

**DEFNE AGACI (*Laurus nobilis* L.)
MEYVELERİNİN ANTIOKSIDAN
AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ**

**Ufuk YILMAZ
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Ocak - 2005**

JÜRI VE ENSTITÜ ONAYI

Ufuk YILMAZ'in "Defne Ağacı (*Laurus nobilis* L.) Meyvelerinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi" başlıklı Kimya Mühendisliği, Yüksek Lisans tezitarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adi-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danismanı) : Yard. Doç. Dr. Berrin BOZAN

Üye : Doç. Dr. Tuncay DÖGEROĞLU

Üye : Yard. Doç. Dr. Nezihe AZCAN

Anadolu Üniversitesi Fen / Sağlık Bilimleri Yönetim Kurulunun
..... tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

A n n e m e

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DEFNE AGACI (*Laurus nobilis* L.) MEYVELERİNİN ANTIOKSIDAN AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

UFUK YILMAZ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Mühendisliği
Anabilim Dalı

Danışman : Yard. Doç. Dr. Berrin BOZAN

2005, 77 sayfa

Bu çalışmada defne meyvelerinin kabuk ve meyve içi kısımlarından su, etilasetat, etanol/su ve aseton/su gibi çeşitli çözücü/çözücü karışımları ile antioksidan maddelerce zengin ekstraktlar elde edilmiş ve antioksidan kapasiteleri Ransimat, beta-karoten-linoleik asit model sistemi ve DPPH radikali ile serbest radikal süpürücü aktivite testleri ile belirlenmiştir. Aktif ekstraktların toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu uv-vis spektrofotometrik metot ile tayin edilmiş, fenolik asit ve Flavonoit grupları ise YBSK-DAD analizleri ile belirlenmiştir.

Kullanılan antioksidan aktivite test yöntemlerine göre tüm ekstraktlar antioksidan aktivite göstermiş olmalarına rağmen, Sınnamik asit türevlerince zengin meyve içi ekstraktlarının lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkilerinin, sentetik antioksidan olarak test edilen BHT ile kıyaslanabilir derecede olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Defne, *Laurus nobilis*, doğal antioksidanlar, antioksidan aktivite, lipid peroksidasyonu, polifenol, YBSK

ABSTRACT**Master of Science Thesis****INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LAUREL
BERRIES (*Laurus nobilis* L.)****UFUK YILMAZ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemical Engineering Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. Berrin BOZAN****2005, 77 pages**

Antioxidant rich fractions were extracted from laurel berry (*Laurus nobilis* L.) pericarps and seeds using various solvent and solvent mixtures such as, water, ethyl acetate, ethanol:water and acetone:water. The antioxidant activity of extracts was evaluated using Rancimat, beta-caroten-linoleate model system and free radical scavenging method on DPPH free radical. Total phenolic compounds of extracts were determined by Folin-Ciocalteu method. Phenolic component groups such as phenolic acids and flavonoids in the extracts possessed high antioxidant activity were identified by HPLC-DAD.

Although the extracts obtained from both pericarp and seeds of berries showed activity on tested antioxidant methods, seed extracts rich in cinnamic acid derivatives were found to be significantly active on the inhibition of lipid peroxidation.

Keywords: Laurel berry, *Laurus nobilis*, natural antioxidants, antioxidant activity, lipid peroxidation, polyphenols, HPLC

TESEKKÜR

Tez çalışmalarında ilgi, anlayış ve desteğini esirgemeyen ve gerekli çalışma ortamını sağlayan değerli danışman hocam Yard. Doç. Dr. Berrin BOZAN'a,

Çalışmalarımın Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BIBAM)'de yürütülmesine olanak sağlayan Merkez Müdürü Prof. Dr. Mustafa SENYEL'e,

Tez çalışmalarını sırasında değerli yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Nilgün ÖZTÜRK'e,

Çalışmalarım sırasında her türlü yardımlarından ötürü BIBAM çalışanlarına,

Varlığı ile bana güç veren kızım Sila'ya,
Destegini hep yanında hissettiğim anneme
En içten teşekkürlerimi sunarım.

Ufuk YILMAZ

Ocak, 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TESEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. DEFNE (<i>Laurus nobilis</i> L.) AGACI	3
2.1. Defnenin Botanik Özellikleri ve Yayılışı	3
2.2. Defnenin Kullanım Alanları.....	3
2.2.1. Tıpta kullanımı.	3
2.2.2. Diğer alanlarda kullanımı	4
2.3. Defnenin Kimyasal Özellikleri ve Bilesimi	4
2.3.1. Defne yaprağı uçucu yağın bileşimi.....	5
2.3.2. Defne meyvesinin sabit yağ bileşimi	6
2.3.3. Defne meyvesi uçucu yağın bileşimi	7
3. OTOOKSİDASYON VE ANTIOKSİDANLAR	9
3.1. Otooksidasyon ve Lipid Oksidasyon Mekanizması.....	9
3.2. Otooksidasyonun Engellenmesi ve Antioksidanların Etki Mekanizması	11
3.3. Antioksidanlar.	12
3.3.1. İnsan metabolizmasındaki oksidatif stres ve antioksidanların rolü	13
3.3. Antioksidanların Sınıflandırılması.....	14
3.4.1. Sentetik antioksidanlar.....	14
3.4.1.1. Bütillenmiş hidroksi anisol.....	14
3.4.1.2. Bütillenmiş hidroksi toluen.....	15
3.4.1.3. Propil gallat	16

3.4.1.4. Tersiyer bütüldrokinon.....	17
3.4.2. Doğal antioksidanlar	18
3.4.2.1. Tokoferoller.....	19
3.4.2.2. Askorbik asit ve tuzları	20
3.4.2.3. Karoten.....	21
3.5. Fenolik Antioksidanlar	22
3.5.1. Fenolik Asitler.....	23
3.5.2. Flavonoidler (Flavan türleri)	24
3.5.2.1. Flavon ve flavonoller	25
3.5.2.2. Flavanonlar.....	26
3.5.2.3. Katesin ve lökosiyanidinler	26
3.5.2.4. Antosiyanidinler.....	27
3.5.2.5. Proantosiyanidinler.....	28
3.6. İdeal Antioksidanların Özellikleri.....	28
3.7. Gıda Antioksidanları	29
3.8. Antioksidan Aktivite Tayin Metotları.....	31
3.8.1. Yağların peroksidasyonu inhibisyonuna dayalı metotlar.....	31
3.8.1.1. Peroksit sayısı.....	31
3.8.1.2. Aktif oksijen yöntemi.....	32
3.8.1.3. Schaal fırın testi.....	33
3.8.1.4. Oksijen absorpsiyon yöntemi	33
3.8.1.5. Tiyobarbitürik asit testi	34
3.8.1.6. Ransimat metodu.....	34
3.8.2. Serbest radikal süpürücü aktivite tayin yöntemleri	35
3.8.2.1. DPPH radikali süpürücü aktivite testi.....	35
3.8.2.2. TRAP testi.....	36
3.8.2.3. FRAP testi.....	36
3.8.2.4. Süperoksit anyon süpürücü	37
3.9. Antioksidanların Besinlerde Kullanım Alanları.....	37
3.9.1. Hayvansal yağlar.....	37
3.9.2. Bitkisel yağlar	38
3.9.3. Yüksek oranda kati yağ içeren ürünler.....	39

