan doymamış yağ asitlerinden biri olan linolenik asidin 40 °C' de 140 saat oksijenle inkübasyonu sonucu oluşan lipid peroksidin miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. Düşük absorban yüksek antioksidan aktiviteyi gösterirken yüksek absorban ise düşük antioksidan aktiviteyi göstermektedir. Ortamda bir antioksidan maddenin varlığında lipid peroksit ürünü oluşamayacağı için konsantrasyonu düşük çıkacaktır. Bundan dolayı düşük absorban gösterecektir.

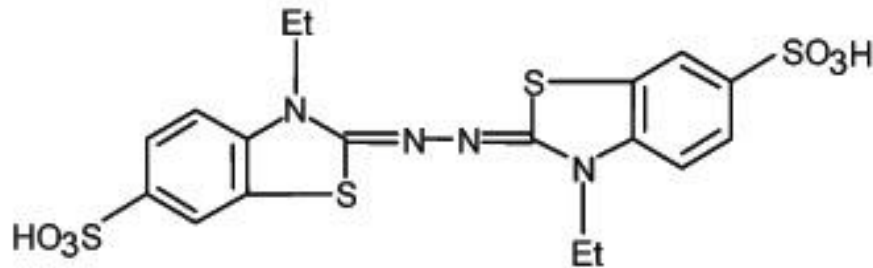
1.5.5. MDA Oluşumunun İnhibisyonu Yöntemi

Lipit peroksidasyonunun ikincil ürünlerinden en iyi bilineni olan MDA aynı zamanda hücre duvarı hasarının belirlenmesinde indikator olarak kullanılabilir. Son yıllarda, Ohkawa' nın oluşturduğu yöntemlerden biri biraz farklılaştırılarak

uygulanmaktadır (Ohkawa vd., 1979). Bu yöntem, karaciğer doku homojenatı, Fe^{+2} ve askorbik asit muamele edilerek oluşturulan Fenton reaksiyon karışımından meydana gelen ve bir lipid peroksit ürünü olan MDA' nın sıcak ve asidik şartlarda tiyobarbitürik asit ile renkli kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan renkli kompleks 532 nm' de maksimum absorbands vermektedir. Bu analizde antioksidan aktivite, köre karşı MDA oluşumunu %50 baskılayan madde miktarı (IC_{50}) olarak verilmektedir. %50 baskılamayı en düşük konsantrasyonda yapabilen madde miktarını veren bileşen antioksidan yönden en aktif olanıdır. MDA oluşumunun baskılanması antioksidan kapasitenin varlığını göstermektedir.

1.5.6. Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi

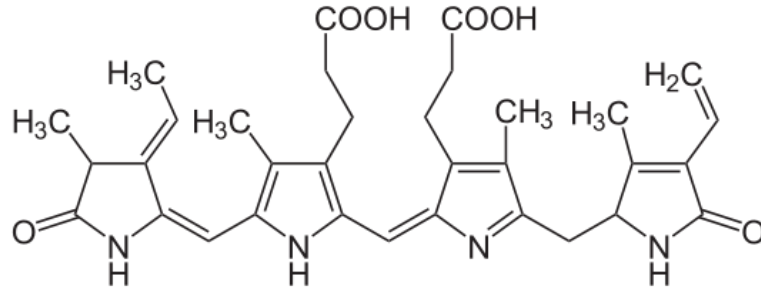
Bu yöntem ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)) molekülünün H_2O_2 ve metmiyoglobine mavi-yeşil renkli $ABTS^{+}$ radikaline dönüşmesi ve bu dönüşümün 734 nm' de fotometrik olarak gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Antioksidanların varlığı bu dönüşümü engellemektedir.



Şekil 9. 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) ($ABTS^{+}$) radikalinin formülü

1.5.7. Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

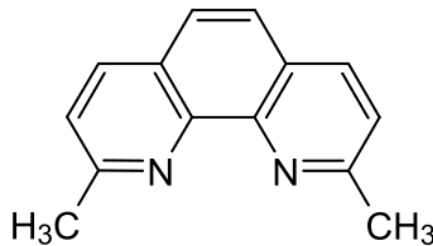
Bu yöntem β -fikoeritrin (β -phycoerythrin [β -PE]) isimli bir prob maddesinin floresansının, peroksil ve hidroksil radikalleri varlığında sönüme uğraması ve ortamdaki antioksidanların bu olayı geciktirmesi esasına dayanmaktadır. β -fikoeritrin'in sebep olduğu floresanstaki azalışın şiddeti onun peroksil radikalinden gördüğü hasarın miktarını göstermektedir. Numunede bulunan antioksidanlar floresanstaki bu düşüşü yavaşlatmakta ya da tamamen durmasına sebep olmaktadır (Apak vd., 2004)



Şekil 10. Fikoeritrin molekülünün formülü

1.5.8. Bakır (II) İndirgenme Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Radikal reaktiflerin pahalılık, güç, bulunabilirlik ve kararsızlık sorunlarından arınmış olan CUPRAC yöntemi, diğer antioksidan aktivite belirleme yöntemlerine kıyasla daha hızlı, basit ve kullanışlıdır. Cu(II)-neokuproin reaktifi ılımlı bir yükseltgen olduğu için gıda maddelerinde fazlasıyla bulunan sitrat ve glukoz gibi bileşenlerle tepkime vermeksizin sadece antioksidanları yükseltger ve reaksiyon ürünü Cu(I)-neokuproin kelatının 450 nm'deki absorbansı okunarak sonuç verilir. CUPRAC, fizyolojik pH'lara yakın olan pH=7 ortamında yürütüldüğü için fizyolojik koşulları yansıtmaya olasılığı daha fazladır. Ayrıca yöntem, tiyol (-SH) tipi antioksidanlarla çabuk ve net sonuçlara ulaşır. Uygun çözücü seçilmesi durumunda hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar tayin edilebilir (Apak vd., 2005).



Şekil 11. Neokuproin molekülünün formülü

1.5.9. Toplam Antioksidan Cevap (TAR) Tayin Yöntemi

Erel tarafından oluşturulan bu yöntem değiştirilerek uygulanmaktadır (Erel, 2004). Fe⁺²-*o*-dianisidin kompleksinin standardize çözeltisi, standardize H₂O₂ çözeltisi ile Fenton tipi bir reaksiyon vererek OH• radikalini oluşturmaktadır. Oluşan bu kuvvetli ROS (reaktif

oksijen türleri) radikali düşük pH' larda indirgenmiş renksiz *o*-anisidin moleküllerini, sarı-kahverengi dianisidil radikallerine yükseltir. Dianisidil radikalleri üzerinden başlayan bu oksidasyon sonucu dianisidil radikalleri de kendi aralarında reaksiyona girerek büyük kompleksler oluşturur, diğer oksidasyonlara neden olur ve zincirleme oksidasyon reaksiyonları gerçekleştirerek rengi giderek koyulaştırırlar. Eğer ortama antioksidan aktiviteye sahip bir madde ilave edilirse bu madde oksidasyon reaksiyonlarını durdurmaya alışır ve dolayısıyla rengin de koyulaşmasına engel olur. Bu reaksiyon spektrofotometre ile 444 nm' de gözlenebilir. Renk oluşumunun bastırılması ise Troloks ile ayarlanır.

1.5.10. Floresans Sönme Zamanı Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

Chang tarafından kullanılan bu yöntem modifiye edilmiştir (Chang vd., 2001). Numune silika jelden hazırlanmış ve floresans özelliğe sahip alüminyum-silika jel tabakalara emdirilip kurutulduktan sonra plaka linolenik asit emülsiyonuna daldırılır, tamamen kurutulur ve UV-lamba (254 nm) altında bekletilir. Bu sırada oksijenin de etkisi ile linolenik asit emülsiyonunda önce kararmalar ve sonra parlak lekeler oluşur. Oluşan bu parlak lekelerin kaybolma zamanı antioksidan varlığına bağlı olup antioksidan maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

1.6. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon katı bir numune, bir çözelti ya da süspansiyon içindeki organik maddeyi çözen fakat çözelti ya da süspansiyondaki çözücü ile karışmayan bir çözücü yardımıyla ayırmaktır. Uygulamada bir saflaştırma yöntemi olmaktan çok bir ayırma yöntemi olarak kullanılır.

1.6.1. Ekstraksiyon Çeşitleri

1.6.1.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyon

İki sıvının yoğunluk farkından yararlanılarak uygulanan bu yöntemde ayırma hunisi kullanılmaktadır. Karışım ayırma hunisine alındığında yoğunluğu küçük olan sıvı üstte

toplanırken yoğunluğu büyük olan sıvı altta toplanacaktır. Yoğunlukları birbirine yakın olan maddeler kolay ayrılmamaktadır. Bu durumda ayırma yapmak için ya su fazını NaCl gibi bir tuzla doyurup yoğunluğunu arttırmak ya da ayırma hunisini çalkalamak gerekmektedir. Sulu fazda bulunan organik maddeyi organik çözücü fazına alabilmek için ayırma hunisi çalkalanmakta olup bu esnada oluşan gazın çıkması için musluk hafifçe açılmaktadır. Gaz çıkışı sonuçlanana kadar bu işleme devam edilmektedir. Daha sonra üstteki faz musluğun hizasına gelinceye kadar alt faz huniden dikkatlice boşaltılmaktadır.

1.6.1.2. Katı-Sıvı Ekstraksiyon

Bu ekstraksiyon yöntemi başlıca doğal ve biyolojik örneklerle ilgili uygulamalarda kullanılmaktadır. Katı-sıvı ekstraksiyonunda katının içerdiği maddelerden biri veya bir bölümü uygun bir çözücü kullanılarak ekstrakte edilmektedir. Katıların ekstraksiyonu genel olarak kısa sürede gerçekleşmediği için sürekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Maddenin katı içinden diffüzyonlanması yavaş bir işlem olduğu için numunenin çözücüyle temasını arttırmak adına katı örnek toz haline getirildikten sonra ekstrakte edilmektedir. Katı-sıvı ekstraksiyonunda “Soxhlet Ekstraktörü” denen bir cihaz kullanılmaktadır.

1.6.2. Ekstraksiyon Yöntemi

Bitkisel materyallerde bulunan etken maddeleri elde etmek için farklı çözücüler kullanılarak uygulanan bir yöntemdir. Ekstraksiyon yöntemi, kullanılan çözücünün cinsine göre farklılık göstermektedir.

a. Çözücü ile Ekstraksiyon: Bitkisel materyal, yapısındaki bileşenleri kolaylıkla çözebilen benzen, hegzan, petrol eteri, kloroform, etil asetat, metanol, aseton, asetonitril, DMSO veya su gibi çözücülerle muamele edilmektedir. Çözücünün düşük basınç altında uçurulması ile ham ekstrakt elde edilmektedir.

b. Sabit Yağ ile Ekstraksiyon: Daha çok uçucu yağların eldesinde yağ miktarının az olduğu ve diğer destilasyon yöntemlerinin uygun olmadığı durumlarda ise bitkisel materyal bir sabit yağ ile belli bir süre temasta bırakılmaktadır. Böylelikle uçucu yağ zamanla sabit yağa geçmektedir.

c. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu: Son yıllarda, hızla gelişen süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SC), ekstraksiyon yöntemlerine karşı alternatif olarak dikkat çekmektedir. Bu yöntemde çözücü tüketimi ve basamak sayısı azalmakta olup analiz süresi kısalmaktadır. Çözücünün hacminin azaltılması hem maliyeti düşürmekte hem de çevreye verilen zararı azaltmaktadır. Süperkritik akışkanlarda çözme gücü yoğunluktaki değişimlerle kontrol edilebilmektedir. Farklı polarite ve molekül boyutlu bileşikler tek bir süperkritik akışkan kullanılarak ekstrakte edilebilmektedir. Bu özellik süperkritik akışkanların daha etkin bir çözücü olmasını sağlamaktadır. Süperkritik akışkanlar fizikokimyasal özellikleri bakımından sıvılarla gazların özellikleri arasında yer almaktadırlar. Ayrıca süperkritik akışkanlarda moleküllerin difüzyon katsayıları sıvı ortamındakinden fazla olduğu için akışkan hızı daha yüksektir. Bu yöntem kolaylıkla otomatikleştirilip kromatografik ve spektrofotometrik tekniklerle birleştirilebilmektedir.

1.7. Yağ Oksidasyonu ve Oksidatif Kararlılık

Yağların depolanması ya da işlenmesi sırasında oksidasyona karşı göstermiş oldukları direnç oksidatif kararlılık olarak ifade edilmektedir. Oksidatif kararlılık, yağların kalitelerini ve raf ömrünü belirlemede kullanılan önemli bir göstergedir.

Yağ ve yağ içeren gıdalar hava oksijeninin ve ışığın etkisiyle oksidasyona uğramaktadır. Gıda bileşenleri ile hava oksijeni arasında kendiliğinden meydana gelen bu olaya "otoksidasyon" denmektedir. Oksidasyona yol açan veya hızlandıran etkenlerin başında oksijen gelmekte olup ayrıca ışık, sıcaklık, demir ve bakır gibi metal iyonları, bir kısım pigmentler ve doymamışlık derecesi oksidasyonu hızlandırmaktadır (Keskin, 1981).

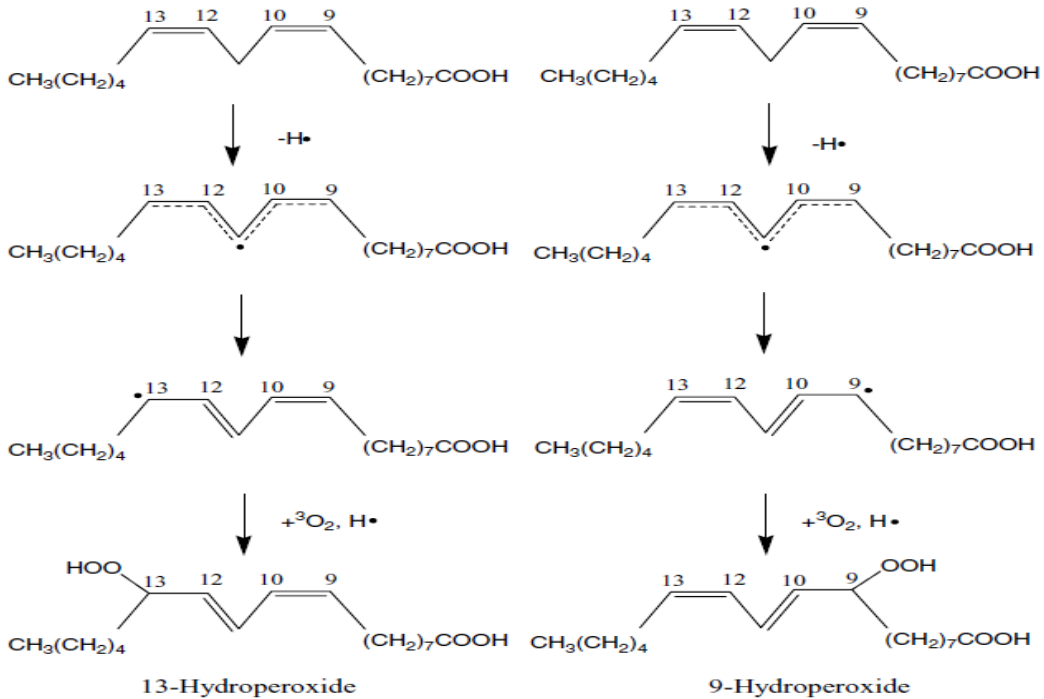
Lipid oksidasyonu yağların ve yağ içeren gıdaların depolanması ve imalatında lezzet, renk, doku, koku ve besin değeri gibi karakteristik özelliklerin bozulmasına sebep olmaktadır. Oksidasyon sonucu gıdalarda tat ve aroma bozulmasına lipid hidroperoksitleri, karbonil bileşikleri, hidrokarbonlar, ketonlar ve diğer bazı bileşiklerin oluşumu eşlik ederek gıdalarda ransiditeye neden olmakta ve bu da insan hücrelerine zarar verebilmektedir (Frankel, 1991).

1.7.1. Oksidatif Bozunma Ürünleri

Oksidasyon gıdalarda çoğunlukla kimyasal değişime neden olmaktadır. Yağlarda oluşan oksidatif bozunma ürünleri kademeli olarak meydana gelmektedir. Birinci kademede yağda çözülmüş halde bulunan oksijen yağdaki çift bağlara bağlanarak epoksitleri, oksitleri, peroksitleri ve hidroperoksitleri oluşturmaktadır. İkinci kademede oluşan bu bileşikler biraraya gelerek daha büyük yapıdaki molekülleri oluşturmaktadırlar. Polimerizasyon olarak adlandırılan bu olay sonucu viskoz yapıdaki dimerik ve trimerik polimerler oluşmaktadır. Son aşamada ise oluşan peroksitler ve hidroperoksitler parçalanarak aldehitler, ketonlar, organik asitler ve alkoller meydana gelmektedir.

1.7.1.1. Birincil Oksidatif Bozunma Ürünleri

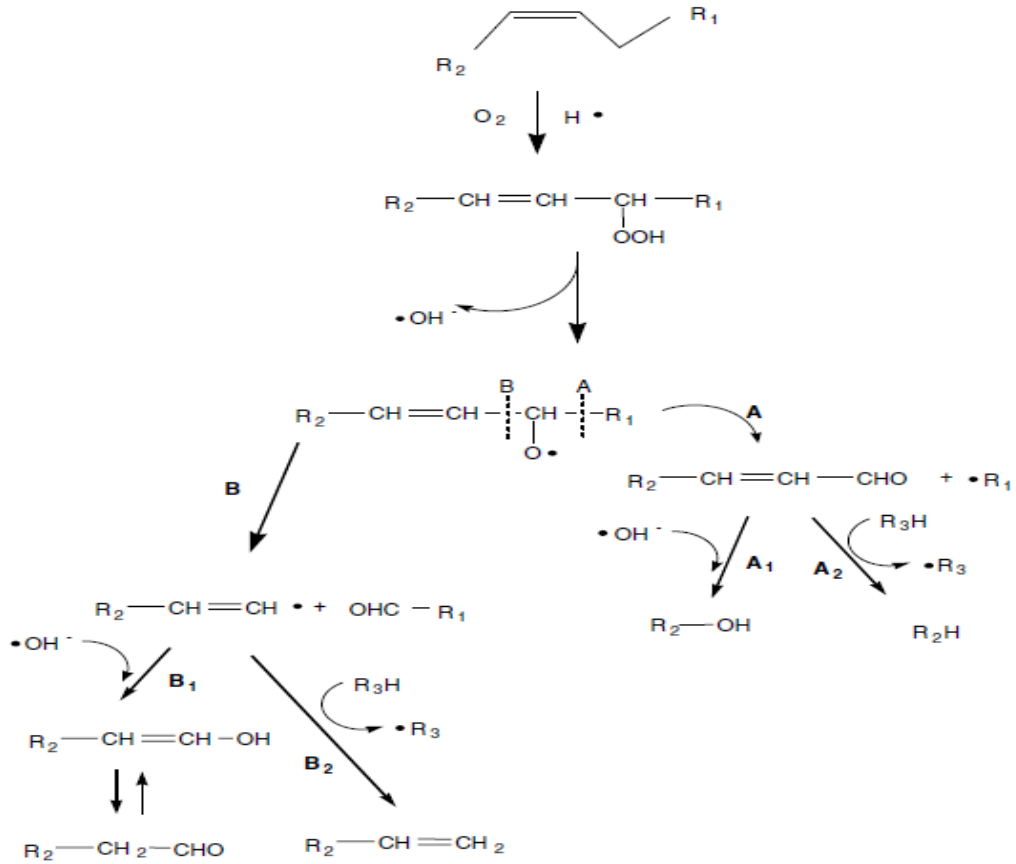
Yağların oksidasyonu sonucu meydana gelen birincil oksidasyon ürünleri hidroperoksitler, konjuge dienler ve trienlerdir. Yağların birincil bozunma ürünlerinden biri olan hidroperoksit oranı yağların oksidasyonu hakkında fikir vermektedir. Aşağıdaki şekilde linoleik asitin oksidasyonu sonucu oluşan birincil bozunma ürünlerinden olan lipit hidroperoksitleri görülmektedir (Choe ve Min, 2006).