3.9.4. Düşük oranda kati yağ içeren besin ürünleri.....	39
3.9.5. Sekerlemeler	40
3.9.6. Et ve et ürünleri.....	40
3.9.7. Balık ve balık ürünleri.....	40
3.9.8. Uçucu yağlar	41
3.9.9. Çiklet hamuru.....	41
4. DENEYSEL ÇALIŞMA	42
4.1. Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	43
4.2. Ekstraksiyon İşlemi için Defne Meyvelerinin Hazırlanması	43
4.3. Boyut Küçültme ve Nem Tayini	44
4.4. Sabit Yağ Ekstraksiyonu	44
4.5. Polifenollerin Ekstraksiyonu.....	45
4.5.1. Soxhlet ekstraksiyonu	45
4.5.2. Oda sıcaklığında karıstırmalı ekstraksiyon.....	45
4.5.3. 40 ⁰ C sıcaklıkta karıstırmalı ekstraksiyon.....	46
4.6. Polifenol Ekstrelerinin Fraksiyonlanması.....	46
4.6.1. Sivi-sivi ekstraksiyonu ile fraksiyonlarına ayırma.....	46
4.6.2. Sefadeks kolonda fraksiyonlarına ayırma.....	46
4.6.3. Hidroliz.....	47
4.6.3.1. Asit hidrolizi.....	47
4.6.3.2. Alkali hidrolizi	48
4.7. Defne Yağının Karakterizasyonu.....	48
4.7.1. Yağ asitlerinin esterleştirilmesi.....	48
4.7.2. Yağ asitlerinin gaz kromatografisinde analizi.....	48
4.8. Toplam Fenol Miktar Tayini	49
4.9. Fenolik Bileşiklerin Yüksek Basıncılı Sivi Kromatografisi Analizi.....	49
4.10. Antioksidan Aktivite Tayinleri.....	50
4.10.1. Ransimat yöntemi.....	50
4.10.2. Serbest radikal süpürücü etki yöntemi.....	50
4.10.3. Beta karoten- linoleik asit model sistemi.....	51

5. DENEYSEL BULGULAR	52
5.1. Boyut Küçültme ve Nem Tayini	52
5.2. Sabit Yağ Ekstraksiyonu	52
5.3. Polifenollerin Ekstraksiyonu.....	53
5.4. Sivi-Sivi Ekstraksiyonu ile Fraksiyonlarına Ayırma.....	53
5.4.1. Sefadeks kolonda fraksiyonlarına ayırma	54
5.4.2. Polifenollerin hidrolizi	55
5.5. Defne Meyvesi Sabit Yağı Ekstraksiyonu	56
5.6. Toplam Fenol Miktar Tayini	56
5.7. Defne Meyvesinde Antioksidan Aktivite Tayinleri	59
5.7.1. Ransimat yöntemi.....	59
5.7.2. Serbest radikal süpürücü etki yöntemi.....	61
5.7.3. Beta karoten- linoleik asit model sistemi.....	62
5.7.4. Yüksek basınçlı sivi kromatografisi analizi	64
6- SONUÇ VE TARTISMA	70
KAYNAKLAR	74

SEKILLER DIZINI

3.1. Bütillenmiş hidroksi anisol	15
3.2. Bütillenmiş hidroksi toluen	16
3.3. Propil gallat	16
3.4. Tersiyer bütihidrokinon	17
3.5. Doğada bulunan tokoferol türevlerinin kimyasal yapıları	19
3.6. Askorbik asit (Vitamin C).....	21
3.7. Beta karoten	22
3.8. Benzoik asit türevleri	23
3.9. Sinamik asit türevleri.....	24
3.10. Flavonon ve flavonol kimyasal yapısı.....	25
3.11. Flavanon kimyasal yapısı.....	26
3.12. Katesinin kimyasal yapısı	26
3.13. Löykoantosiyanidinhidrat kimyasal yapısı.....	27
3.14. Besinlerde bulunan baslıca antosiyanidinlerin yapıları	29
5.1. Kabuk ekstresinin 280, 360 ve 520 nm lerde Sefadeks kolondan alınan fraksiyon-absorbans eğrisi	54
5.2. Meyve içi ekstresinin 280, 360 ve 520 nm lerde Sefadeks kolondan alınan fraksiyon-absorbans eğrisi.....	55
5.3. Gallik asit konsantrasyon-absorbans kalibrasyon doğrusu	57
5.4. Defne meyvesi kabuğu ve meyve içi %80 etanollü ekstralarının sefadeks kolonda elde edilen fraksiyonlarında toplam fenol miktarı	59
5.5. Defne meyvesi kabuğundan elde edilen ekstre ve fraksiyonların DPPH üzerinde serbest radikal süpürücü etkileri	61
5.6. Defne meyvesi, meyve içinden elde edilen ekstre ve fraksiyonların DPPH üzerinde serbest radikal süpürücü etkileri.....	62
5.7. Defne meyvesi, kabuktan elde edilen ekstralarının beta-karoten linoleik model sistemi üzerindeki inhibe edici etkileri.....	63
5.8. Defne meyvesi, meyve içinden elde edilen ekstralarının beta-karoten linoleik model sistemi üzerindeki inhibe edici etkileri.....	63

5.9. Defne meyvesi, meyve içinden elde edilen %80 etanollü ekstralarının sefadeks kolonda elde edilen beta-karoten linoleik model sistemi üzerindeki inhibe edici etkileri	64
5.10. Defne meyvesi kabuk etanol ekstresi YBSK kromatogrami	66
5.11. Defne meyvesi meyve içi etanol ekstresi YBSK kromatogrami	67
5.12. Defne meyvesi tüm meyve etil asetat ekstresi YBSK kromatogrami.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

2.1. Su ve buhar distilasyonu ile elde edilen defne yaprak uçucu yağının bileşimi.....	5
2.2. Hatay defne meyvesi bileşimi	6
2.3. Hatay ve Silifke yöresi defne meyvesi yağ asitleri bileşimi	7
2.4. Defne meyvesi uçucu yağı bileşimi (su distilasyonu)	8
3.1. Lipid oksidasyonu inhibe edici madde/madde grupları	12
3.2. Oksidasyonu inhibe edici madde/madde grupları	12
3.3. Sentetik antioksidanlar ve özellikleri.....	14
5.1. Kabuk, meyve içi ve tüm meyvenin ortalama tanecik boyutları.....	52
5.2. Kabuk, meyve içi ve tüm meyvenin % nem miktarları	52
5.3. Kabuk, meyve içi ve tüm meyve sabit yağ verimleri.....	53
5.4. Çözücü ve ekstraksiyon yönteminin polifenol ekstra verimine etkisi	53
5.5. Toplam ekstrenin sulu ve etil asetat fraksiyonlarındaki yüzdeleri.....	54
5.6. Kabuk ve meyve içi ekstralarının Sefadeks kolonda fraksiyonlanması sonucu birleştirilen örnekler ve fraksiyon numaraları.....	55
5.7. Kabuk ve meyve içi örneklerinin hidroliz verimleri.....	56
5.8. Defne meyvesi sabit yağı bileşimi	56
5.9. Defne meyvesi kabuğu ve meyve içi ekstre ve fraksiyonlarında toplam fenol miktarı	58
5.10. Defne meyvesinden elde edilen ekstraların ve sentetik antioksidanların %0,02 ve %1 konsantrasyonlarında Ransimat yöntemi kullanılarak zeytin yağının oksidasyonunu inhibe edici aktivitesi.....	60
5.11. Standart fenolik bileşenlerin YBSK-DAD analizi sonucu elde edilen piklerin alikonma değerleri ve maksimum absorbanları	65
5.12. Kabuk etanol ekstresinin YBSK analizi sonucu içermiş olduğu fenolik bileşen grupları.....	69