Şekil12. Linoleik asitin oksidasyon basamakları

1.7.1.2. İkincil Oksidatif Bozunma Ürünleri

Birincil oksidasyon ürünlerinden lipid hidroperoksitleri metallerin yokluğunda ve oda sıcaklığında nispeten kararlıdır. Fakat metallerin varlığında ve yüksek sıcaklıklarda hızlı bir şekilde alkoksi radikallerine parçalanırlar. Bunun sonucunda aldehitler, ketonlar, esterler, alkooller ve kısa zincirli hidrokarbonlar oluşur. Meydana gelen bu ikincil oksidasyon ürünlerinin oluşum basamağı aşağıdaki şekilde verilmektedir.



Şekil 13. İkincil oksidasyon ürünlerinin oluşum mekanizmaları

1.7.2. Yağlarda Oksidatif Kararlılık Belirleme Yöntemleri

1.7.2.1. Peroksit Değeri

Peroksit değeri, yağlarda oksidatif bozunmaların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntemlerden biridir. Birincil oksidasyon ürünlerinden hidroperoksitler lipid oksidasyonunun erken safhasında oluşmaktadır. Bu yöntem

hidroperoksitlerin KI ile reaksiyonu sonucu açığa çıkan iyodun, tiyosülfatla titre edilmesi esasına dayanmaktadır. Bir miktar yağ kloroform ve asetik asitle çözüldükten sonra doymun KI çözeltisi ilave edilmektedir. Daha sonra nişasta indikatörü eşliğinde sodyum tiyosülfatla titre edilmektedir. Peroksit sayısı milieşdeğer g aktif oksijen/ kg yağ şeklinde ifade edilmektedir.

1.7.2.2. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Değeri

Gıdalarda ve diğer biyolojik sistemlerde oluşan lipid oksidasyonunu belirlemek amacıyla kullanılan yöntemlerden biridir. TBA reaktif maddeleri peroksitlerin aldehit ve ketonlara okside olduğu otooksidasyonun ikinci aşamasında oluşmaktadır. Lipid oksidasyon derecesinin belirlenmesinde TBA değeri mili eşdeğer gram malondialdehit (MDA)/ kg yağ olarak ifade edilmektedir. Malondialdehit ($\text{CH}_2(\text{CHO})_2$) çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunda küçük bir üründür ve TBA ile reaksiyona girerek pembe renkli kompleks oluşturmaktadır. Oluşan bu kompleks de 532 nm' de maksimum absorbands vermektedir.

1.7.2.3. Konjuge Dien ve Trienlerin Belirlenmesi

Konjuge dienler lipid peroksidasyonunun ilk aşamasında oluşmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan ürünlerin artmasıyla birlikte ultraviyole (UV) bölgedeki absorbandsları da artmaktadır. Lipidler konjuge yapıda bulunabilmektedirler. Konjuge yapıda olup iki çift bağ içerenlere dien, üç çift bağ içerenlere trien denmektedir. Çoklu doymamış yağ asitlerince zengin lipidlerde oksidasyon esnasında konjuge yapılar oluşmaktadır. Oluşan konjuge dienler 234 nm' de trienler ise 268 nm' de maksimum absorbands vermektedirler.

1.7.2.4. Para-Anisidin Değerinin Belirlenmesi

Para-anisidin değeri sekonder oksidasyon ürünlerini belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Bu analizde p-anisidin konjuge dienaller veya 2-alkenallerle reaksiyona girerek renk oluşturmaktadır. Konjuge dienallerin artması ile

birlikte renk yoğunluğu da artmaktadır. Daha sonra örneklere ait 350 nm' deki spektrofotometrik ölçümler kullanılarak para-anisidin değerleri hesaplanmaktadır.

1.7.2.5. Serbest Yağ Asitleri Tayini

Serbest yağ asitleri lipidlerin hidrolizi sonucu oluşmaktadır. Oluşan bu yağ asitleri kokucu bileşiklere dönüştüğü için oluşumları istenmemektedir. Bu analizde numune öncelikli olarak dietileter ve etanol karışımında çözünmektedir. Karışım indikatör eşliğinde etanol kullanılarak hazırlanmış KOH ile titre edilmekte ve sonuçlar yüzde serbest yağ asitliği olarak ifade edilmektedir.

1.8. Çalışılan Bitkiler ve Özellikleri

Yapılan çalışmada kullanılan sarısabır, ısırgan, sığır kuyruğu, ıhlamur, çoban çantası, ekinezya, karahindiba, kayın, gülhatmi, ökse otu, oğul otu, ayva yaprağı, zeytin yaprağı, ebegümece, funda, papatya, sinirli ot, yeşil çay, aslan pençesi, biberiye, ceviz yaprağı ve sarı kantaron bitkileri Trabzon' da bulunan bir aktardan temin edilmiştir.

1.8.1. Sarısabır

Asphodelaceae familyasından Aloe cinsini oluşturan ve anavatanı Afrika olan bitki türlerinin ortak adıdır. Yaklaşık 300 türü olup bunlardan 3-4 türünün şifalı özelliği bulunmaktadır. Bunların içinde en şifalı olarak gösterilen tür Aloe Vera' dır.



Şekil 14. Sarısabır (*Asphodelaceae*)

Bu bitkinin yapraklarından çıkan jelin şifa özelliği bulunmaktadır. Jel oksijenle temas ettikten sonra bir çeşit oksitlenme yapmakta ve yaklaşık 5 saat içinde şifa özellikleri ortadan kalkmaktadır. Aloe vera, yangı giderici (antiinflamatuvar) özellikteki kimyasallar olan sterollerin 4 farklı tipini içerir: kolesterol, lupeol, b-sitosterol ve kampesterol. Bunlardan lupeol, mikrop gelişimini önleyici (antiseptik) ve ağrı dindirici (analjezik) özellik gösterirken, b-sitosterol da iyi huylu prostat hiperplazisinde (hücrelerin aşırı büyümesinde) tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır.

1.8.2. Isırgan

Isırgan (*Urtica*), Isırganıgiller (*Urticaceae*) familyasının *Urtica* cinsinden Mayıs-Ağustos ayları arasında çiçek açan, bir yıllık veya çok yıllık olan otsu bitki türlerinin ortak adıdır. Yaprakları saplı, oval şekilli ve dişli kenarlı olup üst kısmı koyu yeşil renkli, parlak ve yakıcı tüylerle kaplıdır. Isırgan bitkisinin topraküstü kısımları (herba) taşıdığı flavonoid bileşikler, mineral maddeler ve lutein benzeri karotenoid bileşikler nedeniyle diüretik etki göstermektedirler. Diüretik etkisinden dolayı zayıflama çaylarının, idrar yollarını yıkamaya ve romatizmal ödemlerin boşaltılmasına yönelik çayların ve bitkisel ilaçların bileşimine girmektedir.



Şekil 15. Isırgan otu (*Urtica*)

1.8.3. Sığır Kuyruğu

Sığır Kuyruğu, sıraca otugiller (*Scrophulariaceae*) familyasından *Verbascum* cinsini oluşturan iki yıllık bitki türlerine verilen addır. Haziran-Ağustos aylarında parlak sarı renkli çiçekler açan 20 ile 150 cm boylarında iki yıllık otsu bir bitkidir. Gövdeleri dik

bazen dallanmış ve yünümsü tüylerle kaplıdır. Yaprakları gövdenin alt kısımlarında rozet halinde dizilmiş olup, yünümsü tüylüdür. Gövdedeki yapraklar ise sapsızdır. Çiçekler gövdenin ucunda sık veya seyrek, az veya çok uzun bir salkım durumunda toplanmışlardır. Çiçekleri müsilaj, uçucu yağ ve glikozitler taşır. Balgam söktürücü ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanılır. Bazı sığır kuyruğu türlerinin tohumları saponin taşıdıklarından dolayı balıklar için zehirli olup, balık avlamada kullanılır. Bitkinin yaprakları da terletici, balgam söktürücü, idrar arttırıcı ve kabız edici olarak kullanılır.



Şekil 16. Sığır kuyruğu (*Scrophulariaceae*)

1.8.4. İhlamur

İhlamur, ıhlamurgiller (Tiliaceae) familyasından *Tilia* cinsini oluşturan ağaç türlerine verilen addır. Boyları 20-30 m' ye kadar ulaşabilir. Büyüklüğü 5-10 cm arasında değişen yaprakları genellikle yürek şeklinde ve çarpık, kenarları dişli ve uzun saplıdır. Sarkık çiçek demetleri sarımsı bir renge ve karakteristik bir kokuya sahiptir. Çok geç açan bu çiçekler Haziran-Temmuz aylarında kurutularak çay olarak içilir. Güzel kokulu çiçeklerinden dolayı ve bir gölge ağacı olarak yetiştirilir. İhlamur çiçeği yatıştırıcı, idrar verici ve balgam söktürücü olarak çay halinde kullanılır. Ayrıca arıcılıkta da önemli bir nektar kaynağıdır.



Şekil 17. İhlamur (*Tilia*)

1.8.5. Çobançantası

Çobançantası (*Capsella bursa-pastoris*), turpgiller (*Brassicaceae*) familyasından tarım alanları ve çorak arazilerde yaşayan bir yıllık, dik gövdesi yıdızsı tüylerle kaplı olan otsu bir bitki türüdür. Boyu 40–50 cm olan çobançantası Ocak-Aralık aylarında çiçek açar. Kuraklığa ve soğuğa dayanıklı olmasıyla bilinir. Kalp şeklindeki meyve kapsülleri, çobançantasını andırdığı için bu şekilde adlandırılmıştır ve dünyanın birçok yerinde bu isimle bilinir.



Şekil 18. Çobançantası (*Capsella bursa-pastoris*)

1.8.6. Ekinezya

Ekinezya (*Echinacea*), papatyagiller (*Asteraceae*) familyasına ait bir bitki cinsidir. Koni çiçeği veya mor kozalak çiçeği olarak da bilinir. Anayurdu ABD' nin Kuzey Dakota eyaleti olan ekinezya bitkisinin sağlığınıza yararları, Kiowa Kızılderilileri tarafından yüzyıllar önce saptanmıştır. Ekinezya, 40-50 cm boylarında, tüylü ve kaba görünümlü otsu bir bitkidir.



Şekil19. Ekinezya (*Echinacea*)

İyi bir antimikrobiyal, antibakteriyel ve antiviraldir. Sağlıkta ve hastalık halinde bedenin bağışıklık sistemini güçlendirir. Nezle, grip, öksürük ile üst solunum yolu enfeksiyonlarının önlenmesinde etkilidir. Bedeni güçlendirici tonik etkisi olup larenjit ve bademcik nedeniyle oluşan boğaz ağrılarının giderilmesine yardımcı olur.

1.8.7. Karahindiba

Karahindiba (*Taraxacum officinale*), papatyagiller (Asteraceae) familyasından yaygın bir bitki türüdür. Çiçekleri sarı, yaprakları yeşil olsa da bitkinin adına "karahindiba" denilmiştir. Karahindiba Nisan ve Mayıs aylarında tüm tarla kıyılarında, çayırılık alanlarla ve yol kenarlarında yetişen çok yıllık sarı çiçekli otsu bir bitkidir. Tüm Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya olmak üzere dünyanın hemen hemen her yerinde görülen çok çeşitli bir türdür. Besleyici değeri oldukça yüksek olan karahindiba yaklaşık % 5 oranında potasyum içermesinden dolayı en iyi doğal potasyum kaynaklarından biri olarak bilinir. A vitamini, C vitamini, nikotinik asit, kalsiyum ve türlü mineraller yönünden de zengindir.



Şekil 20. Karahindiba (*Taraxacum officinale*)

1.8.8. Kayın

Kayın (*Fagus*), kayıngiller (Fagaceae) familyasının *Fagus* cinsinden değerli orman ağaçlarına verilen addır. Nemli topraklarda yetişen bir ağaç türü olup meyveleri küçük ve çiçekleri püskül şeklindedir. Türkiye’de Erciyes ve Ağrı dağı eteklerinde Marmara, Karadeniz ve Doğu Anadolu bölgelerinin ormanlarında yabani olarak yetişmektedir. Kayın ağacının yaprakları genellikle Nisan ve Haziran aylarında toplanarak kurutulur ve birçok

hastalığa bitkisel çözüm olarak kullanılır. Kayın ağacının yaprakları romatizma ağrılarına ve cilt hastalıklarına iyi gelmektedir. Ayrıca idrar sökücü olarak kullanılan bu bitki saç dökülmesini de engel olmaktadır.



Şekil 21. Kayın (*Fagus*)

1.8.9. Gülhatmi

Gülhatmi (*Alcea rosea*), ebegümeçigiller (*Malvaceae*) familyasından çok yıllık otsu, çiçekli bir bitkidir. Beyaz, pembe, mor, sarı, kırmızı çiçekleri olan gülhatminin boyu 2-2,5 metreye kadar uzayabilir. Killi, besin maddelerince zengin ve iyi gübrenmiş toprakları seven gülhatmi ılıman iklimlerde haziran-ağustos sonuna kadar çiçekli kalabilmektedir. Güzel görüntüsüyle dikkat çeken gülhatmi aynı zamanda son derece faydalı bir şifa bitkisidir.



Şekil 22. Gülhatmi (*Alcea rosea*)

Gülhatmi kökleri böbrek iltihabı başta olmak üzere vücudun herhangi bir bölgesinde oluşan iltihabı yok edici özelliğe sahiptir. Soğuk algınlığı, bronşit ve öksürüğe karşı faydalı olan gülhatmi diş eti hastalıklarını da önleyici etki göstermektedir.

1.8.10. Ökse Otu

Ökse otu (*Viscum album*), Santalaceae familyasından Avrupa, batı ve güney Asya'ya özgü asalak bir bitki türüdür. Halk arasında gevele, güvelek, gövelek, purç, çekem olarak da bilinmektedir. Her mevsimde yapraklı olan ve ağaçlar üzerinde yaşayan bitki özellikle elma ağacının dalları üzerinde yaşamaktadır. Çiçekleri tek eşeyli, meyveleri yapışkan, sulu ve yumuşaktır. İnce kıyılarak gölgede kurutulan yapraklar ve küçük saplar, Ekim-Aralık ve Mart-Nisan ayları arasında toplanmaktadır. Yaprakları ve sap kısmı zehirli olmayan ökse otu ağız yoluyla tüketilmesi durumunda insanları zehirleyebilmektedir. Sabah ve akşam olmak üzere tüketilen ökse otu çayı hormonal denge konusunda vücuda oldukça fayda sağlamaktadır. Atardamar sertliği probleminde iyi gelen bitki kalp krizi rahatlıklarına karşı da etkili olabilmektedir.



Şekil 23. Ökse otu (*Viscum album*)

1.8.11. Oğul Otu

Oğul otu (*Melissa officinalis*), merkezi Avrupa ve Akdeniz bölgelerinde yetişen, nane türü bir bitkidir. 70-150 cm'ye kadar uzayabilen bitkinin yaprakları hafif limon aroması vermektedir. Stresi azaltmakta oldukça etkili olan oğul otu sinirleri yatıştırarak

migren, kulak çınlaması, baş dönmesi ve uykusuzluk gibi sorunları engellemektedir. Ayrıca insanı rahatlatarak depresyon, huzursuzluk ve iç sıkıntısını gidermektedir.



Şekil 24. Oğul otu (*Melissa officinalis*)

1.8.12. Ayva Yaprağı

Ayva kış meyveleri arasında bulunan ve Türkiye’de bolca yetişen bir meyvedir. Ayvanın ve ayva çekirdeğinin yanısıra ayva yapraklarının da birçok rahatsızlığa iyi geldiği bilinmektedir. Sindirim sisteminde oluşabilecek zararlı mikroplara karşı koruyucu etki gösteren ayva yaprakları aynı zamanda kalp rahatsızlıklarına, hazımsızlığa, uykusuzluğa ve ülsere iyi gelmektedir.



Şekil 25. Ayva yaprağı

1.8.13. Zeytin Yaprağı

Akdeniz bölgesine özgü bir ağaç olan zeytin ağacı yıl boyu yapraklarını muhafaza etmektedir. Ortalama 8-15 m arasında uzayan ağaç genellikle kısadır. Ağacın meyvesi olan

zeytin binlerce yıldır gıda olarak tüketilmekte, yaprakları ise yaraların tedavisinde ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Genel olarak antibiyotik ve antibakteriyel olarak kullanılan zeytin yaprağı kan basıncı, kan şekeri ve kötü huylu kolestrolü düşürmektedir.



Şekil 26. Zeytin yaprağı

1.8.14. Ebegümece

Küçük yapraklı ebegümece (*Malva Vulgaris*) çit, yol ve eski duvar kıyılarında, harabeliklerde yetişmekte olup insanların yaşadıkları yerlere oldukça yakındırlar. Büyük yapraklı ebegümece (*Malva Grandfolia*) ve öteki değişik cinsleri genellikle çiçek ve sebze bahçelerinde yetişir. Anadolu'da 8 Malva türü yetişmekte olup, bunların çiçek ve yaprakları bir ayırım yapılmaksızın "Ebegümece" olarak adlandırılmaktadır. Ebegümece çayı özellikle mukoza iltihaplarında, gastrit, mesane iltihabı, mide ve bağırsak mukoza iltihabında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca kaşınan ve yanan deri alerjilerinde yapılan ebegümece çayı yıkamaları çok rahatlatıcı etki göstermektedir.



Şekil 27. Ebegümece (*Malva Vulgaris*)

1.8.15. Funda

Funda, fundagiller (*Ericaceae*) familyasından *Erica* cinsinden 700'den fazla türü barındıran çiçekli bitkilerin ortak adıdır. Birçok türü 0,2-1,5 m boyutları arasında çalı formunda olan bir bitkidir. *Erica arborea* ve *Erica scoparia* türleri ağaç olarak adlandırılır ve 6-7 m boyutlarındadır. Her mevsim yeşil yapraklı olan funda aynı zamanda bahçe süslemesinde tercih edilmektedir. Bitki her ne kadar güzel çiçekleri ile dekoratif olarak kullanılsa da yüzyıllardır yaşlılığın etkilerinin azaltılmasından cildi güzelleştirmeye kadar pek çok amaçla kullanılmaktadır. Aynı zamanda prostat sorunlarına, ishale, karın ağrısına ve öksürüğe iyi gelmektedir.



Şekil 28. Funda (*Ericaceae*)

1.8.16. Papatya

Papatya, papatyagiller (*Asteraceae*) familyasında sınıflandırılan *Anthemis*, *Matricaria*, *Bellis*, *Leucanthemum* ve *Tripleurospermum* gibi farklı cinslerden bitki türlerine verilen ortak addır.



Şekil 29. Papatya (*Asteraceae*)

Papatya çiçeği gaz birikiminde, ishalde, deri döküntülerinde, mide rahatsızlıklarında ve balgamlanmalarda tedavi edici olarak kullanılmaktadır. Papatya aynı zamanda terletici, sakinleştirici, kramp çözücü etkilere sahip olmasının yanı sıra her türlü iltihaplanmada iltihap kurutucu olarak kullanılmaktadır.

1.8.17. Sinirli Ot

Sinirli ot çeşitlerinden dar yapraklı sinirli ot (*Plantago Lanceolata*) ve geniş yapraklı sinirli ot (*Plantago Major*, *Plantago asiatica*) aynı etkilere sahiptir ve aynı biçimde kullanılmaktadır. Her iki çeşit de kır yollarında, çimenli tarla kıyılarında, nemli arazilerde, bahçe ve parkların çimleri arasında yetişmektedir. Antibiyotik etkisi bilimsel olarak kanıtlanmış olan bitki özellikle solunum organları hastalıklarında kullanılmaktadır.



Şekil 30. Sinirli ot (*Plantago Lanceolata*)

1.8.18. Yeşil Çay

Yeşil çay, *Camellia sinensis* yapraklarından elde edilmektedir. Aynı bitkiden elde edilen siyah çayda yapraklar yavaşça kurutulurken yeşil çayda ise yapraklar toplanır toplanmaz kavrulup hızlıca kurutulmaktadır. Siyah çay kurutulurken oksijenle tepkimeye girerken yeşil çayın ise tepkimeye girmesine izin verilmemektedir. Japon yeşil çayları ve Çin yeşil çayları gibi çeşitleri mevcuttur. Yeşil çaydaki kafein oranı siyah çaydakine oranla daha düşüktür ve yeşil çaydaki antioksidan miktarı daha fazladır. Kanser riskini ve kolesterolü düşürürken tansiyonu ayarlar. Grip virüsünü öldürür, stresi azaltır ve diş çürümesine engel olur.



Şekil 31. Yeşil çay (*Camellia sinensis*)

1.8.19. Aslanpençesi

Arslanpençesi (*Alchemilla vulgaris/arvensis*) gülgiller (Rosaceae) familyasından bir bitki cinsidir. Afrika, Asya ve Avrupa'nın özellikle dağlık bölgelerde yaygın olarak bulunan bir bitkidir.



Şekil 32. Aslan pençesi (*Alchemilla vulgaris/arvensis*)

Çiçekleri küçük ve gösterişsiz olup büyüklüğü ot ile çalı boyutları arasında olmaktadır. Özellikle kadın hastalıklarına karşı kullanılan aslanpençesi kas ve organ yorgunlukları ve kansızlığa karşı tedavi edici etki göstermektedir.

1.8.20. Biberiye

Biberiye (*Rosmarinus officinalis*), ballıbabagiller (Lamiaceae) familyasından iğneye benzeyen ince yapraklı ve daima yeşil kalan bir bitki türüdür. Akdeniz çevresinde

yaygın olarak yetişen bitki mor çiçekli ve çalı görünümündedir. Yapraklarından yağ elde edilebilen bitki aynı zamanda kaynatılarak esans ve kolonya yapımında da kullanılabilir. Damar tıkanıklığının önlenmesi açısından faydalı olan bitki mide ve bağırsak uyarıcısı olarak da kullanılabilir.



Şekil 33. Biberiye (*Rosmarinus officinalis*)

1.8.21. Ceviz Yapağı

Ceviz Ağacı (*Junglans Regia*) 25-30 m kadar yüksekliğe ulaşabilen, kışın yapraklarını döken gösterişli bir ağaçtır. Drog elde etmek için Haziran ve Temmuz aylarında toplanan ceviz yaprakları havadar ve gölgeli bir yerde kurutulduktan sonra ince kıyılarak hava almayan kaplarda muhafaza edilir. Ceviz ağacının yaprakları tanen, C vitamini ve flavonlar içermektedir. Ceviz yaprakları sindirim bozukluklarında, kabızlıkta, iştahsızlıklarda ve kan temizliğinde etkilidir. Ayrıca kan şekerini düşürücü ve kuvvet verici etkiler de göstermektedir.



Şekil 34. Ceviz yapağı (*Junglans Regia*)

1.8.22. Sarı Kantaron

Sarı kantaron (*Hypericum perforatum*), sarı kantarongiller (*Hypericaceae*) familyasına ait bir bitki türüdür. Halk arasında kan otu, kılıç otu, yara otu, mayasıl otu ve binbir delik otu olarak da bilinmektedir. Temmuz'dan Eylül'e kadar çiçeklenen sarı kantaron, Asya'dan Amerika'ya kadar dünyanın pek çok ülkesinde doğada kendiliğinden yetişmektedir. Korku, endişe, kaygı, umutsuzluk, umursamazlık, çaresizlik duygularının giderilmesinde etkili olan bitki anti-stres ve anti-depresan özelliğe sahiptir. Yara ve yanıkların iyileşme sürecini hızlandırırken kronik yorgunluk sedromu ve uykusuzluğun önlenmesinde önemli rol oynar.



Şekil 35. Sarı kantaron (*Hypericum perforatum*)

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

Deneyleerde kullanılan madde ve malzemeler KTÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü ve Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi laboratuvarlarından temin edildi.

2.1. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlara ve satın alındıkları firmalara ait bilgiler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3. Denemelerde kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Satın Alındığı Firma/Markası
Terazi	Mettler Toledo
Vortex Karıştırıcı	Ika®Vortex Geinus 3
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph/MR Hei-Standard
Mikropipet	Gilson
Mikrofiltre	RC 0,45 µm
Kurutma Makinesi	Sinbo
UV Spektrofotometre	Unicam UV 2
Etüv	Elektroheliös
Blender (Öğütücü)	Sinbo SHB 3048
Derin Dondurucu	Vestel
Santrifüj	SED, Merlin 506-000
Rotary Evaporatör (Döner Vakum Buharlaştırıcısı)	Bibby R100
Liyofilizatör	Teknosem
Su Banyosu	Bibby

2.2. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Deneyleerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmaların ticari adları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4. Denemelerde kullanılan kimyasallar ve satın alındıkları firmalar

Madde Adı	Satın Alındığı Firma/Marka
Asetik Asit	Carlo Erba
Kloroform	Merck
Dietil Eter	Merck
Etanol	Sigma
Etil Asetat	Carlo Erba
KOH	Merck
Fenol Ftalein	Sigma
2-Tiyobarbitürik Asit	Sigma
Nişasta	Merck
KI	Merck
BHT	Merck
Trolox	Aldrich
DPPH	Aldrich
Fe ₃ Cl ₃ .3H ₂ O	Sigma
Na ₂ CO ₃	Merck
Folin-Ciocalteu Reaktifi	Sigma
NaOH	Merck
HCl	Merck
TPTZ	Fluka
Gallik Asit	Sigma
Kateşin	Sigma
Askorbik Asit	Sigma

Tablo 5. Denemelerde kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çözelti	Hazırlanışı
0.2 N Folin-Ciocalteu Reaktifi	2N' lik hazır satın alınan çözeltilerden saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek hazırlanır.
%7,5' lik Na ₂ CO ₃ çözeltisi	9 g Na ₂ CO ₃ 120 mL saf suda çözülerek hazırlanır.
Stok Kateşin	10 mg kateşin 10 mL saf suda çözülür (1mg/mL).
Stok Gallik asit	10 mg gallik asit 10 mL metanolde çözülür. (1mg/mL).
Stok Troloks	6,25 mg trolox 25 mL metanolde çözülür. (1 mg/mL).
Stok Askorbik asit (C vitamini)	10 mg askorbik asit 10 mL saf suda çözülür (1 mg/mL).
150 mL 300 mM pH:3,6 Asetat tamponu	2,586 mL derişik asetik asit alınıp 100 mL saf suda çözülür, 0,1 M NaOH ile pH=3,6' ya ayarlanır ve son hacim saf su ile 150 mL'ye tamamlanır.
50 µM DPPH çözeltisi	4,929 mg DPPH, 250 mL metanolde çözülür.
40 mM HCl	85,8 µL derişik % 37' lik HCl, 25 mL saf suda çözülür.
0,1 M NaOH (A)	0,1 g NaOH 25 mL saf suda çözülür. (0,1 M).
10 mM TPTZ (B)	0,0468 g TPTZ, 40 mM 25 mL HCl'de çözülür.
15 mL 20 mM FeCl ₃ .6H ₂ O (C)	0,0811 g FeCl ₃ .6H ₂ O 5,5 mL saf suda çözülerek üzerine 10,5 mL etanol eklenir.
FRAP Reaktifi	A, B ve C çözeltileri sırasıyla; 10:1:1 oranında karıştırılır. (FRAP reaktifi taze hazırlanmalı ve kullanımdan önce 37 °C' ye ısıtılmalıdır.)
% 1' lik Nişasta çözeltisi	1 g nişasta 100 mL saf suda çözülür.
Doygun KI çözeltisi	42 g KI 30 mL saf suda çözülür.
0,002 N Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	49,6 mg Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O 100 mL saf suda çözülür.
%1' lik fenolftalein çözeltisi	0,1 g fenolftalein 10 mL etanolde çözülür.
0,1 N KOH	1,12 g KOH alınır 200 mL etanolde çözülür.
TBA çözeltisi	0,67 g 2-TBA 100 mL saf suda çözülür ve üzerine 100 mL asetik asit ilave edilir.

Tablo 6. Kullanılan numunelerin çözücileri ve kodları

Bitki adı	Çözücüsü	Numune kodu	Çözücüsü	Numune kodu
Sarısabır	su	UKS1	su ile doymuş etil asetat	UKE1
Isırgan	su	UKS2	su ile doymuş etil asetat	UKE2
Sığır kuyruğu	su	UKS3	su ile doymuş etil asetat	UKE3
Ihlamur	su	UKS4	su ile doymuş etil asetat	UKE4
Çoban çantası	su	UKS5	su ile doymuş etil asetat	UKE5
Ekinezya	su	UKS6	su ile doymuş etil asetat	UKE6
Karahindiba	su	UKS7	su ile doymuş etil asetat	UKE7
Kayın	su	UKS8	su ile doymuş etil asetat	UKE8
Gülhatmi	su	UKS9	su ile doymuş etil asetat	UKE9
Ökse otu	su	UKS10	su ile doymuş etil asetat	UKE10
Oğul otu	su	UKS11	su ile doymuş etil asetat	UKE11
Ayva yaprağı	su	UKS12	su ile doymuş etil asetat	UKE12
Zeytin yaprağı	su	UKS13	su ile doymuş etil asetat	UKE13
Ebegümeçi	su	UKS14	su ile doymuş etil asetat	UKE14
Funda	su	UKS15	su ile doymuş etil asetat	UKE15
Papatya	su	UKS16	su ile doymuş etil asetat	UKE16
Sinirli ot	su	UKS17	su ile doymuş etil asetat	UKE17
Yeşil çay	su	UKS18	su ile doymuş etil asetat	UKE18
Aslan pençesi	su	UKS19	su ile doymuş etil asetat	UKE19
Biberiye	su	UKS20	su ile doymuş etil asetat	UKE20
Ceviz yaprağı	su	UKS21	su ile doymuş etil asetat	UKE21
Sarı kantaron	su	UKS22	su ile doymuş etil asetat	UKE22

2.3. Bitkilerin Temini ve Ekstraktların Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan bitkiler Ocak 2015'de Trabzon'da bulunan bir aktardan temin edilmiştir.

Parçalama işlemi: Bütün bitkiler ayrı ayrı laboratuvar tipi blender ile parçalanarak toz haline getirildi ve uygulanacak analiz yöntemine göre kodlandı.

Kurutma işlemi: Parçalanıp toz haline getirilen bitkiler etüvde 40 °C de iki gün boyunca kurutuldu.

Ekstraksiyon işlemi: Ekstraksiyonda su ve su ile doyurulmuş etil asetat olmak üzere iki farklı çözücü kullanıldı. Bu işlem geri soğutucu altında karıştırıcılı ısıtıcı sistem çalıştırılarak yapıldı.

Çözücü olarak su kullanıldığında karıştırıcılı ısıtıcı sistem 95 °C' ye ayarlandı. Daha önce hazırlanmış olduğumuz kuru toz numuneden 5 mg tartılarak 95 °C' ye ısıtılmış 50 mL su üzerine ilave edildi. Sabit devirde çevrilen 95 °C ye ayarlı ısıtıcıda iki saat süreyle ekstraksiyon yapıldı.

Çözücü olarak su ile doyurulmuş etil asetat kullanıldığında ise karıştırıcılı ısıtıcı sistem 70 °C' ye ayarlandı. Daha önce hazırlanmış olduğumuz kuru toz numuneden 5 mg tartılarak 70 °C' ye ısıtılmış 50 mL su ile doyurulmuş etil asetat üzerine ilave edildi. Sabit devirde çevrilen 70 °C' ye ayarlı ısıtıcıda iki saat süreyle ekstraksiyon yapıldı. Her iki çözücü ile elde edilen ekstraktlar süzgeç kağıdından süzüldü. Süzüntü plastik tüplere eşit miktarlarda aktararak 6000 rpm' de 15 dk santrifüjlendi. Plastik pastör pipetleri kullanılarak tüplerdeki süpernatant (üst kısımlar) başka bir cam tüpe aktarıldı. Elde edilen ekstraktı berraklaştırmak adına çözeltiler 0.45 µM gözenekli şırınga filtreden geçirildi. Berrak hale getirilen çözeltiler etiketlendi ve daha sonra çözücüsü uçurulmak üzere saklandı.

Çözücü uçurma işlemleri: Su ile doyurulmuş etil asetatlı numunelerin etil asetat kısmı evaporatör yardımıyla uçurulduktan sonra geri kalan sulu kısım liyofilizasyon işlemiyle uzaklaştırıldı. Sulu çözeltilerin çözücüleri direk olarak liyofilizatör kullanılarak uzaklaştırıldı.

Denemelerde kullanılacak olan numuneler çözücü uçurma işleminden sonra istenilen konsantrasyonlara getirildi.

2.4. Antioksidan Aktiviteler

2.4.1. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesi

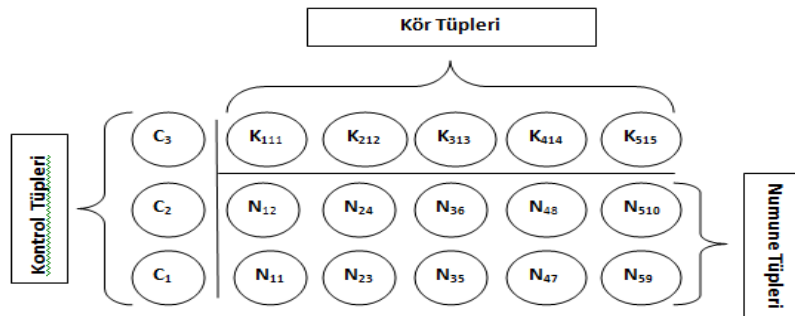
Bölüm 1.5.1. de ayrıntılı olarak verilen deneysel yöntem izlenerek kararlı bir radikal olan DPPH' in numune varlığındaki davranışları incelendi. Çalışılan numune konsantrasyonları ön denemeler ile belirlendi. 517 nm' de ölçülen absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Grafikten yararlanılarak DPPH miktarını %50 azaltan numune konsantrasyonu (SC_{50}) belirlendi. Standart olarak C vitamini ve Trolox kullanılarak numunelerin antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldı. SC_{50} değerinin düşük olması aktivitenin yüksek olduğunu göstermektedir.

2.4.1.1. Ön Denemeler

DPPH aktivitesini kontrol etmek için hazırlanan 50 μ M DPPH çözeltisi ile denemeler yapıldı. Konsantrasyonları belli olan numunelerden ve DPPH çözeltisinden eşit miktarda alınarak renk değişimi gözlemlendi. Rengin sarı olması aktivitenin yüksek olduğunu gösterirken rengin mor olması aktivitenin düşük olduğunu gösterir. Renk mor ile sarı arasında olup sarıya daha yakın olacak şekilde ayarlandı. Örneğin; numune konsantrasyonu 10 mg/mL olan UKS11 numunesi için 50 μ M DPPH (500 μ L) ve UKS11 numunesi (500 μ L) bir tüpte karıştırıldığında rengin sarıya çok yakın olduğu gözlemlendi. Bunun üzerine numune 1/100 oranında seyreltildi ve uygun konsantrasyonun 0,01 mg/mL olduğu tespit edildi.

İşlem basamakları:

- 50 μ M DPPH çözeltisi metanolde hazırlandı. (Taze ve günlük hazırlanır.)



Şekil 36. DPPH testi için hazırlanan tüpler

- Numunelerin konsantrasyonları aktivite gösterecek şekilde ayarlandı.
- Kontrol tüplerine (C) ve numune tüplerine (N) 750 µL numune konuldu.
- Numune körü tüplerine (K) numune yerine 750 µL numune çözücüsü ilave edildi.
- Numune pipetlemesi bitince 20 s arayla önce kontrol tüplerine ardından numune tüplerine 750 µL DPPH çözeltisi ve en son numune körlerine 750 µL DPPH çözücüsü (metanol) pipetlendi.
- 50 dakika bekletildikten sonra 20 s arayla 517 nm’ de absorbans okundu.
- Sonuçlar grafiğe geçirilip SC₅₀ değerleri hesaplandı.

2.4.1.2. SC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Radikal miktarını yarıya düşüren numune konsantrasyonu SC₅₀ şeklinde ifade edilmektedir. SC₅₀ değerinin belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda çalışmak gerekmektedir. Bu nedenle numunelerin yeterli miktarda farklı konsantrasyonu hazırlanıp absorbans ölçümleri yapıldı ve absorbanslar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi. Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı (SC₅₀ değeri) belirlendi.