SIMGELER VE KISALTMALAR DIZINI

Simge

AO	Aktif oksijen
AOM	Aktif oksijen yöntemi
BA	Benzoik asit
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluen
DAD	Diode array dedektörü
DPPH	2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil radikali
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EtOAc	Etil asetat
EtOH	Etil alkol
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
Fl	Flavonoit
FRAP	Antioksidan demir indirgeme gücü
FID	Alev iyonizasyon dedektörü
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sistemi
I.I.	Bozunma indisi
GAE	Gallik asit esdegeri
MeOH	Metil alkol
PG	Propil gallat
RCS	Reaktif klor içerikli maddeler
RNS	Reaktif azot maddeleri
ROS	Reaktif oksijen maddeleri
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBHQ	Tersiyer bütül hidro kinon
tR	Alikonma zamanı
TRAP	Toplam radikal yakalama kapasitesi
YBSK	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sistemi

1. GIRIS VE AMAÇ

Yasamin önemli çeliskilerinden biri de oksijen molekülüdür. Aerobik yasami temin eden oksijen, hem solunum için mutlak gerekli element olarak bilinmekte, hem de bir çok hastalik ve dejeneratif kosulun sebebi olarak görölmektedir. Paslanan metal malzemeler, soyulmus elmanın kararmasi dogada oksidatif bozunmanın en izlenir seklidir. Oysa insan metabolizmasındaki bozunma böylesine görölür degildir. Yasam için vazgeçilmez olan oksijen bulunduğu ortamdaki diğer moleküllele reaksiyona girerek bu moleküllelerin yapılarının bozulmasına neden olur. Canlı organizmanın kendi yapısında bulunan ve Reaktif oksijen denilen bu oksijen türleri canlı organizmaya gerekli enerjiyi sağlarken kullanılmayan fazla kısmi ise organizmaya zarar vermektedir. Sigara, stres, toksinler ve ultraviyole isinlari gibi zararlı dış etkenlerin de devreye girmesiyle bu oksijen türleri insan vücudunda daha zararlı hale gelirler. Günümüzde tedavisi zor olan kanser gibi bir çok hastalığın nedeni bu moleküllelerin organizmadaki DNA, lipit, protein ve karbonhidrat yapılarının bozulmasına yol açmasıdır.

Reaktif oksijen molekülleleri yalnızca organizmanın yapısını bozmakla kalmayıp aynı zamanda besinlerin bozulmasına da yol açmaktadır. Özellikle besinlerin içinde bulunan yağların bozunmasını sağlayarak besinlerde istenmeyen kimyasal ve fiziksel değisikliklere neden olurlar. Bu nedenle piyasada üretimi yapılan besinlerin bozunmalarını önlemek amacıyla antioksidan adı verilen koruyucu katkı maddelerinin kullanılmasına yer verilmistir.

Antioksidanlar yiyeceklerde veya vücutta bulunan, oksitlenebilir maddelere oranla daha düşük konsantrasyonda olan ve bu maddelerin oksidasyonunu önleyen veya yok eden maddelerdir. Sentetik ve doğal olarak iki grupta toplanir. Antioksidanların kullanımı yokluklarında sağlığa zarar verici oksidasyon ürünlerinin vücutta toplanmasına neden olacağı için gereklidir. Gıdaları korumasının yani sıra vücuttaki antioksidanlar ateroskleroz, kanser ve diğer dejenere edici bir çok hastalığa ve yaşlanmaya karşı mücadele edilmesine yardımcı olurlar. Genelde bağışıklık sistemini olumlu yönde etkilerler.

Antioksidanlar oksitlenebilir maddelerin oksidasyonunu önlediği için gıda üreticileri tarafından ürünlerin besin değerlerini korumak ve bozunmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Aynı zamanda bu özelliklerinden dolayı biyokimyacıların ve diğer sağlık uzmanlarının da dikkatini çekmektedir. Çünkü antioksidanlar vücudu reaktif oksijen maddelerine (ROS), reaktif azot maddelerine (RNS) ve reaktif klor içerikli maddelere (RCS) karşı korurlar.

Piyasada gıda ürünlerinde en çok kullanılan sentetik antioksidanlar Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), propil gallat (PG) ve tersiyer bütildihidrokinon (TBHQ)'dur. Basta Amerika olmak üzere bir çok ülkede sentetik antioksidanların kullanılması onaylandığı halde Japonya ve bazı Avrupa ülkelerinde olası kanser yapıcı etkilerinden dolayı kullanılmasına izin verilmemiştir. Bu nedenle sentetik antioksidanların doğal olanlarla yer değiştirilmesi konusunda genel bir kani olmuştur.

Bitkiler doğal antioksidan bileşiklerin başlıca kaynağını oluşturmaktadır. Meyve ve sebzeler, baharatlar, bitkisel çaylar ve yağlı tohumların içermiş oldukları antioksidan bileşikler pek çok çalışmaya konu olmuş ve antioksidan etkilerinin de fenolik bileşiklerden ve özellikle de flavonoid yapısından kaynaklandığı gösterilmiştir (Shadidi, 2000).

Anavatanı Anadolu ve Akdeniz ülkeleri olan defne ülkemiz açısından önemli bir değere sahip bitkisel ürünlerimizden birisidir. Özellikle yapraklarından uçucu yağ elde edilmesinde yararlanılmakta, meyvelerinden elde edilen sabit yağ basta sabun olmak üzere çeşitli kozmetik ürünlerin bileşimlerine girmektedir.

Defne meyvelerini sadece sabit ve uçucu yağ elde etmek için değerlendirmenin yanı sıra, doğal antioksidan kaynağı olarak da değerlendirilebilme olanaklarının araştırılması bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Bu amaca yönelik olarak defne ağacı meyvelerinin (kabuk ve meyve içi) polifenolik bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu inhibe edici ve serbest radikal süpürücü etkileri araştırılmış ve içermiş oldukları toplam fenol ve fenolik bileşik grupları belirlenmiştir.

2. DEFNE (*Laurus nobilis* L.) AGACI

2.1. Defnenin Botanik Özellikleri ve Yayılışı

Botanik adı *Laurus nobilis* L. olan defne Akdeniz kökenli, her zaman yeşil, 3-8 m boylu, sarı-beyaz çiçekli, küçük ve oval şekilde siyah renkli meyveli, Dicotylediane sınıfının Ranales takımındaki Laureaceae familyasına dahil olan bir ağaçtır (Baytop, 1994).