2.4.2. FRAP Yöntemi

Bu yöntem için öncelikli olarak ekstraktların ve standartların belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Standart olarak Askorbik asit (C vitamini) ve Troloks seçildi. Sonra C vitamini ve Troloks seri seyreltme yapılarak 5 farklı konsantrasyon (1000- 500- 250-125-62.5 µM) elde edildi.

K: Numune körü, FRAP reaktifi yerine 1,5 mL FRAP çözücüsü (su:metanol (2:3)) kullanıldı.

R: Reaktif körü, numune yerine 50 µL numune çözücüsü kullanıldı.

C: C vitamini (Askorbik asit), 1000, 500, 250,125,62.5 µM. Stok Askorbik asit çöz. için 176 mg/L ya da 17.6 mg/100 mL (0.0176 g/100 mL) 1000 µM’a eşdeğer sudaki çözeltisi.

T: Trolox, 1000,500,250,125,62.5 µM, 0.005 g / 20 mL (=25 µg/mL).

Abs595nm [Askorbik asit]’e karşı grafiğe geçildi. FRAP değeri aşağıdaki gibi hesaplandı:

FRAP değeri = (Numune absorbansının karşılık geldiği [Askorbik asit] x 2) μ M

Sonuçlar aynı zamanda numunelerin gösterdiği aktiviteye eşit aktivite gösteren Trolox konsantrasyonu (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite, TEAC) olarak ifade edildi.

Tablo 7. FRAP testi için hazırlanan tüpler

Test çözeltileri	Kalibrasyon Standartları					Referans Standart	Numuneler					
	C1	C2	C3	C4	C5		T	1	2	3	4	5
Reaktif Körü	C1R	C2R	C3R	C4R	C5R	TR	1R	2R	3R	4R	5R	6R
Numune Körü	C1K	C2K	C3K	C4K	C5K	TK	1K	2K	3K	4K	5K	6K
Test 3	C13	C23	C33	C43	C53	T3	13	23	33	43	53	63
Test 2	C12	C22	C32	C42	C52	T2	12	22	32	42	52	62
Test 1	C11	C21	C31	C41	C51	T1	11	21	31	41	51	61

İşlem basamakları:

- FRAP reaktifi taze hazırlandı ve kullanılmaya başlayıncaya kadar düşük hızda manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı.
- Test çözeltileri hazırlandı.
- Spektrofotometre çalıştırıldı ve dalga boyu 595 nm` ye ayarlandı.
- Test 1, Test 2 ve Test 3 ve Numune körü sıralarına 50 μ L numune ve Reaktif körü sırasına 50 μ L numune çözücüsü pipetlendi (su ve su ile doyurulmuş etil asetat).
- Test 1, Test 2, Test 3 ve Reaktif körü sıralarına 1,5 mL FRAP reaktifi, numune körü sırasına ise 1,5 mL FRAP çözücüsü (su:metanol, 2:3) 20 s arayla pipetlendi ve vortekslendi.
- İlk pipetlenen tüpten başlanarak 20. dk da dolan tüp alınıp plastik küvete aktarıldı ve absorbansı 595 nm` ye ayarlanmış spektrometrede okundu.

FRAP reaktifinin hazırlanması: Aşağıda nasıl hazırlandıkları belirtilen A, B ve C çözeltileri ayrı ayrı hazırlanarak karıştırıldı.

K: Numune körü, Folin reaktifi yerine 250 µL su (reaktif çözücüsü) kullanıldı.

R: Reaktif körü, numune yerine 50 µL numune çözücüsü kullanıldı.

G: Gallik asit, 50 µL standart olarak kullanıldı.

K: Kateşin, 50 µL standart olarak kullanıldı.

Yöntem basamakları:

- 50 µL numune, (¼ seyreltilen) (veya standart, her biri 3 paralel)
- 50 µL numune çözücüsü reaktif körü sırasına pipetlendi.
- 250 µL Folin-Ciocalteu reaktifi ilave edildi (3. sıra numune körüne su).
- Vortekslenildi ve 3 dk da oda sıcaklığında bekletildi.
- 750 µL %7,5' lik Na₂CO₃ ilave edildi ve vortekslenildi.
- Oda sıcaklığında 2 saat bekletildi.
- 765 nm' de 20 s arayla absorban okundu.

Toplam fenolik madde miktarı g ya da mL numune başına µg olarak ifade edilmektedir (Örneğin: µg Gallik asit eşdeğeri/gram kuru ekstrakt, µg GAE/g, veya µg kateşin eşdeğeri/100 g orjinal kuru numune, µg CE/100 g kuru numune).

2.5. Duyusal ve Görsel Analizler

Çalışmamızda tereyağının tadında, kokusunda ve renginde değişiklik yapmayacak bitkiler tercih edilmiş olup seçilen bu bitkilerde duyuşal ve görsel analizler yapılarak tereyağında kullanılabilirlikleri test edilmiştir.

Tablo 9. Ekstraktların duyuşal ve görsel analiz verileri

	RENK	KOKU	TAT		RENK	KOKU	TAT		RENK	KOKU	TAT
UKS2	1	2	2	UKS9	3	4	4	UKS16	3	3	3
UKS3	2	1	1	UKS10	4	2	2	UKS17	3	4	4
UKS4	3	2	2	UKS11	3	3	3	UKS18	2	4	4
UKS5	3	1	2	UKS12	2	3	2	UKS19	3	1	2
UKS6	3	4	4	UKS13	3	4	4	UKS20	3	2	2
UKS7	3	3	3	UKS14	2	1	1	UKS21	2	2	2
UKS8	3	2	2	UKS15	3	4	4	UKS22	1	2	2

Sulu ekstraktları hazırlanan her bir numune için 1 ile 4 (RENK; 1: Çok Koyu, 2: Koyu, 3: Açık, 4: Çok Açık, KOKU VE TAT; 1:Çok Baskın, 2:Baskın, 3: Baskın Değil, 4: Hiç Baskın Değil) arasında puanlandırma yapılmıştır. Yüksek puan alan ekstraktlar duysal ve görsel açıdan olumlu sonuçlar vermiştir. Yapılan analiz sonucunda UKS6, UKS11, UKS13, UKS15 ve UKS18 başta olmak üzere birçok bitki tereyağında kullanılabilirlik açısından olumlu yorum almıştır.

Yapılan antioksidan aktivite testleri ve duysal analizler sonucunda hem yüksek antioksidan aktivite gösteren hemde olumlu duysal ve görsel analiz veren UKS11, UKS15, UKS18, UKS19, UKS20, UKE15, UKE18, UKE19 ve UKE20 numuneleri tereyağında oksidasyonu önlemek amacıyla kullanılmak üzere tercih edilmiştir.

2.6. Oksidatif Kararlılık Yöntemleri

2.6.1. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Değeri

Lipid oksidasyon derecesinin belirlenmesinde kullanılan bu yöntem mili eşdeğer gram malondialdehit (MDA)/ kg yağ olarak ifade edilmektedir. TBA değerinin yüksek çıkması yağın oksidatif bozunmasının fazla olduğunu göstermektedir.

Yöntem Basamakları:

- 1,5 g yağ numunesi test tüpüne alındı.
- 1,5 mL kloroform ile çözüldü.
- 5 mL TBA çözeltisi eklendi
- Kuvvetlice karıştırıldı ve 15 dk santrifüj edildi.
- Ayrılan fazlardan üst kısımda kalan sulu faz başka bir test tüpüne alındı.
- 30 dk kaynayan su banyosunda bekletildi.
- Soğutuldu ve 532 nm' de ölçüm yapıldı.

MDA miktarı $C \text{ (mg/L)} = A \text{ (532 nm' de ölçülen absorbands değeri) } / 0,262$ formülünden okunan absorbands yerine konularak konsantrasyon değeri hesaplanmıştır.

2.6.2. Peroksit Değeri

Birincil oksidasyon ürünü olan peroksit seviyelerini belirlemek için AOCS standart yöntemi kullanılmıştır (AOCS, 1990). Örneğın peroksit değeri milieşdeğer gram aktif oksijen/kg yağ olacak şekilde ifade edilmiştir. Peroksit değerinin yüksek çıkması yağın oksidatif bozunmasının fazla olduğunu göstermektedir.

Yöntem basamakları:

- 5 g yağ numunesi bir erlen içerisine aktarıldı.
- Örnek 10 mL kloroformda çözüldü.
- Daha sonra örnek üzerine 15 mL asetik asit ilave edildi.
- Üzerine 1 mL doymun KI eklenerek 1 dk çalkalandı ve 5 dk ağzı kapalı şekilde karanlıkta bekletildi.
- Erlene 75 mL saf su eklendi.
- 3 mL % 1' lik nişasta indikatörü ilave edilerek 0,002 N ayarlı Na₂S₂O₃ çözeltisi ile titre edildi.

Peroksit miktarı $PV = \frac{((VÖ - VK) * N)}{M} * 1000$ formülünde değerler yerine konularak hesaplanmıştır.

PV: Peroksit değeri (mili eşdeğer gram oksijen/kg yağ)

VÖ: Örnek için harcanan tiyosülfat (mL)

VK: Kır deneme için harcanan tiyosülfat (mL)

N: Sodyum tiyosülfatın normalitesi

M: Tartılan yağ miktarı (g)

2.6.3. Serbest Yağ Asitlerinin (FFA) Belirlenmesi

Alkol ve eter karışımında çözüldürülen yağdaki serbest yağ asitlerinin (FFA: Free Fatty Acid) ayarlı bir baz çözeltisi kullanılarak fenolftalein indikatörü eşliğinde titrasyonu sonucu harcanan baz miktarından yararlanarak formül yoluyla hesaplanması ilkesine dayanmaktadır. Analiz edilen numunenin serbest yağ asitliği kütlece % olarak ve genellikle oleik asit üzerinden hesaplanmaktadır. Serbest yağ asiti miktarının yüksek çıkması yağın hidrolitik bozunmasının fazla olduğunu göstermektedir.

Yöntem basamakları:

- 5 g yağ numunesi bir erlene alınır.
- 50 mL 1:1 oranında etanol:dietil eter ilave edilerek yağ çözünene kadar çalkalanır.
- % 1' lik hazırlanmış fenolftalein çözeltisinden 2-3 damla ilave edilir.
- Bürete aktarılan 0,1 N etanollü KOH çözeltisi ile kalıcı açık pembe renk oluşuncaya kadar titre edilir.
- Harcanan 0,1 N etanollü potasyum hidroksit kaydedilerek hesaplama yapılır.

Serbest yağ asiti miktarı % Serbest Yağ Asitleri= $(V/M)*2,8$ formülünde değerlerin yerine koyulmasıyla % oleik asit olarak hesaplanır.

V: 0,1 N KOH çözeltisinden harcanan miktar (ml)

M: Örnek miktarı (g)

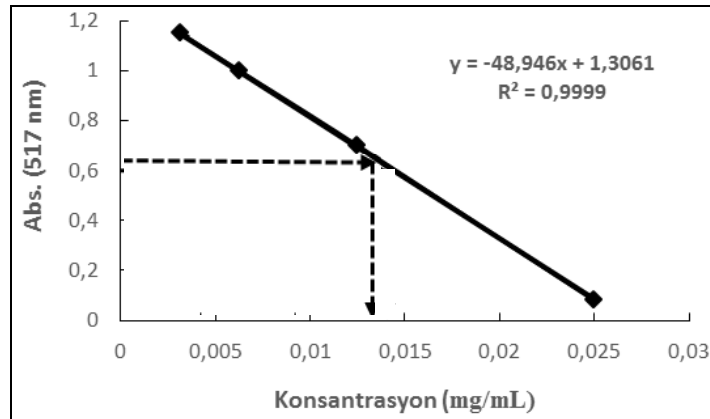
3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

3.1. Özütlelerin Antioksidan Aktiviteleri

Su ve su ile doyurulmuş etil asetat çözücülerini kullanılarak hazırlanan ekstraktlarda antioksidan aktiviteyi belirlemek üzere DPPH• radikal temizleme aktivitesi, demir (III) indirgeme / antioksidan kuvvet (FRAP) aktivitesi ve Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayin yöntemleri olmak üzere üç yöntem kullanılmıştır. Antioksidan testlerde standart olarak C vitamini, Trolox, galik asit ve kateşin karşılaştırma amaçlı kullanılmıştır.

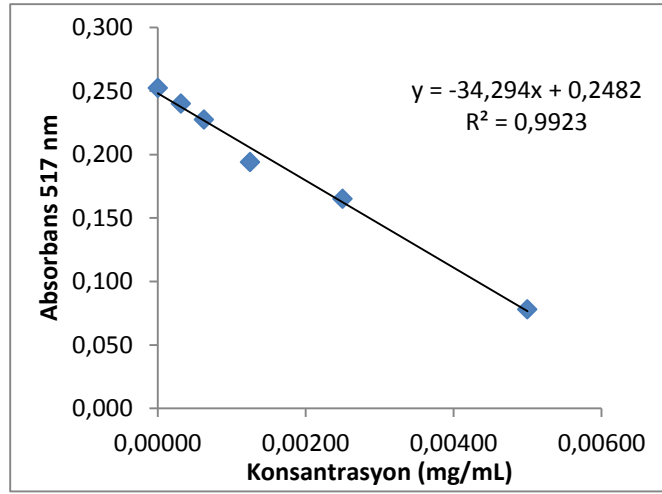
3.1.1. DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri

Su ve su ile doyurulmuş etil asetat çözücülerinde hazırlanmış ekstraktlarda DPPH• radikal temizleme yöntemiyle ekstrakt antioksidan kapasiteleri belirlendi. Yöntemde standart antioksidanlar olarak C vitamini ve Trolox kullanıldı. Numune konsantrasyonuna karşı 517 nm'deki absorbanslar belirlendi. Sonuçlar konsantrasyona karşı absorbans grafiklerine dönüştürüldü. Bu grafiklerden faydalanarak DPPH• konsantrasyonunu yarıya düşüren numune miktarı olan SC₅₀ değerleri mg/mL olarak ifade edildi. Antioksidan aktivite, numunelerin SC₅₀ değerleri belirlenerek karşılaştırıldı.

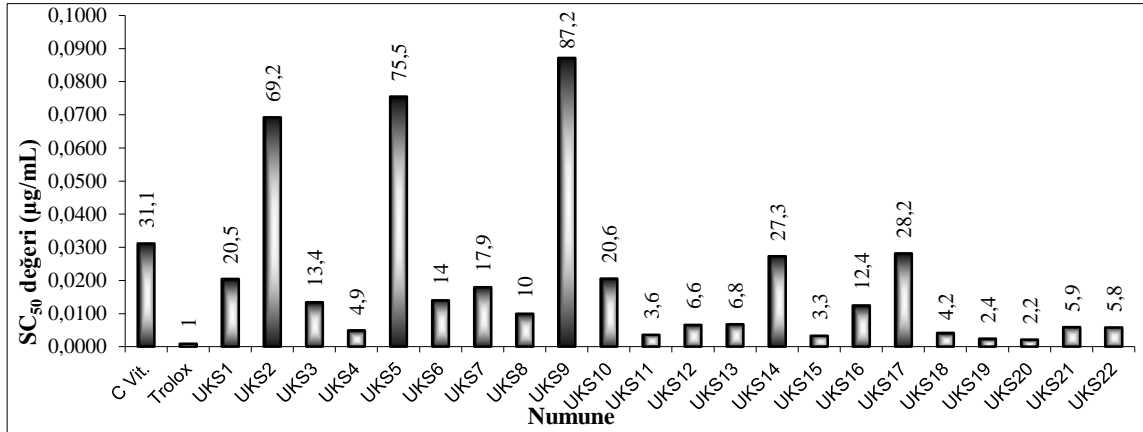


Şekil 37. Farklı konsantrasyondaki bir standardın 517 nm'de verdiği absorbans değerlerinin grafiğinden SC₅₀ değerinin bulunması (SC₅₀ = 0,0133 mg/mL)

3.1.1.1. Sulu Ekstraktlarda DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri



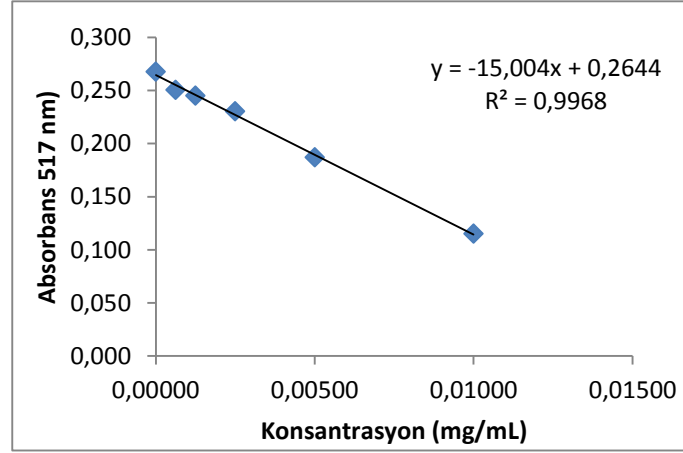
Şekil 38. DPPH yöntemine göre, UKS11 kodlu sulu ekstraktın konsantrasyon-absorbans grafiği (p<0,0001)



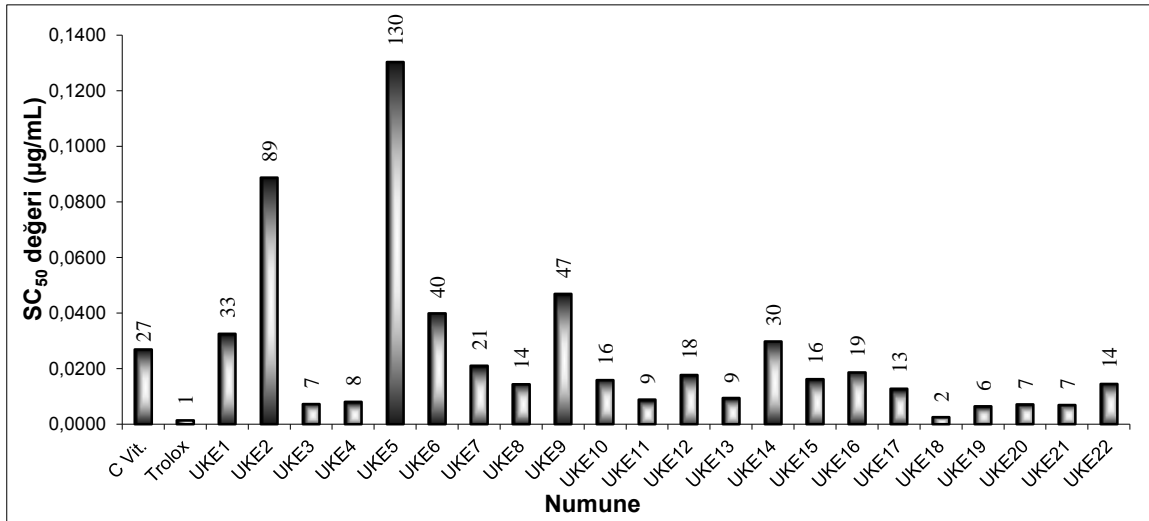
Şekil 39. Sulu ekstraktların ve kullanılan standartların 517 nm'deki absorbansa dayalı DPPH radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC₅₀ (µg/mL) değerleri