Defne ağacının ana vatanı Anadolu ve Akdeniz ülkeleridir. Ayrıca İngiltere, Hindistan, Japonya, Orta Amerika ülkeleri ve Rusya'da doğal olarak yetiştiği ve kültüre alındığı bilinmektedir (Pruthi, 1976; Grieve, 1982).

Türkiye'de Karadeniz bölgesi, Marmara Bölgesi, Ege Bölgesi kıyı serisinde deniz seviyesinden 1200m yüksekliklere kadar küçük gruplar halinde yetişmektedir (Davis, 1984). Genelde yabancı olarak yetişir. Alt türleri ve çeşitleri de bulunmaktadır. İngilizce Laurel, Bay Laurel veya Sweet Bay adı ile, Fransızca Laurier ve Almanca'da Lorbeer olarak bilinmektedir. Yaprakları baharat olarak kullanılır. Yaprakları 2-5 cm eninde ve 5-10 cm boyunda, sert, derimsi, kısa saplı, tüysüz, parlak, kenarları dalgali, koyu yeşil veya sarımsı yeşil renktedir. Tadı acı olmasına rağmen hafif tatlımsidir. Taze yaprak daha aromalıdır (Baytop, 1984).

2.2. Defnenin Kullanım Alanları

2.2.1. Tipta kullanımı

Literatürde defne meyvesi ve yaprağının birçok tıbbi özelliği olduğuna değinilmektedir. Hazmi kolaylaştırıcı, diüretik, kusturucu, adet sökücü, narkotik, stimulan, mideyi, terletici etkili olduğu kabul edilmektedir. Halk arasında histeri, apse, skleroz, spazm ve iyi huylu cilt tümörlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Meyveden hazırlanan preparatların uterus fibroma ve skleromasında, karaciğer fibroma ve sertliklerine, eklem tutulmalarına, göz tümörlerine ve sitmaya iyi geldiği bilinmektedir. Ham meyveler abortus (düşük) oluşturmak için kullanılmaktadır. Meyve sabit yağı eklem tutulması, burkulma ve çıkıklarda

haricen kullanılmaktadır. Veterinerlikte de kullanılmaktadır. Defne meyvesi sabit yağından en fazla sabun yapımında faydalanılmaktadır (Baytop, 1984).

Defne meyvesi sabit

Defne meyvesi sabit yağı, kepege ve doğal saç dökülmesine karşı geliştirilen saç losyonlarının, sedef hastalığı, cilt dökülmesi, egzama için haricen kullanılan ilaçların ve deodorantların bileşimlerinde kullanılmaktadır (Mina, 1969).

2.2.2. Diğer alanlarda kullanımı

Defnenin kullanımının M.Ö. ki yıllara kadar uzandığı, M.Ö. 342 yılına ait altın Roma paralarında defne yaprağı figürlerine rastlanmasından anlaşılmaktadır. Günümüzde kurutulmuş defne yapraklarından özellikle Fransız mutfığında, et, balık, kümes hayvanları, sebzeler ve çorbalarda baharat olarak kullanılır. Kuru yapraklar, meyhan bali çubuklarının ve kuru incirlerin paketlenmesi sırasında kullanılmakla birlikte çay olarak da kullanıldığı bilinmektedir (Grieve, 1982). Defne meyvelerinden elde edilen aromatik sabit yağ belirli miktarda sabun yapımında, veterinerlikte, eczacılıkta ve parfümeride kullanılmaktadır. Yapraklardan distilasyonla elde edilen uçucu yağ unlu gıdalarda, sekerlemelerde, et ürünlerinde, soslar ve kuru çorbalarda lezzet verici olarak kullanılır. Parfümeride yaprak yağı, taze ve kafurlu kokular ve lavanta ile uyum sağlar. Aldehidik kokular ve hava tazeleyicilerinin yapımında kullanılır. Meyve uçucu yağı da hasere kovucu ve baharat yağı olarak kullanılmakla birlikte, parfümeride, çam ve amber bazlı kokularda iyileştirici olarak kullanılmaktadır (Pruthi, 1976).

Deniz ürünlerinin sahip olduğu hoş olmayan balık kokusunun giderilmesinde de diğer baharatlarla birlikte defne yaprağının da kullanıldığı çeşitli gıda katkılarının, uçucu asitlerden kaynaklanan balık kokusunu bastırdıkları belirlenmiştir. Bazı çorbalarda pisme sırasında defne yaprağı katılarak istenmeyen kokular giderilir. Yemeklik yağlarda istenmeyen lezzet ve kokuların bastırılmasında da kullanılmaktadır. Tuvaletler ve kapalı mekanlarda istenmeyen

kokuların giderilmesinde kullanılan çeşitli preparatlarda da defne uçucu yağı yada ekstresi kullanılmaktadır (Hidenori, 1989).

2.3. Defnenin Kimyasal Özellikleri ve Bilesimi

2.3.1. Defne yaprağı uçucu yağın bileşimi

Rusya’da yaprakların olgunlaşması süresince yağ kalitesinin gözlemlendiği bir çalışmada (Odete, 1989), defne ana bileşeni olan 1,8-sineol’ün kesin toplanan yapraklarda en yüksek değere ulaştığı gösterilmiştir. Sonbaharda toplanan yapraklarda terpen glikozitlerinin en yüksek değere ulaştığı ve yağın kalitesinin olumsuz yönde etkilendiği gözlemlenmiştir. Yüksek sineol’lü ve yüksek kaliteli uçucu yağ elde edilmesinde yaprak hasadının kesin mevsiminde yapılması önerilmiştir.

Tanriverdi vd. (1992) Silifke yöresi defne yaprağından su ve buhar distilasyonu yöntemiyle elde ettikleri yağın bileşiminde 33 maddenin varlığını belirlemişlerdir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Su ve buhar distilasyonu ile elde edilen defne yaprak uçucu yağın bileşimi (%) (Tanriverdi vd., 1992)

Bileşen	Su	Buhar	Bileşen	Su	Buhar
α -pinen	3,14	5,79	cis-sabinen hidrat	0,34	0,23
kamfen	0,23	0,24	linalol	0,05	0,11
β -pinen	2,62	4,19	linalil asetat	0,14	0,24
sabinen	2,58	8,32	bornil asetat	0,12	0,12
mirsen	0,02	0,27	terpinen-4-ol	3,11	1,83
α -terpinen	0,42	0,59	β -karyofillen	-	0,03
limonen	0,62	0,88	mirtenal	1,14	0,75
1,8-sineol	62,64	58,54	sabinol	0,38	0,18
?-terpinen	0,73	1,10	trans-pino karveol	1,64	1,36
trans- β -osimen	0,01	0,01	α -terpineol+ a-terpinil asetat	5,57	6,40
p-simen	1,87	1,37	cis-karvil asetat	0,14	-
α -terpinolen	0,21	0,24	karvon	0,45	0,12
6-metil-5-heptan-2-one	0,02	0,12	mirtenol	0,54	0,34
cis-3-hekzen-1-ol	0,04	0,02	p-simen-8-ol	0,14	0,03
trans-sabinen hidrat	0,36	0,34	metil öjenol	0,35	0,13
α -kopaen	0,08	0,03	kumin alkol	0,26	0,06
öjenol	0,30	0,16			

2.3.2. Defne meyvesinin sabit yağ bileşimi

Defne meyvesinin sabit yağı oda sıcaklığında yarı kati, yeşil renkli ve acı lezzette, 32-36°C de eriyen bir yağdır (Baytop, 1984). Defne meyvesinin kaba bileşen analizi Çizelge 2.2’de verilmektedir (Yazıcıoğlu ve Karaali, 1983).