Şekil 39'da gösterilen su çözücüsü ile hazırlanan ekstraktların SC₅₀ değerlerine göre, UKS20, UKS19, UKS15, UKS11 ve UKS18 kodlu numunelerin antioksidan aktivitesi diğer numuneler ile karşılaştırıldığında 20-40 katı daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Numuneler arasında en yüksek antioksidan aktiviteye UKS20 sahip olup Trolox'un yarısı aktivite gösterirken C vitamininin 12 katı aktiviteye sahiptir. En düşük aktivite ise UKS9 ekstraktında tespit edilmiştir. Yüksek antioksidan aktivitenin, numunelerin içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

3.1.1.2. Su ile Doyurulmuş Etil Asetat Ekstraktlarında DPPH• Radikal Temizleme Aktiviteleri



Şekil 40. DPPH yöntemine göre, UKE11 kodlu su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktının konsantrasyon-absorbans grafiği (p<0,00001)



Şekil 41. Su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktlarının 517 nm'deki absorbansa dayalı DPPH radikali temizleme aktivitesi tayini sonucu elde edilen SC₅₀ (µg/mL) değerleri

Şekil 41' de verilen su ile doyurulmuş etil asetat numunelerinin DPPH• radikal temizleme aktivitesi karşılaştırıldığında UKE18, UKE19, UKE21, UKE20 ve UKE3 kodlu numunelerin antioksidan aktivitelerinin diğer numunelere göre 18-65 kat yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Numuneler arasında en yüksek antioksidan aktiviteye UKE18 sahip olup Trolox' un yarısı aktivite gösterirken C vitamininin yaklaşık 14 katı

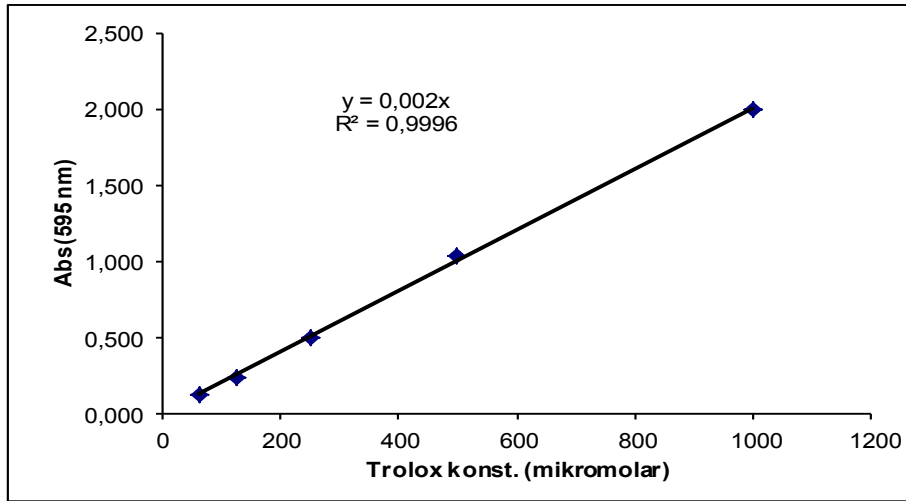
antioksidan aktiviteye sahiptir. En düşük antioksidan aktivite ise UKE5 ekstraktında tespit edilmiştir.

Sulu ve su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktlarında çözücü karşılaştırılmasında ise genel olarak su ile hazırlanan ekstraktlardaki antioksidan aktivite daha yüksek görülmektedir.

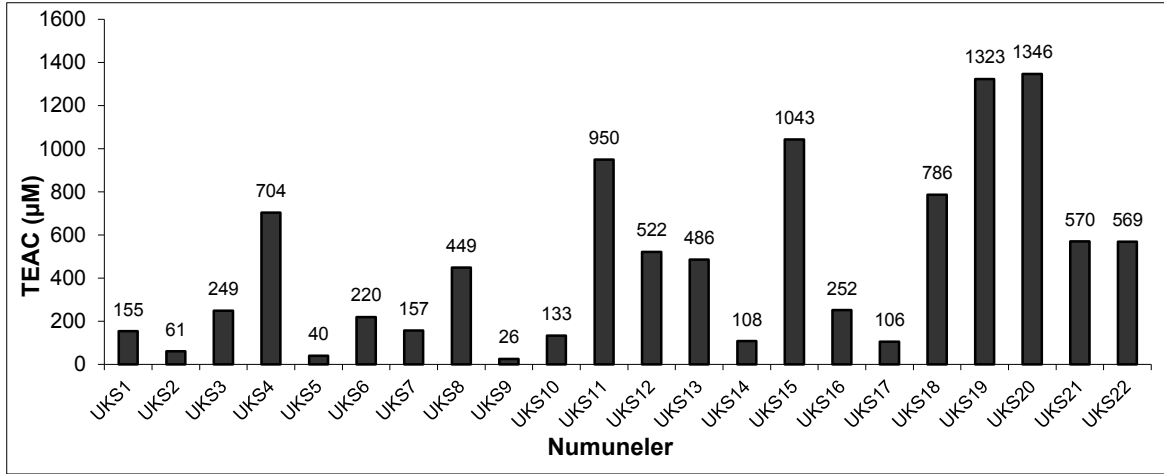
3.1.2. Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kuvveti (FRAP)

Su ve su ile doyurulmuş etil asetat çözücülerinde hazırlanmış 22 adet ekstraktın antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde demir (III) indirgeme / antioksidan güç (FRAP) yöntemi kullanıldı. Bütün numune konsantrasyonları 1 mg/mL olacak şekilde ayarlandı. Bu yöntemde standart olarak Trolox (1 mg/mL) ve C vitamini (1 mg/mL) kullanılarak absorbans ölçümlerine karşılık gelen kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Bu grafikler değerlendirilerek antioksidan aktivite sonuçları C vitamini grafiğine dayalı FRAP (μM) ve Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC (μM)) olarak ifade edildi.

3.1.2.1. Sulu Ekstraktlarda Demir (III) İndirgeme/Antioksidan Kuvveti



Şekil 42. FRAP yöntemine göre, Trolox konsantrasyonu-absorbans grafiği ($p < 0,00001$)

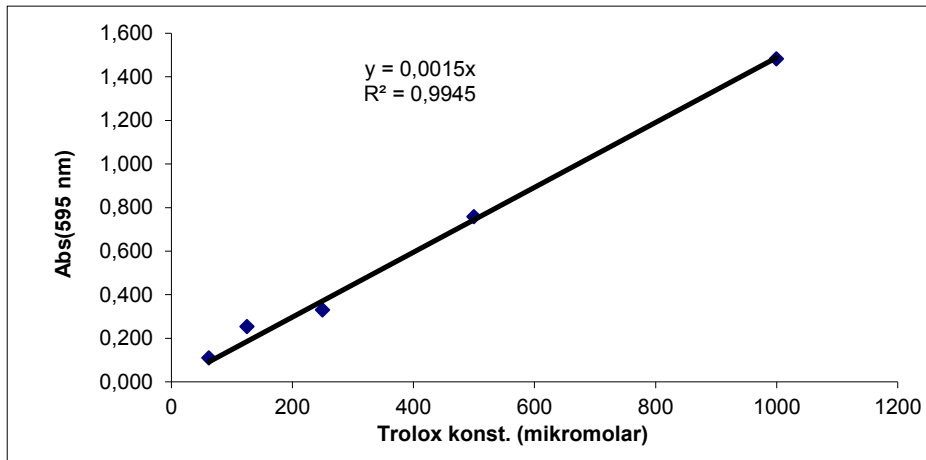


Şekil 43. Sulu ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)

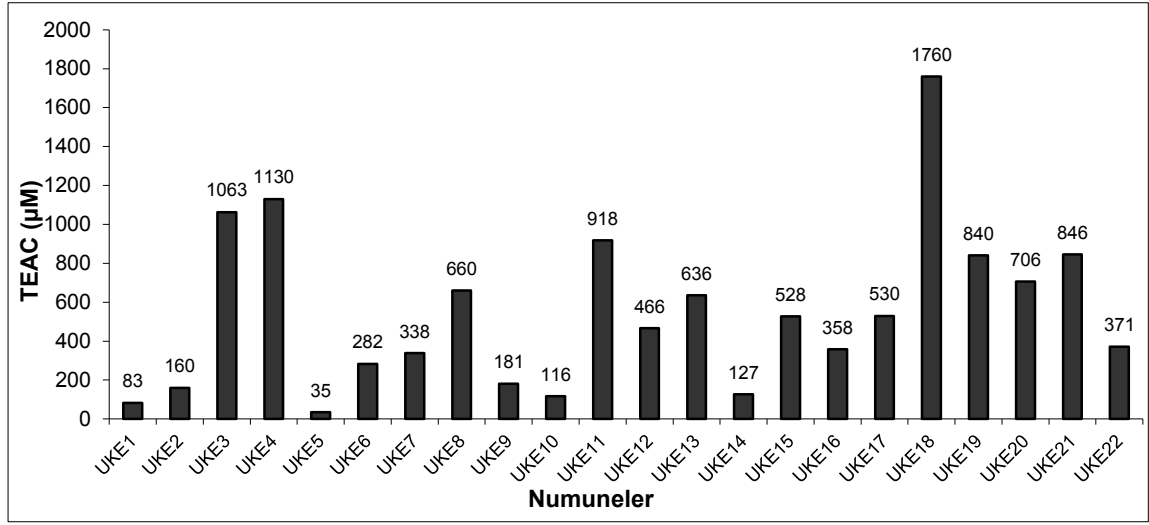
Sulu ekstraktların demir (III) indirgeme/antioksidan kuvvetleri karşılaştırıldığında (Şekil 43), UKS20 numunesinin demiri indirgeme potansiyeli yani antioksidan kuvveti diğer numunelere göre daha yüksek tespit edilmiştir. En düşük antioksidan aktiviteye ise UKS9 kodlu numune sahiptir.

Ayrıca bütün sulu numunelerde, FRAP testi ve DPPH radikal temizleme aktivitesi testleri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür.

3.1.2.2. Su ile Doyurulmuş Etil Asetat Ekstraktlarında Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Kuvveti



Şekil 44. FRAP yöntemine göre, Trolox konsantrasyonu-absorbans grafiği ($p < 0,001$)



Şekil 45. Su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktlarının Fe (III) indirgeme / antioksidan kuvveti (FRAP) değerleri (µM TEAC; Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite)

Su ile doyurulmuş etil asetat numunelerinde demir (III) indirgeme potansiyelleri karşılaştırıldığında, özellikle UKE18 olmak üzere UKE4, UKE3, UKE11, UKE21, UKE19 ve UKE20 numunelerin antioksidan kuvveti diğer numunelerinkinden çok daha yüksek olduğu görülmüştür.

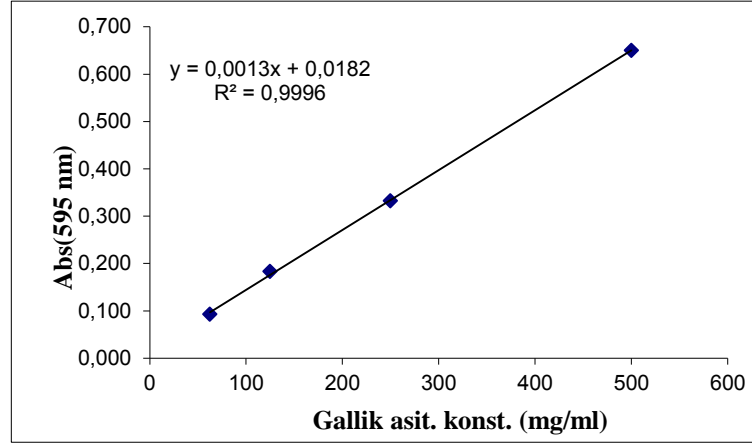
Bütün su ile doyurulmuş etil asetat numunelerinde, FRAP testi ve DPPH radikal temizleme aktivitesi testleri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür.

3.1.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı

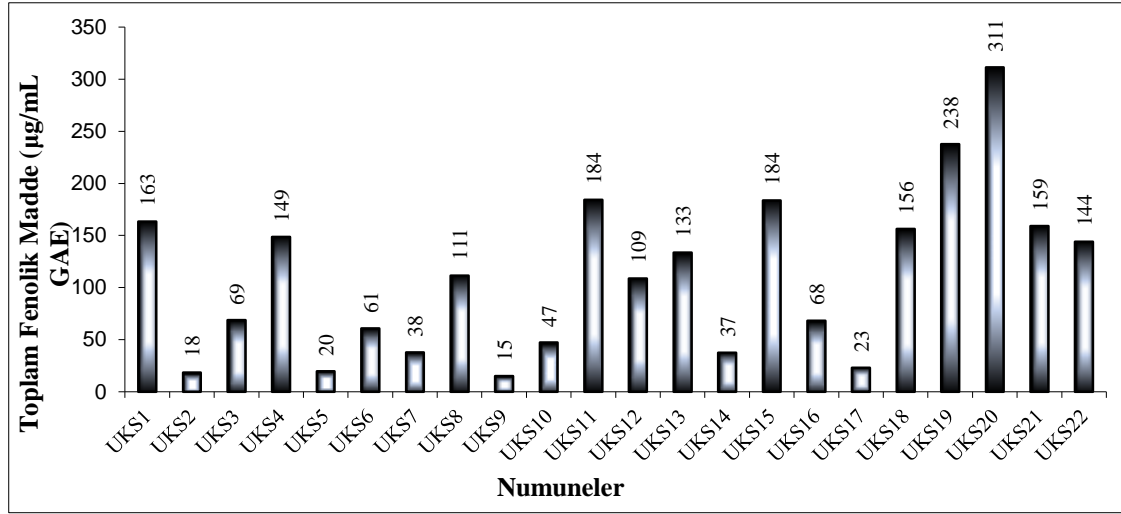
Bütün su ve su ile doyurulmuş etil asetat çözücülerinde hazırlanmış numunelerde antioksidan aktivitenin belirlenmesinde aynı zamanda Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde tayini yöntemi kullanıldı. Yöntemde standart olarak gallik asit ve kateşinin farklı konsantrasyonları kullanılarak elde edilen absorbanların ölçümüne dayalı kalibrasyon grafikleri elde edildi (Şekil 46).

Gallik asit standart grafiğinden elde edilen doğrunun fonksiyonu kullanılarak numunelerdeki fenolik bileşik miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak µg/mL cinsinden ifade edildi (Şekil 47).

3.1.3.1. Sulu Ekstraktlarda Toplam Fenolik Madde Miktarı



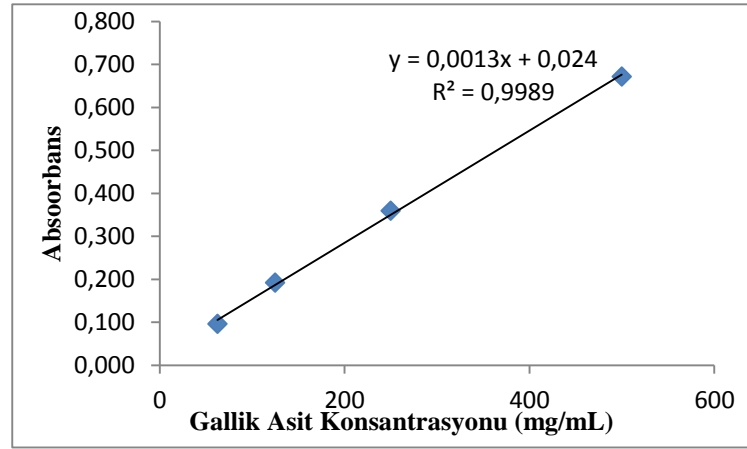
Şekil 46. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit (GA) konsantrasyon-absorbans grafiği ($p < 0,001$)



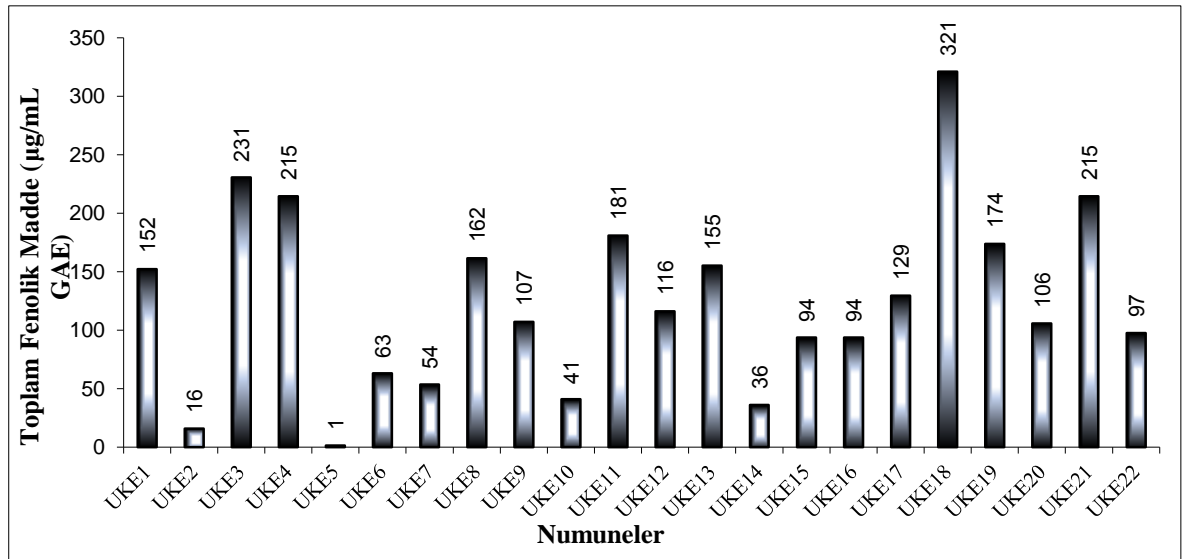
Şekil 47. Folin-Ciocalteu yöntemine göre sulu ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, µg/mL) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

Sulu ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarına GAE cinsinden bakıldığında UKS20, UKS19, UKS11 ve UKS15 numunelerinin en yüksek fenolik bileşene sahip olduğu görülmüştür (Şekil 43). En düşük fenolik içeriğe sahip olan numune ise UKS9 olarak bulunmuştur.