Ünal ve arkadaşları (1986), İzmir yöresi defne meyvelerinin %24,2 sabit yağ içerdiğini, elde edilen yağın %19,8 laurik asit, %12,3 palmitik asit, %35,4 oleik asit, %32,6 linoleik asit tasidığını belirlemişlerdir.

Çizelge 2.2. Hatay defne meyvesi bileşimi (Yazıcıoğlu ve Karaali, 1983)

Bileşen (%)	Tüm Meyve	Meyve İçi	Kabuk
Su	28,1	32,1	15,7
Yağ	36,5	55,6	9,9
Protein	4,6	3,6	4,2
Azotsuz Ekstre	52,8	23,7	42,2
Ham Lifler	4,5	14,1	38,6
Kül	1,5	3,0	5,0

Defne meyvesi perikarp, mezokarp ve endokarpından sadece endokarpın laurik asit tasidığı, yüksek kaynama noktali trigliseritlerin ise sadece perikarp ve mezokarpta görüldüğü belirtilmektedir. Perikarp ve mezokarpın yağ miktarı %53, endokarpdaki yağ miktarı yaklaşık %26 olarak bulunmuştur. Posa %4 ham protein içermektedir ve hayvan yemi olarak kullanılmaya uygun değildir (Duke, 1987).

Meyve ağırlığının %30’unun perikarptan, %70’inin çekirdekten oluştuğu, meyvenin %20-34 sabit yağ içerdiği ve yağın %30-35 laurik asit, %10-11 palmitik asit, %33-40 oleik asit ve %18-32 linoleik asit içerdiği belirtilmiştir (Duke, 1987; Pruthi, 1976). Riaz ve Ashraf (1987) defne meyvesi perikarpında %1 laurik asit, %19,3 palmitik asit, %56,5 oleik asit, %21 linoleik asit, %2,5 linolenik asit, çekirdeğinde ise %45,1 laurik, %3,8 palmitik asit, %28,0 oleik asit, %29,1 linolenik asit bulunduğunu belirtmektedirler.

Bir başka çalışmada ise perikarpın %24-55 arasında yağ içerdiği ve palmitik asitin %19,24, laurik asitin %0-2,7, oleik asitin %56-63 ve linoleik asitin

%14-22 arasında değistiği ve linolenik asitin %2,5 oranında bulunduğu belirlenmiştir (Duke, 1987).

Tanriverdi (1989), Hatay ve Silifke yöresi defne meyvesi sabit yağları ve yörede üretilen defne meyve yağlarının yağ asitleri bileşimini belirlediği kapsamlı çalışmada, bütün meyve, perikarp ve çekirdek sabit yağları ve geleneksel yöntemle elde edilen defne yağlarının (gar) yağ asitleri bileşimini belirlemiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Hatay ve Silifke yöresi defne meyvesi yağ asitleri bileşimi (Tanriverdi, 1989)

Bileşenler	Silifke			Hatay			Gar Yağı	
	Meyve	Perikarp	Çekirdek	Meyve	Perikarp	Çekirdek	Silifke	Hatay
laurik asit	17,81	0,48	63,27	17,93	0,14	44,96	23,10	17,78
miristik asit	0,53	0,10	1,69	1,24	-	1,49	0,68	0,64
palmitik asit	18,51	24,34	5,23	16,02	21,25	6,65	15,09	18,87
palmitoleik asit	0,55	0,89	-	0,43	0,65	-	0,48	0,55
stearik asit	1,12	1,61	0,70	1,61	1,63	1,98	1,14	1,44
oleik asit	35,66	44,13	12,03	34,19	43,66	21,77	38,43	34,80
bilinmeyen	1,66	2,10	-	1,27	1,90	-	1,60	1,59
linoleik asit	23,41	25,19	16,96	25,99	29,40	23,16	18,80	23,30
linolenik asit	0,80	1,16	-	0,77	1,37	-	0,70	0,90
Doymus yağ asitleri	37,97	26,53	70,89	36,80	23,02	55,08	40,01	38,73
Doymamıs yağ asitleri	60,42	71,37	28,99	61,38	75,08	44,93	58,41	59,55

2.3.3. Defne meyvesi uçucu yağının bileşimi

Tanriverdi, vd. (1992), defne meyvesi uçucu yağının %7,2 α -pinen, %3,6 sabinen, %4,9 α -fellandren, %41,7 1,8-sineol, %7,89 terpinen-4-ol, %6,1 α -terpineol+ α -terpinil asetat içerdiğini tespit etmişlerdir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Defne meyvesi uçucu yağı bileşimi (su distilasyonu) (Tanrıverdi, vd., 1992)

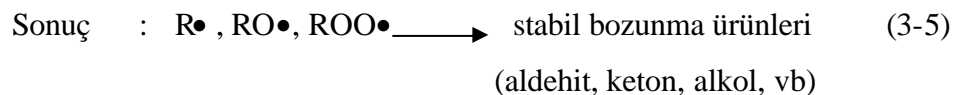
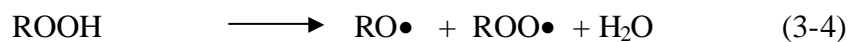
Bilesenler	%	Bilesenler	%
α -pinen	7,21	β -kubeben	0,09
Kamfen	0,53	Linalol	0,22
Hekzenal	0,08	bornil asetat	0,33
β -pinen	3,95	terpinen-4-ol	7,89
Sabinen	3,65	β -karyofillen	1,96
Mirsen	0,03	dihidrokarvil asetat	0,44
α -fellandren	4,92	α -terpineol+ α -terpinil asetat	6,10
α -terpinen	0,19	germakren-D	1,19
Limonen	1,39	δ -kadinen+ γ -kadinen	1,61
1,8-sineol	41,70	mirtenol	0,06
cis- β -osimen	0,07	nerol	0,03
γ -terpinen	0,26	2,4-dekadienal (E,E)	0,11
trans- β -osimen	1,79	trans-karveol	0,23
p-simen	2,08	p-simen-8-ol	0,21
α -terpinolen	0,13	etil laurat	0,20
cis-2-heptenal	0,10	paçulan	0,30
6-metil-5-heptan-2-one	0,16	p-menta-1,4-dien-7-ol	0,05
oktenil asetat	0,02	elamol	0,09
cis-linalol oksit	0,08	spatulenol	0,12
α -kubeben	0,04	β -ödesmol	0,17
oktil asetat	0,04	etilpalmitat	0,23
α -kopaen	0,19		