3.1.3.2. Su ile Doyorulmuş Etil Asetat Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Miktarı

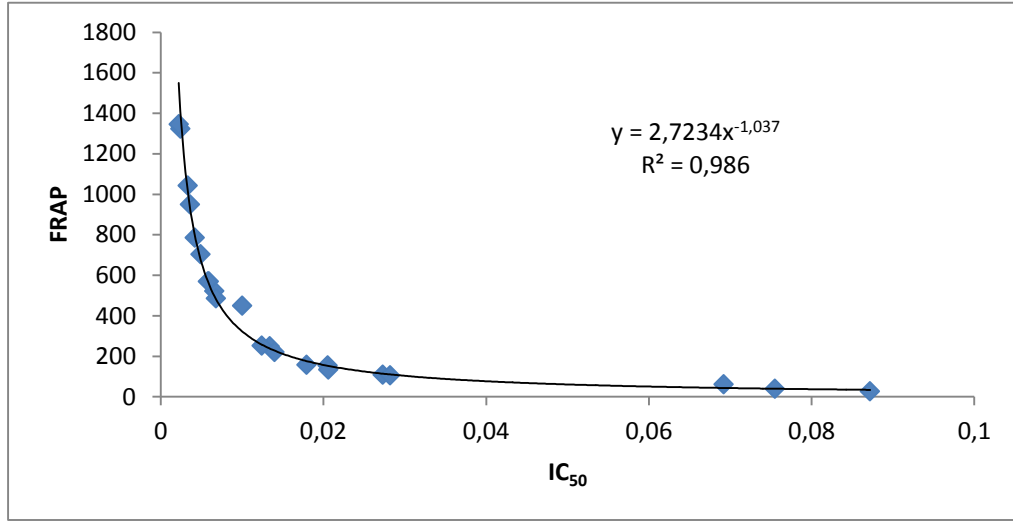


Şekil 48. Folin-Ciocalteu yöntemine göre gallik asit (GA) konsantrasyon-absorbans grafiği ($p < 0,001$)



Şekil 49. Folin-Ciocalteu yöntemine göre su ile doyorulmuş etil asetat ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE, $\mu\text{g/mL}$) cinsinden toplam fenolik madde miktarları

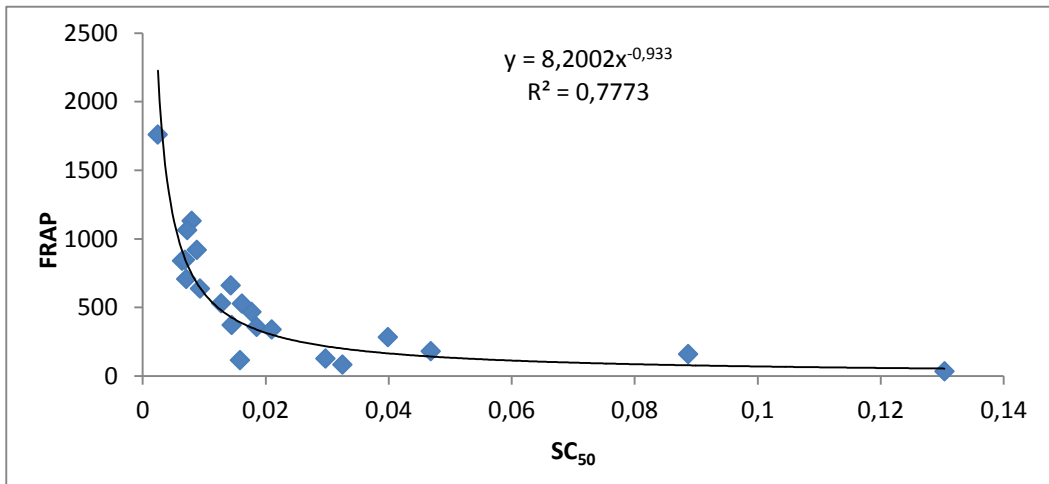
Su ile doyorulmuş etil asetat ekstraktlarında toplam fenolik madde içeriğine göre karşılaştırıldığında en fazla fenolik madde UKE18 numunede görülmüştür. Daha sonra sırasıyla UKE3, UKE4, UKE21 ve UKE11 numunelerinde fenolik madde içeriği fazla tespit edildi. UKE5, en az fenolik madde içermektedir.



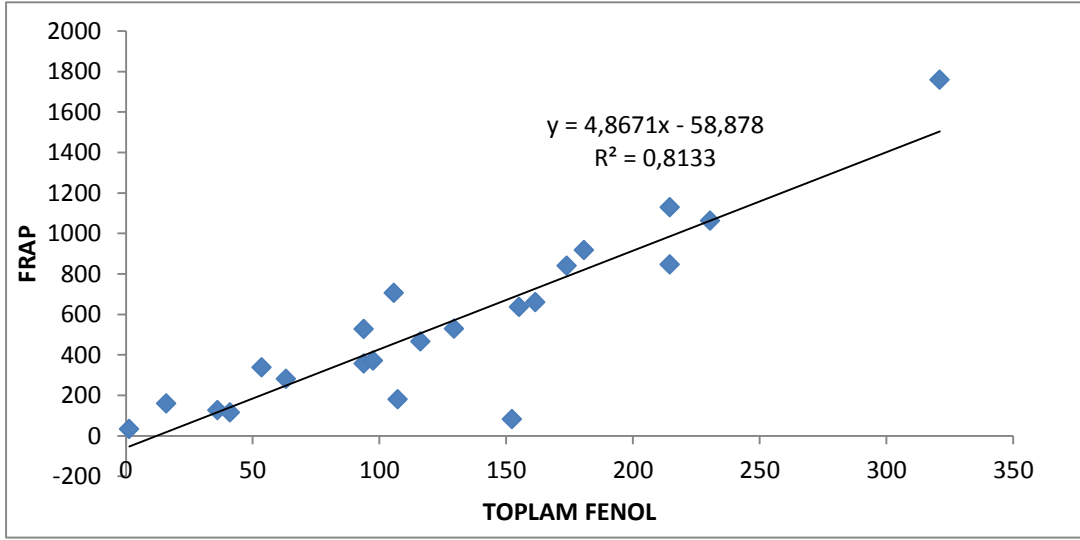
Şekil 52. Sulu ekstraktların FRAP ve DPPH tayin sonuçlarının uyum grafiği

Su ile hazırlanan ekstraktlarda yapılan antioksidan belirleme tayin yöntemlerinden (DPPH, FRAP ve TP) elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak Şekil 50, 51 ve 52 elde edilmiştir. Sulu ekstraktlarla yapılan tüm testler birbiriyle uyumlu olup özellikle FRAP ve DPPH testlerinden elde edilen değerler arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir (Şekil 52).

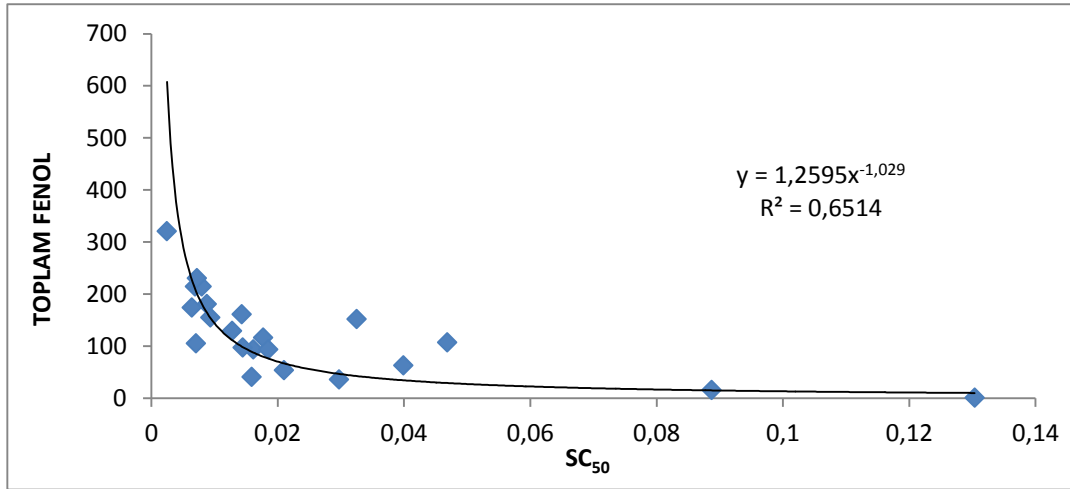
3.2.2. Su ile Doyurulmuş Etil Asetatlı Ekstraktlardaki Antioksidan Aktivite Yöntemlerinin Karşılaştırılması



Şekil 53. Su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktlarda FRAP ve DPPH tayin sonuçlarının uyum grafiği



Şekil 54. Su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktlarda FRAP ve TP tayin sonuçlarının uyum grafiği

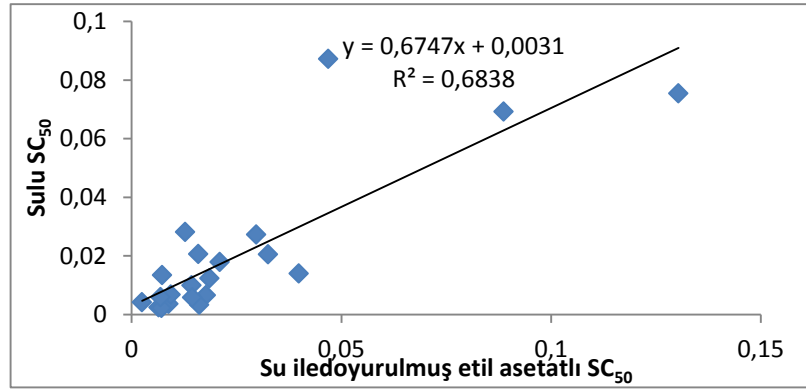


Şekil 55. Su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktlarda TP ve DPPH tayin sonuçlarının uyum grafiği

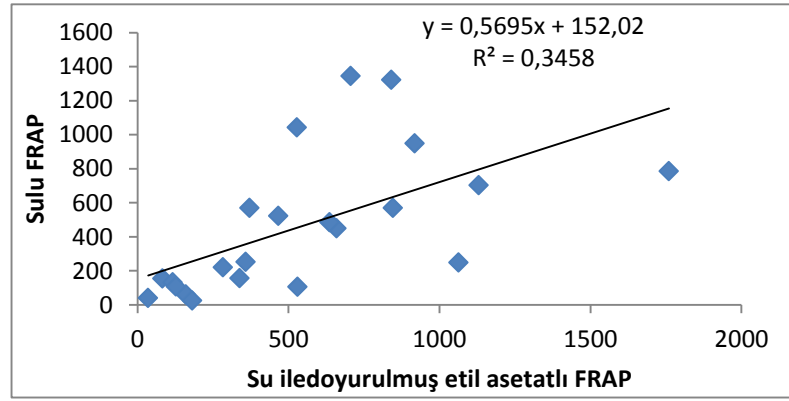
Su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktlarda yapılan antioksidan belirleme tayin yöntemlerinden (DPPH, FRAP ve TP) elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak Şekil 53, 54 ve 55 elde edilmiştir. Numunelerdeki antioksidan yöntemlerin karşılaştırılmasında en yüksek korelasyon FRAP ve TP tayinlerinden elde edilen değerler arasında görülmüştür.

Su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktların antioksidan aktivite yöntemlerinin birbiriyle olan korelasyonları sulu ekstraktlara oranla daha düşüktür.

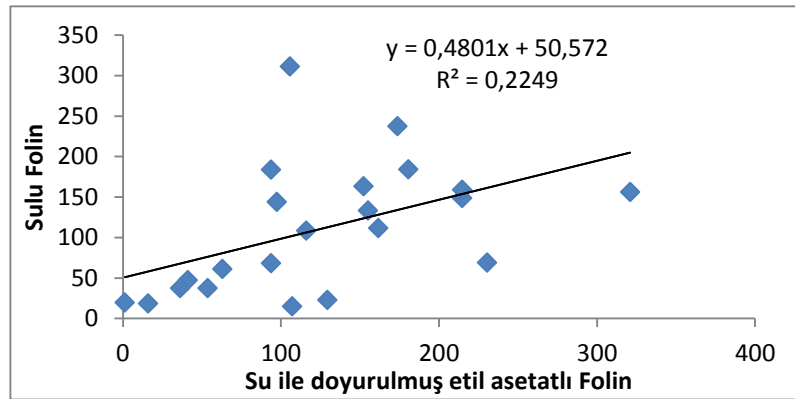
3.3. Su ve Su ile Doyurulmuş Etil Asetatlı Ekstraktların Antioksidan Aktivitelerinin Karşılaştırılması



Şekil 56. Su ve su İle doyurulmuş etil asetatlı ekstraktların SC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 57. Su ve su İle doyurulmuş etil asetatlı ekstraktların FRAP değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 58. Su ve su İle doyurulmuş etil asetatlı ekstraktların Folin değerlerinin karşılaştırılması

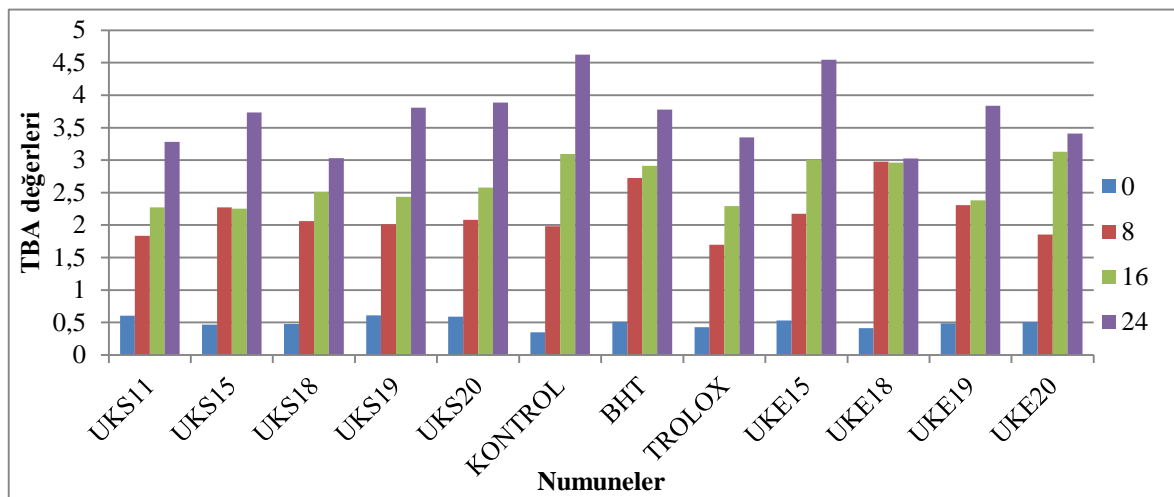
Yapılan bütün yöntemlerde antioksidan aktiviteleri karşılaştırılan su ve su ile doyurulmuş etil asetat ekstraktlarının arasında genel olarak lineer bir ilişki olduğu görülmektedir. Şekil 56' dan da anlaşıldığı üzere en iyi korelasyonun SC₅₀ testleri arasında olduğu görülmektedir. Bazı örneklerin lineer doğrudan sapması kimyasal kompozisyonlarındaki fenolik bileşiklerin yapısından kaynaklanmaktadır. Bazı örnekler içerdikleri apolar fenolik bileşikler sebebiyle daha apolar olan su ile doyurulmuş etil asetat çözücüsünde aktifken, bazıları da içermiş oldukları polar fenolik bileşiklerden ötürü polar bir yapıya sahip olan su çözücüsünde aktivite göstermektedirler.

3.4. Özütlerin Oksidasyona Karşı Aktiviteleri

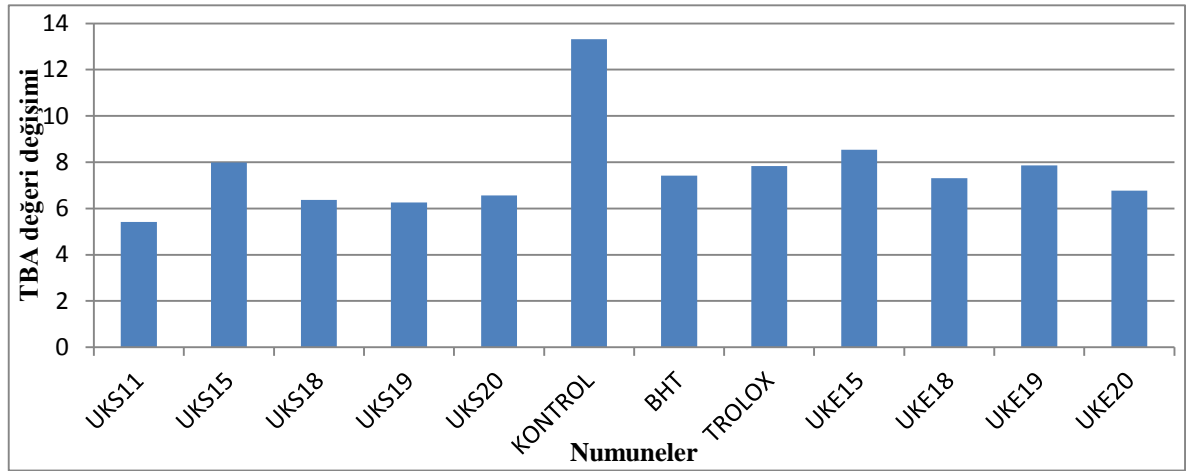
3.4.1. Tiyobarbitürik Asit (TBA) Değeri

Lipitler hidroperoksitleri depolanma süreleri boyunca aldehit ve hidrokarbon oluşturmak üzere parçalanmaktadır. TBA değerinin artması özellikle aldehit gibi ikincil oksidasyon ürünlerinin varlığının bir göstergesidir. Oluşan bu ürünlerin MDA içeriğinin belirlenmesiyle oksidatif bozulmanın şiddeti öğrenilmektedir.

Yağlarda oksidatif bozulmanın bir göstergesi olan TBA değerine ait farklı sıcaklıklardaki bulgular aşağıdaki grafiklerde gösterilmektedir.