3. OTOOKSIDASYON ve ANTIOKSIDANLAR

3.1. Otoksidasyon ve Lipid Oksidasyon Mekanizması

Yağlar ve yağ içeren besinler havadaki oksijenin etkisi ile oksidasyona uğramaktadırlar. Oksijen, besinlerin yağ, karbonhidrat ve proteinlerine etki ederek, az ya da çok kalitelerinde azalmalara neden olmaktadır. Besin bileşenleri ile hava oksijeni arasında meydana gelen tepkimelere otooksidasyon denir (Çakmakçı ve Çelik, 1998). Bu olay başlangıç, çoğalma ve sonuç aşamalarından oluşmaktadır. Başlangıç aşamasında serbest radikallerin oluşması için gerekli aktivasyon; ısı, ışık veya kimyasal enerji ile sağlanmaktadır. Bu aşamada doymamış lipid molekülü (RH), hidrojen ayrılması yolu ile serbest radikal (R•) haline dönüşmektedir (Altug, 2001 ve Keskin, 1975). Çoğalma aşamasında oluşan radikal oksijen ile çok çabuk reaksiyona girer. Bu reaksiyon difüzyon ile kontrol edilmektedir. Oluşan peroksi radikal (ROO•) doymamış lipid molekülünden (RH) hidrojeni alır. Bu olay yeni lipid radikallerinin (R•) oluşmasına ve zincir reaksiyonunda aktivitenin devamını sağlar. Zincir reaksiyonunda oluşan hidroksi peroksitler (ROOH) tatsız ve kokusuzdur. Hidroperoksitler çok çabuk bozulup alkoksi radikallerini (RO•) oluştururlar. Bu radikaller de lipid molekülünden hidrojeni alırlar ve çoğalma basamağında yeni zincir reaksiyonunun başlamasına katkıda bulunurlar (Risch ve Ho, 1997). Sonuç basamağında tüm radikaller birbirleri ile bağlanıp radikal olmayan ürünler meydana getirirler.

Lipid oksidasyonunda meydana gelen reaksiyonlar:



- RH : Yag asidi esterleri
 R• : Yag asidi serbest radikalleri
 ROOH : Yag asidi hidroperoksitleri
 ROO• : Peroksit yapısındaki serbest radikaller (Larson, 1997).

Bilinen baslica serbest radikaller (Saldamli, 1998):

- 1- Su peroksit radikalleri (O₂•)
- 2- Hidroksil radikali (HO•)
- 3- Alkoksil radikali (RO•)
- 4- Peroksit radikali (ROO•)
- 5- Nitrikoksit radikali (NO•)

Doymamis yag asitlerinin oksidasyonu sirasinda meydana gelen ilk ürünler hidroperoksitlerdir. İkincil oksidasyon ürünleri karbonil ve karboksil bileşikleridir. Bu bileşikler gıdaların istenmeyen tat ve kokularının artmasına neden olurlar (Risch ve Ho, 1997).

Oksidasyona yol açan veya onu hizlandiran reaktiflerin basında oksijen gelir; ayrıca isik, sicaklik, demir ve bakir gibi metal iyonlari, bir takim pigmentler ve doymamislilik derecesi oksidasyonu hizlandirmaktadir (Köseoglu ve ark., 1996). Bu faktörler ortadan kalktiği taktirde oksidasyon önlenebilmektedir. Ancak pratikte bu mümkün olmamaktadır. Dolayisiyla, oksidasyonu disaridan herhangi bir madde katmadan önlemek çok zordur. Oksidasyonun fiziksel yöntemlerle önlenemedigi durumlarda antioksidanlar katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Çakmakçi ve Çelik, 1998).

Yag ve yag içeren besin maddelerinin oksidasyonu, yalnızca neden olduklari tat ve koku bozulmalari yönünden önem tasimaz. Bunun yanında oksidasyon sirasinda degisik tepkime ürünlerinin insan sagligi açısından tehlike olusturmasi söz konusudur.

Yaglarda olusan oksidatif tepkimeler, olusum sekil ve kosullarina bagli olarak, kimyasal veya enzimatik olabildigi gibi, otokatalitik, termik oksidasyon ya da bunlari karisimi seklinde de ortaya çikabilmektedir (Pekin, 1979).

3.2. Otooksidasyonun Engellenmesi ve Antioksidanların Etki Mekanizması

Fenolik OH grubu içeren tüm antioksidanlar, gıda maddelerinde aşağıda verilen tepkime eşitliklerine uygun olarak işlerler.



İlk üç tepkimeye göre antioksidanlar besinde oluşan radikallerle tepkimeye girerler ve fenoksi radikallerini oluşturlar ki bunlar stabil maddelerdir. Diğer taraftan bu antioksidanlar, son üç eşitlikte görüldüğü gibi, hidrojen verdiklerinde, oluşan kendi radikalleri vasıtasıyla ortamdaki alkoksi ve peroksit radikallerini de bağladıklarından, otooksidasyondaki zincir tepkimelerinin kırılmasını ve durmasını sağlarlar. Çünkü antioksidan radikalleri ile son üç tepkime sonucu oluşan ürünler de doymamış bileşenlere kıyasla daha stabil maddelerdir.

Bir antioksidan molekülü en çok iki radikalde oluşacak zincir tepkimesini bloke edebilmektedir. Ancak antioksidanlar yalnızca aktif radikal yakalamazlar, bunun yanında ortamda hidroksi ve hidroperoksitlerin oluşumunu da baskı altına alırlar (Saldamli, 1998).

Otooksidasyonu önleyebilmek için çeşitli inhibitör madde veya madde grubu kullanılabilir. Otooksidasyonu inhibe edici maddeler etki mekanizmasına göre Çizelge 3.1.'de sınıflandırılmıştır (Pokorny, 1991). Oksidasyonu inhibe edici doğal madde kaynakları ise Çizelge 3.2'de verilmiştir (Pokorny, 1991).

Çizelge 3.1. Lipid oksidasyonu inhibe edici madde/madde gruplari

Inhibitör	Etki Mekanizması
Antioksidanlar	Serbest radikallerle reaksiyona girerek zincir reaksiyonun çoğalma basamagini engeller
Sinerjistler	Antioksidan aktivitesini arttirir
Geciktiriciler	Serbest radikaller olusmaksizin hidroperoksitleri azaltirlar
Metal Süpürücüler	Serbest radikallerin olusumunu katalize eden agir metalleri engellerler
Tekli-oksijen tutucular	Serbest radikal reaksiyonunu baslatan tekli oksijeni deaktivite ederler

Çizelge 3.2. Oksidasyonu inhibe edici dogal madde kaynaklari

Kaynak	Oksidasyonu Inhibe Edici Dogal Madde/Madde Gruplari
Yaglar ve yagli tohumlar	Tokoferol ve tokotrienoller, susam, zeytin yagi reçinesi, fosfolipitler
Yulaf ve pirinç	Çesitli lignin türevleri
Meyve ve sebzeler	Askorbik asit, hidroksikarboksilik asitler, flavonoitler, karotenoidler
Bitki, baharat, çay ve kakao	Fenolik maddeler
Protein ve protein ürünleri	Amino asitler, dihidroksi pridinler, Meillard reaksiyonu hidrolizatları

3.3. Antioksidanlar

Besinlerde oksidatif bozunmayı önleme çalışmaları yaklaşık 70 yıl önce başlamıştır. Çeşitli doğal maddeler kullanılmış olsa da kısa süre sonra bu maddelerin yerini daha ucuz ve kolay elde edilen ve yüksek antioksidan etkilere sahip sentetik antioksidanlar almıştır. Gıda güvenlik yasalarının gündeme gelmesiyle gıdalarda kullanılan sentetik kimyasalların hayvanlar üzerindeki etkilerinin test edilmesi gerekmektedir. Bu işlem çok kompleks, zaman alıcı ve pahalı toksikolojik çalışmaları gerektirmiştir. Son otuz yıl içinde de gerek tüketiciler, gerekse yasa koyucular sentetik kimyasalların güvenliği deneylerle saptanmış olsa da doğal alternatifleri kadar güvenli olamayacağı ile ilgili endişeleri gündeme getirmiştir. Dolayısıyla üreticiler pahalı testleri gerektiren ve tüketici tarafından kullanılması şüphe ile bakılan sentetiklerin yerine doğal maddeleri tercih etmeye başlamıştır (Pokorny, 1991).

3.3.1. İnsan metabolizmasında oksidatif stres ve antioksidanların rolü

İnsan vücudunda oksijen kullanımındaki normal işlemler sırasında bazı etmenlerin tesviki ile; süperoksit ($O_2\bullet$), hidroksil ($OH\bullet$), peroksil ($ROO\bullet$), alkoksil ($RO\bullet$), nitrik oksit ($NO\cdot$) kökleri ile hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksinitril ($ONOO\cdot$) ve singlet oksijen (1O_2) gibi aktif oksijen (AO) formları oluşmaktadır. Radyasyon, gazlar, ağır metaller gibi çevre kirleticiler ile tedavi amaçlı kullanılan bir çok ilaç vücutta etkilesime girerek AO oluşumuna neden olmaktadır. Bu dış etmenlere ilave olarak vücutta antimikrobiyal savunma sistemi, ateşli iltihabik durumlar, kanser oluşumu, yorgunluga sebep olan ağır egzersiz durumları da AO oluşumunu teşvik etmektedir. AO birikimi bir antioksidanla engellenmediği takdirde, insan metabolizmasında oksidatif strese neden olmaktadır (Sivritepe, 2000).

Oksidatif stres, normal metabolik faaliyetlerin devam ettirilmesi için gerekli olan AO-antioksidan dengesini AO lehine bozarak; DNA, protein, karbonhidrat ve lipidlerde bozunmaya yol açmaktadır. Sayılan bileşiklerdeki bu bozunmalar, hücre membranının hem yapısını hem de fonksiyonlarını bozarak, bir çok dejeneratif hastalığa neden olmaktadır. Bugün literatürlerde 50'nin üzerinde hastalığın AO'larla ilgili olduğu bildirilmektedir. Bunlar arasında yaşlanma, katarakt, kanser, asiri trombosit kümelenmesi, kan akımının azalması (iskemi), ateroskleroz gibi dolaşım ve kalp hastalıkları en önemlileridir. Üzerinde en fazla durulani ateroskleroz yani damar sertliğidir (Sivritepe, 2000).

İnsan sağlığı bakımından antioksidan fonksiyonları ile ön plana çıkan metabolitler; vitaminler, karotenoidler ve fenollerdir. Bu metabolitlerin asıl kaynağı günlük diyetimizde yer alan besinlerdir. Özellikle bitkilerin farklı organ ve dokularında doğal olarak bulunan antioksidanlar, direkt bitkilerin veya bunlardan elde edilen farklı ürünlerin tüketilmesi yoluyla ya da bitkilerden ekstrakte edilen antioksidanların farklı şekillerde işlenerek ticari anlamda insanların kullanımına sunulmasıyla günlük yaşamımızda önem kazanmış, hatta popüler olmuştur (Sivritepe, 2000).

3.4. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar kaynakları bakımından doğal ve sentetik antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Shadidi, 2000).

3.4.1. Sentetik antioksidanlar

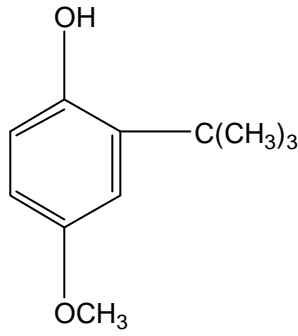
Yağların oksidasyon ve mekanizmalarının anlaşılması ile birlikte, oksidasyonu önlemek konusunda pek çok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla tokoferoller ve askorbik asidin doğal özdes formları veya türevleri sentezlendiği gibi, doğal yapı ile ilgisi olmayan yapay antioksidanlar da üretilmiştir. 1940'li yıllardan itibaren yüzlerce yapay antioksidan madde sentezlenmesine rağmen, bunların ancak az bir kısmı günümüzde kullanılmaktadır (Altug, 2001). Günümüzde gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), Tersiyer bütillidro kinon (TBQH) ve propil gallat (PG)'tir. Genel özellikleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Sentetik antioksidanlar ve özellikleri (Shadidi ve Nacz, 1995)

Özellikler	BHA	BHT	PG	TBHQ
Erime Noktası ($^{\circ}$ C)	50-52	69-70	146-4-148	126-128
Sinerjizm	BHT ve PG	BHA	BHA	
Çözünürlük (w/w%)				
Su	0	0	1'den küçük	1'den küçük
Propilen Glikol	50	0	6,5	30
Mısır Yağı	30	40	0	10
Gliserol	1	0	25	1'den küçük

3.4.1.1. Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA)

Bütillendirilmiş hidroksianisol, ($C_{11}H_{16}O_2$); Şekil 3.1'de de görüldüğü gibi 3-terciyer-bütill-4-hidroksianisol (%90) ve 2-terciyer-bütill-4-hidroksianisol (%10) izomerlerinin karışımı halinde bulunmaktadır (Altug, 2001).



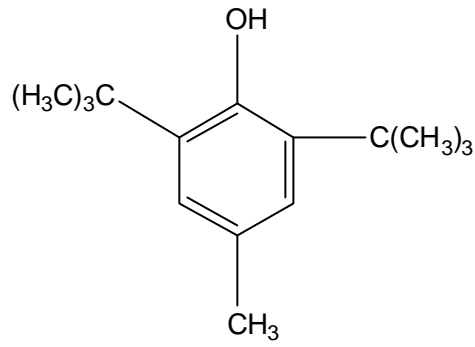
Sekil 3.1. Bütillenmiş hidroksi anisol

BHA beyaz, mumsu kati bir yapıya sahiptir. Erime noktası yaklaşık 48-63 °C olan hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda çözünebilir ancak suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir. BHA'nin yapısındaki hidroksil gruba karşı orto veya meta pozisyonda yer alan tersiyer bütıl grup nedeni ile “engelleyici fenol” adını alır. Bu sterik engelleme nedeni ile BHA'nin bitkisel yağlarda etkisi azdır. Ayrıca fırınlama veya kızartma gibi yüksek sıcaklık işlemleri uygulanan yağlarda kullanıldığında, kolaylıkla algılanabilen keskin bir fenolik kokusu oluşturmaktadır. Bunun yanında BHA yüksek konsantrasyonlu alkali metal iyonları (sodyum ve potasyum gibi) ile temas ettiğinde pembe bir renk alır (O'Brien, 1998).