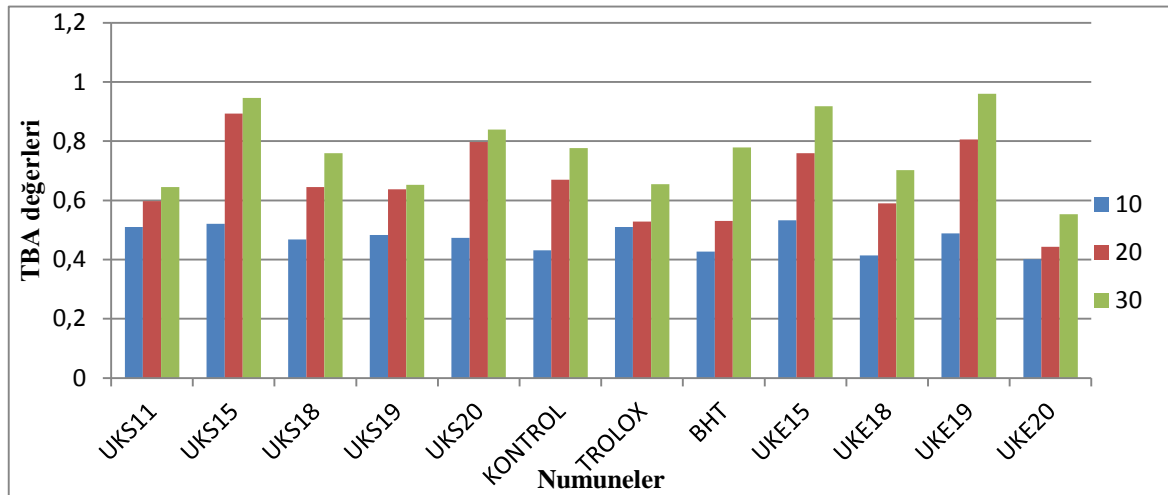


Şekil 59. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin TBA değeri verileri

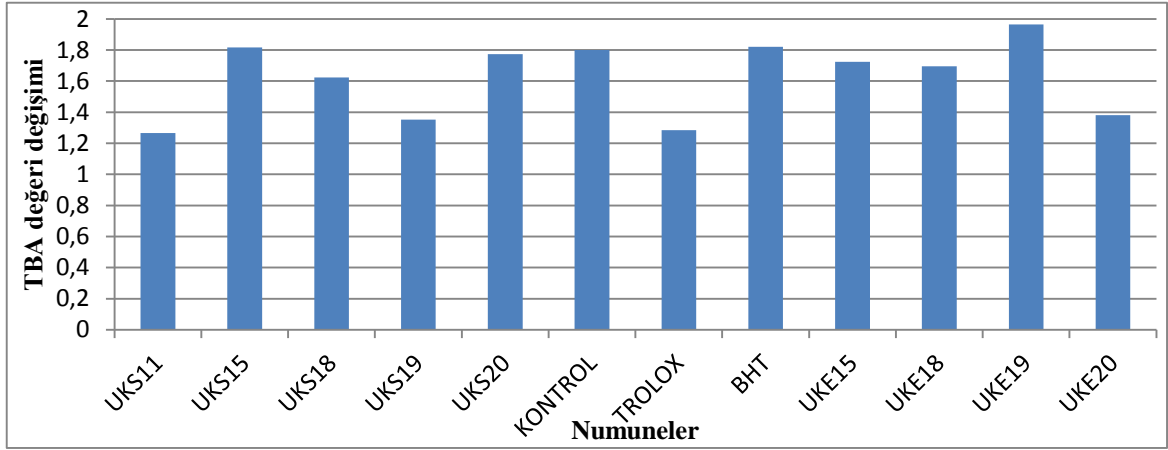


Şekil 60. 110°C’ de 24 saat takip edilen numunelerin TBA değeri artış oranları

Tereyağı örneklerinde 110°C’ de 24 saat boyunca yapılan TBA değeri takibi sonucu elde edilen değerler Şekil 59’ da verilmiştir. Tereyağı örneğindeki MDA içeriğinin bekleme süresi boyunca sürekli arttığı gözlenmiştir. Kontrolle kıyaslandığında bütün ekstraktlarda bekleme süresi boyunca daha az MDA oluştuğu gözlenmiştir. 24 saat boyunca en etkili korumayı UKS18 ve UKE18 örnekleri göstermiştir. Ayrıca UKS11 numunesi Trolox ve BHT standartlarından daha iyi antioksidan etki gösterirken UKS15 ve UKS19 numuneleri de benzer etki göstermiştir.



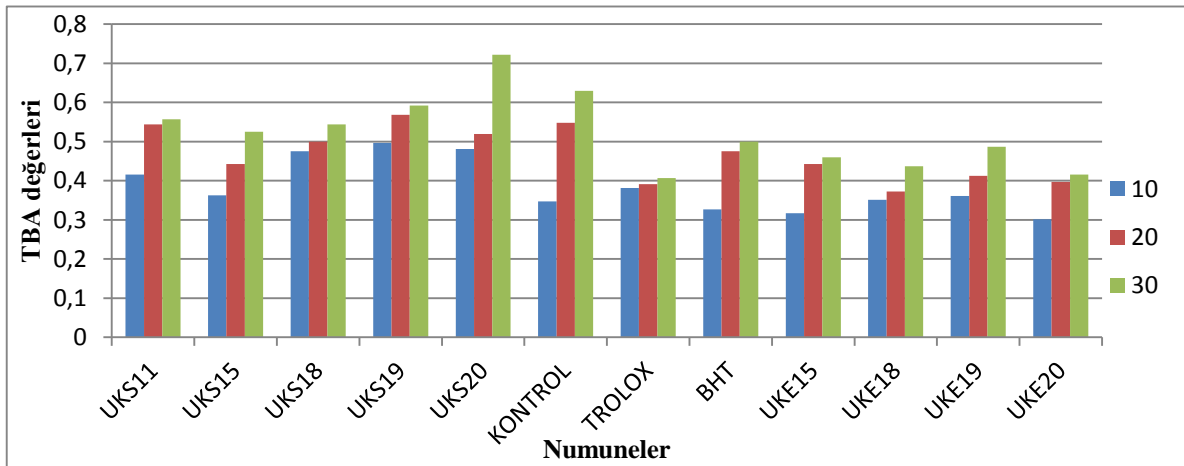
Şekil 61. 25°C’ de 30 gün takip edilen numunelerin TBA değeri verileri



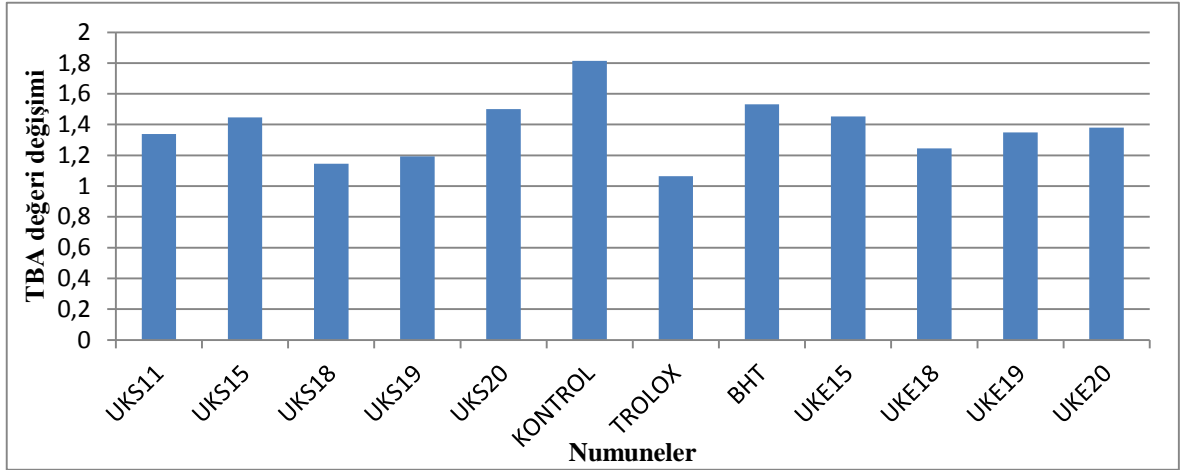
Şekil 62. 25°C’ de 30 gün takip edilen numunelerin TBA değeri artış oranları

Tereyağı örneklerinde 30 gün boyunca 25 ve 4°C’ de yapılan TBA testine ait bulgular sırasıyla 61. ve 63. şekillerde verilmiştir. Her iki sıcaklıkta da bekleme süresi boyunca oluşan MDA miktarı artmıştır. Fakat 25°C’ deki artış 4°C’ deki oranla daha fazladır. Bu analiz için 25°C’ deki en iyi korumayı UKE20 numunesi yapmıştır. Hatta UKS11 ve UKS19 numuneleri bile standart olarak kullanılan BHT ve Trolox’ tan daha iyi aktivite göstermiştir.

TBA analizi sonucu 4 °C’ deki değerlere bakılacak olursa en yüksek aktiviteyi gösteren örneğin Trolox olduğu anlaşılacaktır. UKE15, UKE18 ve UKE20 numunelerinin değerleri de Trolox’ la benzerlik göstermektedir. Bu sıcaklıktaki en kötü sonuçlar ise Kontrol ve UKS20 numunelerinden elde edilmiştir.



Şekil 63. 4°C’ de 30 gün takip edilen numunelerin TBA değeri verileri

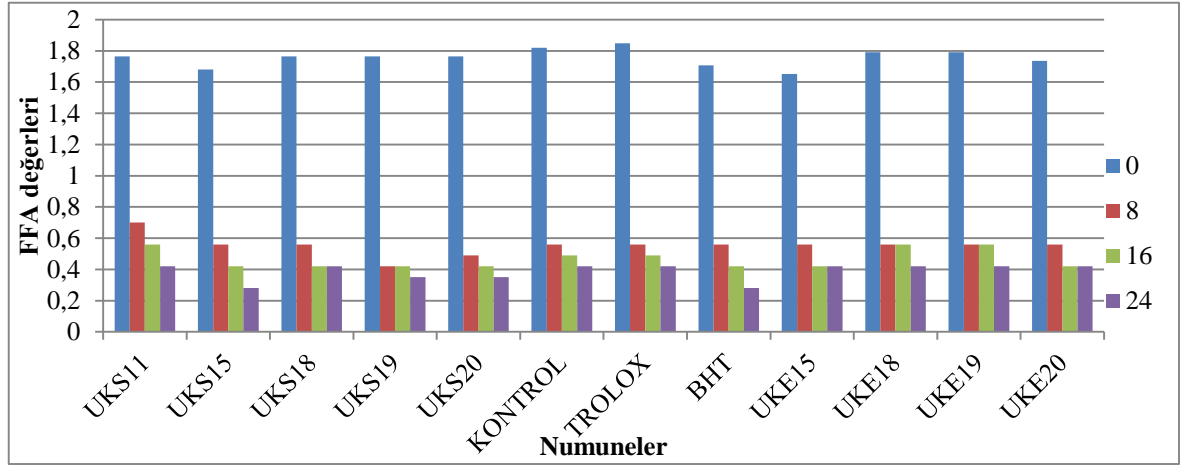


Şekil 64. 4°C' de 30 gün takip edilen numunelerin TBA değeri artış oranları

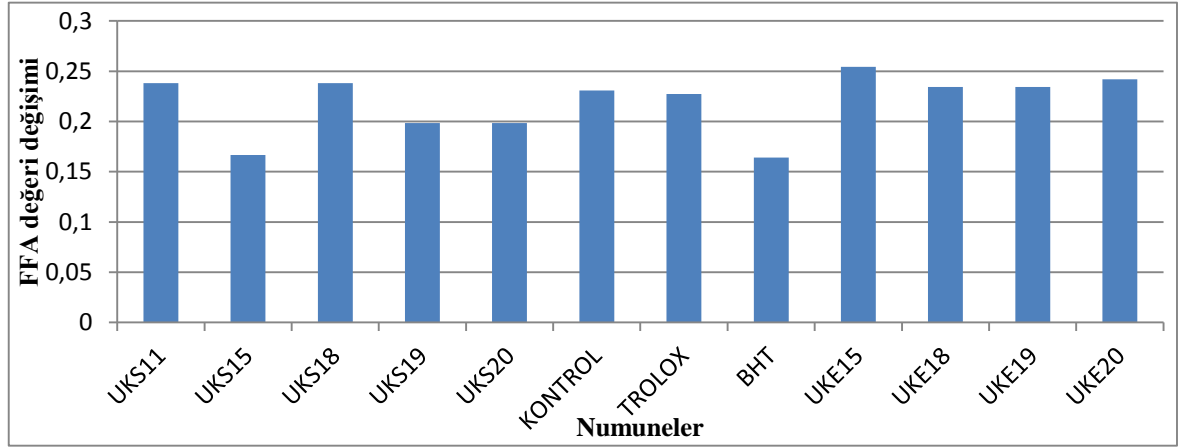
3.4.2. Serbest Yağ Asitleri (FFA)

Lipitlerin hidrolizi sonucu oluşan yağ asitleri tek başlarına besin kaybına yol açmasalar bile yağ asitlerinin zamanla kokucu bileşiklere dönüşmesinden dolayı istenmemektedirler. Depolama sıcaklığı ve zamana bağlı olarak yağ asiti oluşumunu gösteren tablolar aşağıda verilmektedir.

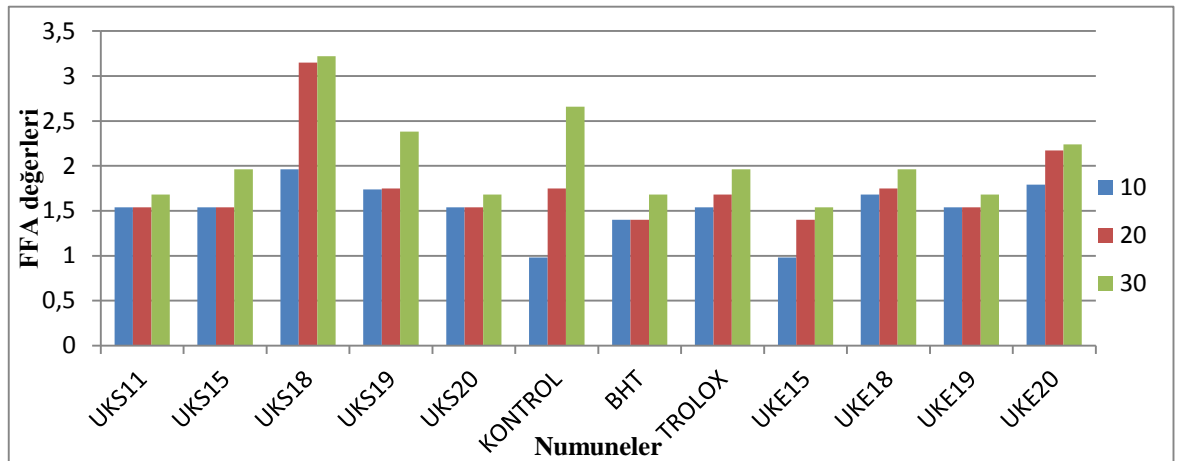
Serbest yağ asiti analizi tereyağı numunelerinde 110°C' de 24 saat, 25 ve 4°C' de 30 gün boyunca takip edilmiştir. Şekil 67' den de anlaşıldığı gibi 25°C' de oluşan serbest yağ asidi miktarı bekleme süresi boyunca anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Bu sıcaklıkta FFA oluşumuna karşı en iyi korumayı UKS11 ve UKS20 numuneleri yapmıştır. 4°C' deki serbest yağ asiti oluşumu genel olarak beklendiği gibi bekleme süresi boyunca artış göstermiştir (Şekil 69). Bekleme süresi boyunca 25°C' de oluşan serbest yağ asiti miktarının 4°C' de oluşan serbest yağ asiti miktarından daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 110°C' de 24 saat boyunca takibi yapılan serbest yağ asitlerinin ise beklenenin aksine bekleme süresi boyunca azaldığı görülmüştür (Şekil 65). Bu azalmaya yüksek sıcaklıkta yanan tereyağı numunesinde meydana gelen karbonizasyon ürününün sebep olduğu düşünülmektedir. Yanma sonucu oluşan aktif karbon benzeri madde serbest yağ asitlerini adsorbe ederek ortamdan uzaklaştırdığı düşünülmektedir.



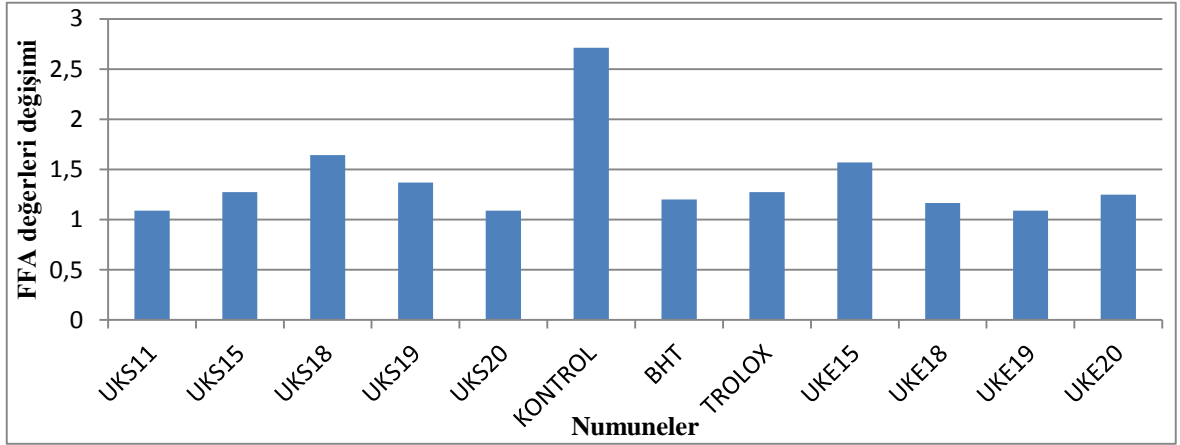
Şekil 65. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin FFA değerleri



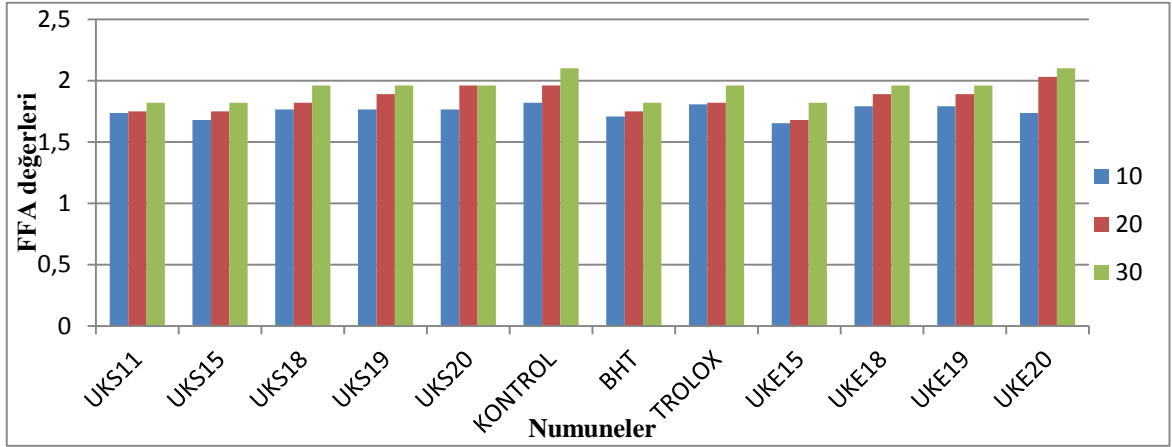
Şekil 66. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin FFA değerlerinin artış oranı



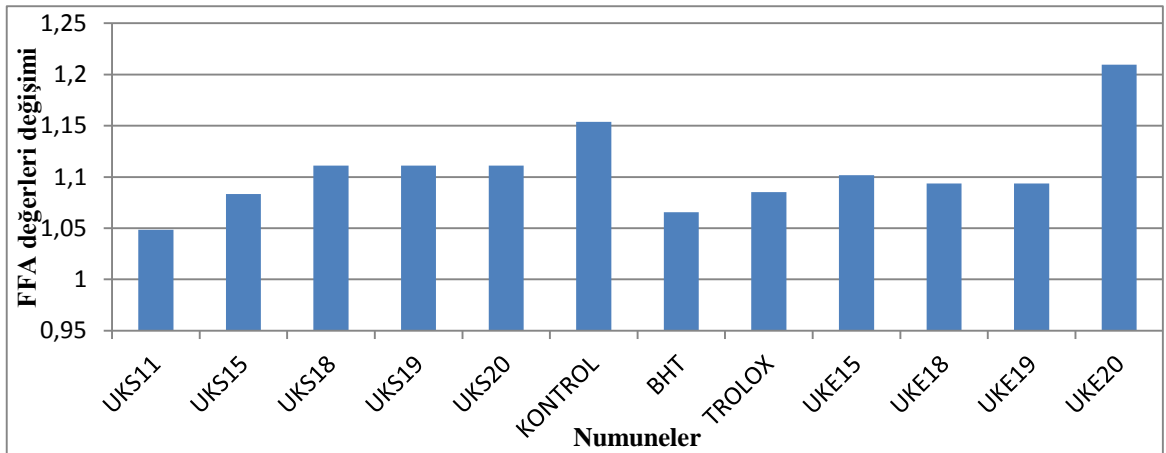
Şekil 67. 25°C' de 30 gün takip edilen numunelerin FFA değerleri



Şekil 68. 25°C' de 30 gün takip edilen numunelerin FFA değerlerinin artış oranı



Şekil 69. 4°C' de 30 gün takip edilen numunelerin FFA değerleri

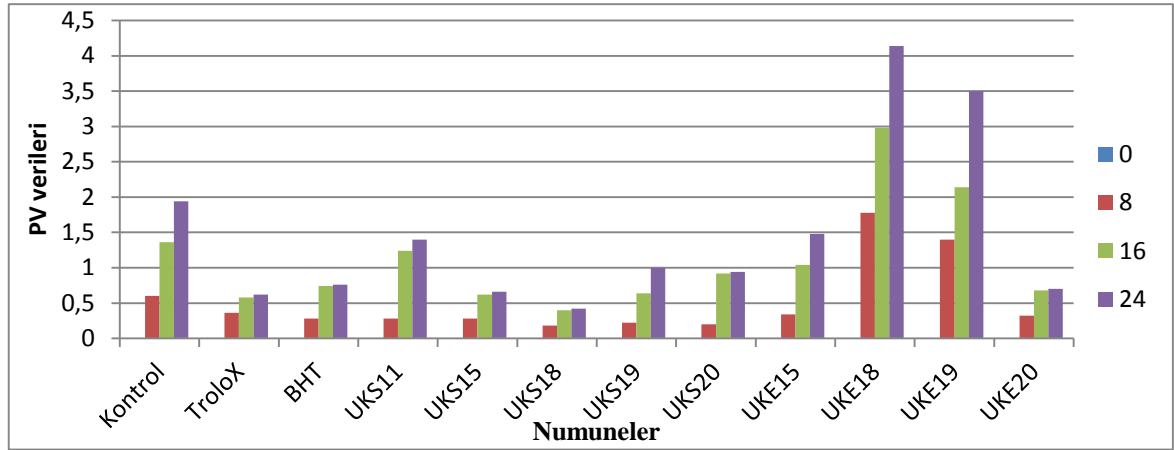


Şekil 70. 4°C' de 30 gün takip edilen numunelerin FFA değerlerinin artış oranı

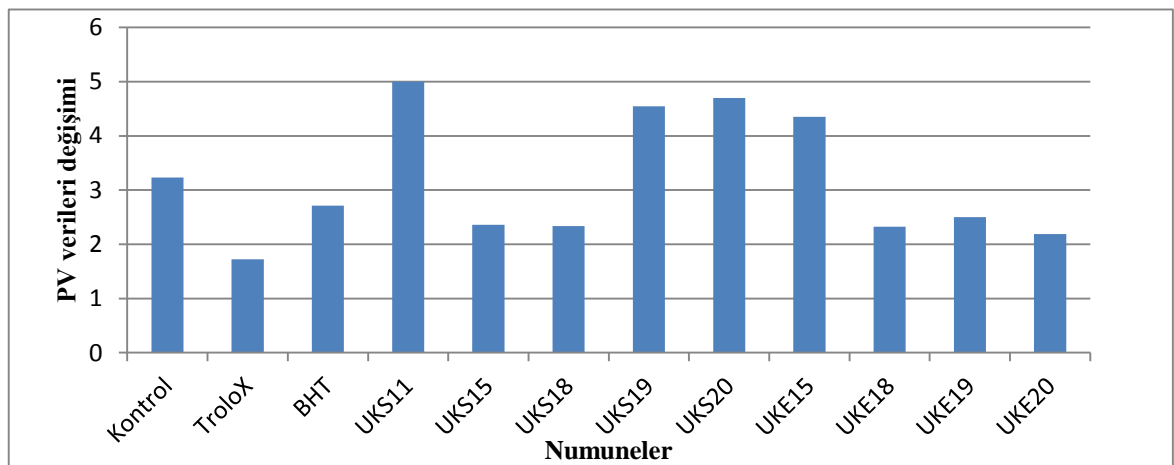
3.4.3. Peroksit Değeri

110°C lik yağ banyosuna yerleştirilen yağ numunelerinin 24 saat takibi yapılarak peroksit sayısındaki değişim belirlenmiştir.

Tereyağı örneğinde 110°C' de 24 saat boyunca yapılan PV takibi sonucu elde edilen değerler Şekil 71' de verilmiştir. Tereyağı örneğindeki peroksit oluşumunun bekleme süresince arttığı gözlenmiştir. UKE18 VE UKE19 numuneleri hariç bütün numuneler kontrole göre daha iyi koruma aktivitesi göstermiştir. 24 saat boyunca en etkili korumayı UKS18 örneği göstermiştir. Ayrıca UKS15 ve UKE20 numuneleri de Trolox ve BHT standartlarıyla benzer aktivite göstermişlerdir.



Şekil 71. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin PV verileri



Şekil 72. 110°C' de 24 saat takip edilen numunelerin PV verilerinin artış oranları

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada tereyağında oksidasyonu ve acılaşmayı durdurmak veya yavaşlatmak adına çeşitli bitki ekstraktları kullanılmıştır. Seçilen bitkilerin tereyağının kokusunda, renginde ve tadında değişiklik yapmaması özellikle hedeflenmiştir.

Belirlenen 22 bitki numunesinin in vitro antioksidan aktivitelerinin tespiti amacıyla DPPH, FRAP ve Folin antioksidan aktivite testleri uygulanmıştır.

DPPH testi ile antioksidan aktiviteleri belirlenen UKS11, UKS15, UKS18, UKS19, UKS20 ve UKE18 numuneleri C vitamininden çok yüksek aktivite gösterirken Trolox ile benzer aktivite göstermişlerdir. UKE15, UKE19 ve UKE20 numuneleri ise C vitamininden yüksek aktiviteye sahipken Trolox' tan daha düşük aktivite göstermişlerdir.

Demir (III) indirgeme/antioksidan kuvvetleri belirlenen numuneler karşılaştırıldığında UKS11, UKS15, UKS18, UKS19, UKS20, UKE3, UKE4, UKE11 ve UKE18 numunelerinin çok daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Bütün numunelerde toplam fenolik madde miktarlarına bakıldığında UKS11, UKS15, UKS18, UKS19, UKS20, UKE3, UKE4, UKE11 ve UKE18 numunelerinin yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Yapılan üç antioksidan aktivite belirleme yöntemi de birbiriyle uyumlu sonuç vermiş olup FRAP ve Folin antioksidan aktivite belirleme testlerinin korelasyonlarının çok daha yüksek (sulu ekstraktlar için $R^2= 0,8548$, su ile doyurulmuş etil asetatlı ekstraktlar için $R^2= 0,8133$) olduğu tespit edilmiştir.

Antioksidan aktiviteleri belirlenen bütün numunelere duyuşal ve görsel analizler yapılmıştır. Yapılan bu analizler sonucunda hem yüksek antioksidan aktivite gösteren hem de olumlu duyuşal sonuç veren UKS11, UKS15, UKS18, UKS19, UKS20, UKE15, UKE18, UKE19 ve UKE20 numuneleri tereyağında oksidasyonu önlemek amacıyla kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tereyağının bozunmasını ve oksidasyonun derecesini belirlemek adına TBA, PV ve FFA testleri tercih edilmiştir. Oksidasyonu önlemek adına seçilen bitki ekstraktları ve standartların konsantrasyonları 200 ppm olacak şekilde tereyağına ilave edilmiştir. Benzer şekilde literatürde de bitki ekstraktlarıyla yağların bozulmasını önlemek amacıyla yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde 200, 300, 400, 500 ve 1250

mg/kg konsantrasyonlarındaki alkolik biberiye ekstraktları 60 ve 110 °C de tereyağına eklenmiş, tereyağında tiyobarbitürik asit reaktif madde ve peroksit oluşumu takip edilmiştir. Alkolik biberiye ekstraktı en iyi korumayı 400 mg/kg konsantrasyonda göstermiş olup tereyağında oksidasyonu önlemek amacıyla kullanılabilceği vurgulanmıştır (Renata vd., 2014). Ayrıca yeşil çay ekstraktı da lipid içeren gıdalarda lipid oksidasyonunu geciktirmek ve çeşitli gıda ürünlerinin raf ömrünü artırmak için doğal gıda katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Senanayake, 2013).

Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesiyle oksidatif bozunmanın şiddetinin tespit edildiği TBA testinde 110°C’ de bekleme süresi boyunca en iyi korumayı UKS18 ve UKE18 numuneleri yapmıştır. 25°C’ de yapılan TBA analizinde en iyi korumayı UKS11, UKS19 ve UKE20 yaparken 4°C’ de en iyi korumayı Trolox, UKE15, UKE18 ve UKE20 numuneleri yapmıştır.

Lipitlerin hidrolizi sonucu oluşan serbest yağ asitlerine karşı en iyi korumayı 25°C’ de UKS11 ve UKS20 yaparken 4°C’ de en iyi korumayı UKS11 ve BHT yapmıştır. 110°C’ de takibi yapılan serbest yağ asitlerinin ise bekleme süresi boyunca azaldığı gözlenmiştir.

Tereyağında meydana gelen oksidatif bozunmayı belirlemek adına ayrıca 110°C’ de 24 saat boyunca PV takibi yapılmıştır. Bütün tereyağı numunelerinde bekleme süresi boyunca peroksit oluşumunun arttığı tespit edilmiş olup en iyi korumanın UKS18 numunesi tarafından yapıldığı gözlenmiştir.

Tereyağında oksidasyonu belirlemek amacıyla yapılan bütün analizlerde bekleme süresi ve sıcaklık artışıyla oksidasyonun arttığı tespit edilmiştir. Bu sonucun literatür bilgisiyle de uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bütün analizler birbiriyle uyumlu sonuçlar vermiş olup bu analizlerin ışığında UKS15, UKS18, UKS20 ve UKE20 numuneleri başta olmak üzere birçok numunenin tereyağında oksidasyonu önlemek amacıyla doğal antioksidan olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Yüksek aktiviteye sahip ekstraktların endüstriyel kullanılabilirliği konusunda çalışmamızı destekleyen ‘Kahvaltı Dünyası’ firmasıyla araştırma ve geliştirme çalışmalarına devam edilecektir.

Yapılan bu çalışmaların olumlu sonuç vermesi gelecekte gıdalarda oksidasyonu önlemek adına yapay antioksidanların kullanımı yerine doğal antioksidanların kullanımını teşvik eden ve sağlık açısından ümit veren bir durumdur.

5. KAYNAKLAR

- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, 18, 32-37, Konya.
- American Oil Chemists' Society 1990. Official methods and recommended practices of American Oil Chemists's Society, 5th ed. American Oil Chemists's Society, II, USA.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. ve Altun, M., 2005. Total Antioxidant Capacity Assay of Human Serum Using Copper (II)-neocuproine as Chromogenic Oxidant: The CUPRAC Method, Taylor & Francis, 39, 9, 949-961.
- Butter, Wikipedia, <http://en.wikipedia.org/wiki/Butter>, 2015.
- Chang L.C., Kinghorn A.D. ve C. Tringali, 2001. Bioactive Compounds from Natural Sources, Taylor & Francis, London, 159.
- Chen, L. H., Boissonneault, G. A. ve Glauert, H. P., 1988. Vitamin C, Vitamin E and Cancer (Review), Anticancer Res. 8, 739-748.
- Choe, E. ve Min, D.B., 2006. Mechanisms and Factors for Edible oil Oxidation, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5 169-186
- Cuendet M., Hostettmann K. ve Potterat O., 1997. Helv. Chim. Acta 80, 1144-1152.
- Edge R., Mc Garvey D. J.ve Truscott, T. G., 1997. The carotenoids as antioxidants-a review, J. Photoch. Photobio., 41, 189-200.
- Erel O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against free radical reactions, Clin. Biochem., 37, 2, 112-119.
- Faine, L.A., Rodrigues, H.G., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M.X., Diniz, Y.S., Fernandes, A.A.H. ve Novelli, E.L.B., 2006. BHT induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats, Experimental and Toxicology Pathology, 57, 221-226.
- Farag, R.S., El-Baroty, G.S. ve Basuny, A.M., 2003. Safety evaluation of olive phenolic compounds as natural antioxidants, Int. J. Food Sci. Nutr., 54, 159-174.
- Frankel, E.N., 1991. Recent Advances in Lipid Oxidation. J. Sci. Food Agric. 54, 4, 495-511.
- Günaydın B. ve Çelebi H., 2003. Genel Anesteziklerin Serbest Radikaller ve Antioksidanlarla İlişkileri, Anestezi Dergisi, 11, 87-98.

- Halliwell B., Cross C.E. ve Gutteridge J.M.C., 2002. Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease. Where are We Now?, Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 119, 598-620.
- Hirose, M., Mutai, M., Takahashi, S., Yamada, M., Fukushima, S. ve Ito, N., 1991. Effect of phenolic antioxidants in low combination on forestomach carcinogenesis in rats pretreated with N-methyl-N²-nitro-N-nitrosamine, Cancer Res., 51, 824-827.
- Huang, M. F., Lin, W. L. ve Ma, Y. C., 2005. A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. Indoor Air 15:135-140.
- Imaida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Ohtami, M., Nakanishi, K. ve Ito, N., 1983. Promoting activities of BHA and BHT on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ -glutamyl transpeptidase-positive foci development in the liver of rats, Carcinogenesis, 4, 895-899.
- Imaida, K., Fukushima, S., Shirai, T., Ohtami, M., Nakanishi, K. ve Ito, N., 1984. Promoting activities of BHA, BHT and sodium L-ascorbate on forestomach and urinary bladder carcinogenesis initiated with methylnitrosourea in F344 male rats, Gann, 75, 769-775.
- İskefiyeli, Z., 2014. Damlatma ile Yeni DPPH ve FRAP Antioksidan Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulanması, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Keskin, H., 1981. Besin Kimyası. I. Cilt (4.Baskı). Fatih Yayınevi ve Matbaası, İstanbul.
- Kisley, L., Barrett, B.S., Dwyer-Nield, L.D., Bauer, A.K., Thompson, D.C. ve Malkinson, A.M., 2002. Celecoxib reduces pulmonary inflammation but not lung tumorigenesis in mice, Carcinogenesis, 23, 1653-1660.
- Lee J., Koo, N. ve Min D.B., 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3, 21-33.
- Li, Y., Seacat, A., Kuppusamy, P., Zweier, J. L., Yager, J. D. ve Trush, M. A., 2002. Mutat. Res., 518, 2, 123-33.
- Lindenschmidt, R.C., Trika, A.F., Guard, M.E. ve Witschi, H.P., 1986. The effect of butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice, Toxicology, 38, 2, 151-160.
- Nadeem, M., Abdullah, M., Khalique, A., Hussain, I., Mahmud, A. ve Inayat, S., 2013. The effect of moringa oleifera leaf extract as antioxidant on stabilization of butter oil with modified fatty acid profile, J. Sci. Tech., 15, 919-928.
- Nilkanth P., Sumit A., Ram R.B. ve Balbir K.W., 2012. The effects of asparagus racemosus extract on oxidative stability of ghee, in relation to added natural and synthetic antioxidants, International Journal of Dairy Technology, 65, 293-299.

- Ohkawa H., Ohishi N. ve Yagi K., 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbuturic Acid Reaction, Anal. Biochem., 95, 351-358.
- Onat T., Emerk K. ve Sözmen E.Y., 2002. İnsan Biyokimyası , Palme Yayıncılık, Ankara.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, Jap. J. Nutr., 44, 307-315.
- Pokorny, J., 1991. Natural antioxidants for food use, Trends Food Sci Technol ,2, 223-227.
- Ratnam, D.V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K. ve Kumar, M. N.V. R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical Perspective, Journal of Controlled Release 113, 189-207.
- Renata, D. S. ve Kalidas, S., 2014. Oxidative stability of butter with added phenolics from Lamiaceae herbs and in vitro evaluation of potential cytotoxicity of rosemary extract, International Journal of Food Science and Technology, 49, 768–775.
- Senanayake, N., 2013. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review, Journal of Functional Foods, 5, 1529-1541.
- Skrede, G., Bryhn L.V., Aaby, K., Skivik Jorgensen, A. ve Birkeland, S.E., 2004. Antioxidative properties of commercial fruit preparations and stability of bilberry and black currant extracts in milk products, Journal of Food Science, 69, 351-356.
- Slinkard K. ve Singleton V. L., 1977. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manuel Methods, Am. J. Enol. Viticult, 28, 49-55.
- Tamano, S., Fukushima, S., Shirai, T., Hirose, M., Ito, N., 1987. Cancer Lett., 35, 3946.
- Tsuda, H., Sakata, T., Shirai, T., Kurata, Y., Tamano, S. ve Ito, N., 1984. Modification of N-methyl-N-nitrosourea initiated carcinogenesis in the rat by subsequent treatment with antioxidants, phenobarbital and ethinyl estradiol, Cancer Lett., 24, 19-27.
- Yagi, K., 1987. Lipid peroxides and human diseases, Chem. Phys. Lipids, 45, 337-341.

ÖZGEÇMİŞ

Uğur KARDİL, 1989 yılında Sürmene’de doğdu. Trabzon Mareşal Fevzi Çakmak İlköğretim Okulu’ nu bitirdikten sonra, lise öğrenimini Pelitli Ahmet Can Bali Lisesi’nde tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne kayıt yaptırdı. Bir yıl İngilizce hazırlık alıp, 2013 yılında bu bölümden Kimyager ünvanıyla mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’ nda Yüksek Lisans Programına başladı. 2015 yılında katılmış olduğu 27. Ulusal Kimya Kongresinde sunmuş olduğu bildiriyle bir sonraki ulusal kimya kongresine ücretsiz katılma hakkı kazandı. 2015-2016 eğitim öğretim yılında lisansüstü öğrenci olarak Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde biyokimya laboratuvarında kısmi zamanlı olarak araştırma görevlisi statüsünde görev yaptı. Yabancı dili İngilizce’ dir ve halen eğitimine devam etmektedir.