BHA, bitkisel yağlarda etkin bir antioksidan olmamasına rağmen, genellikle diğer antioksidanların bir arada kullanılması ile elde edilen sinerjistik etkiden, hem de BHA'nin kullanıldığı ürünü koruyucu etkisinden faydalanılmaktadır (Altug, 2001).

3.4.1.2. Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT)

Sekil 3.2'de kimyasal yapısı görülen bütillendirilmiş hidroksitoluen, (C₁₅H₂₄O), (2,6-di-terciyer-bütıl-4-metil fenol) beyaz renkli ve kristal yapıda bir madde olup, 760 mmHg basınçta kaynama noktası 265 °C, erime noktası 69,7 °C'dir (Altug, 2001).

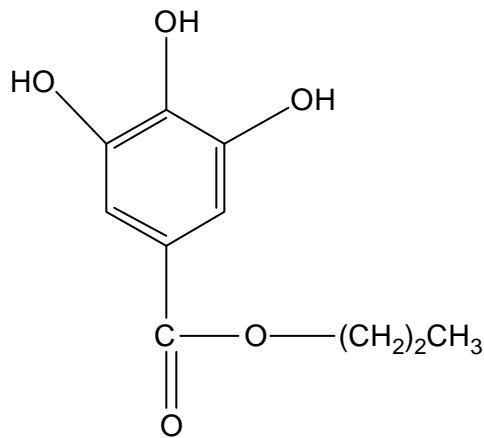


Sekil 3.2. Bütillenmiş hidroksi toluen

BHT de BHA gibi hem bitkisel hem de hayvansal yağlarda çözünen, suda çözünemeyen bir yapıya sahiptir. Yine BHA gibi hayvansal yağlarda etkisi bitkisel yağlardaki etkisine göre daha fazladır. BHA ve BHT sinerjistik bir etki gösterirler (O'Brien, 1998).

3.4.1.3. Propil gallat (PG)

Propil gallat (PG) ticari olarak gallik asidin propil alkol ile esterifikasyonu sonucu üretilir. Esterifikasyondan sonra fazla alkolü uzaklaştırmak için distilasyon işlemi uygulanır. PG beyaz renkli kristal toz halinde bir madde olup suda az çözünür, erime noktası da 148 °C'dir. PG yüksek sıcaklıklarda özelliğini kaybeder ve bu nedenle 190 °C'yi aşan kızartmalar için uygun değildir. Sekil 3.3'de kimyasal yapısı görülmektedir (Shadidi ve Nazck, 1995).



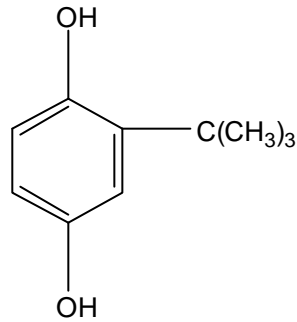
Sekil 3.3. Propil gallat

PG demir iyonlari ile mavi-siyah renkte bir kompleks olustururlar. Bunu önlemek için PG daima sitrik asit ile birlikte kullanilir. BHA ve BHT ile iyi sinerjist etki gösterirler. Fakat bu TBHQ için geçerli degildir.

PG bitkisel ve hayvansal yaglarda, et ürünlerinde, taze ve dondurulmus salam ve sosislerde antioksidan olarak kullanilir. Sakizlarda kullanimina izin verilen oran ise %0,1'den düsüktür (Shadidi ve Nacz, 1995).

3.4.1.4. Tersiyer bütihidrokinon (TBHQ)

Tersiyer bütihidrokinon, ($C_{10}H_{14}O_2$), yaglarda orta derecede, suda ise çok az çözünebilen, beyaz ile sarimsi kahverengi arasi renkte, kristal yapida bir madde olup, erime noktasinin $127^{\circ}C$ olduğu bilinmektedir. Sekil 3.4'de kimyasal yapisi görölmektedir (Altug, 2001).



Sekil 3.4. Tersiyer bütihidro kinon

Amerika Birlesik Devletleri (ABD) Gida ve Ilac Idaresinin (FDA) yaptigi çalismalar sonucunda etkili bir antioksidan olduğu belirlenen TBHQ'un kullanimina ilk kez 1972 yilinda izin verilmistir (Altug, 2001).

TBHQ doymamis bitkisel yaglarda kullanildigi zaman diger antioksidanlara göre daha etkilidir ve bir çok avantajlari vardir. Bunlar;

- a) Demir ihtiva eden ortamda kullanildigi zaman renk degisimine ugramaz.
- b) Yaglarda kullanildigi zaman tadi ve kokusu fark edilmez.
- c) Yaglarda çok iyi çözünebilme özelligine sahiptir.

d) Hayvansal yağlarda, kümes hayvanlarında ve bitkisel yağlarda etkilidir.

e) Firinlanacak ve kızartılacak ürünlerde de kullanılabilir.

f) Tokoferollerden daha iyi stabilite etkisine sahiptir.

TBHQ, BHA ve BHT yaklasik olarak ayni uçuculuga sahiptir. Fakat TBHQ digerlerine göre daha yüksek oksidatif kararlıliga sahiptir. Bu nedenle kızartılacak besinlerde daha fazla kullanilir. TBHQ'nun istenmeyen özelliği bazı protein ve sodyum tuzları olan ortamda renk bozulmasına uğrar (O'Brien, 1998).

3.4.2. Doğal antioksidanlar

Gıda oksidasyonunun doğal inhibitörleri genelde bitkisel bazı maddelerden elde edilmektedir. En fazla aktif olan doğal antioksidanlar fenolik ve polifenolik bileşiklere aittir. Bu bileşikler bitkinin her bölümünde bulunabilir. Tokoferoller, karotenoidler ve C vitamini hayvan dokularında ve bitkilerde sıkça bulunabilen diğer bileşik gruplarıdır (Shadidi, 2000).

Doğal antioksidanların faydaları genel olarak şu şekilde özetlenebilir:

a- Düzenleyici ajanlar sayesinde inkar edilemez bir güvenilirliğe sahiptir (GRAS).

b- Dünya çapında özellikle Japonya ve Avrupa'da kabul görmektedir.

c- Doğal etiketlere sahiptir.

d- Kullanım seviyeleri daha yüksektir (GMP).

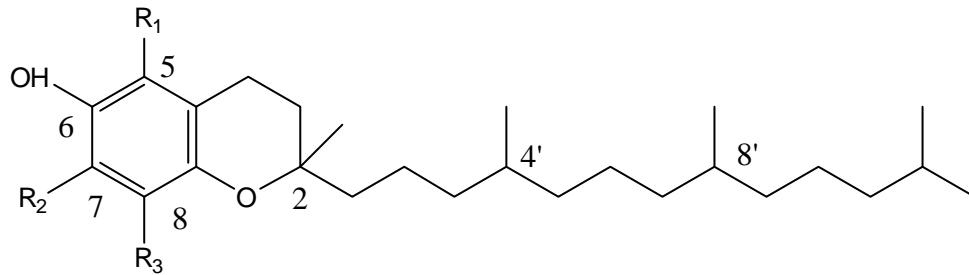
e- Daha az uçucudurlar.

Doğal antioksidanların sentetik olan antioksidanlara göre bazı avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Tüketici tarafından kimyasal olmadığı için güvenli olarak kabul edilmesi bunların en büyük avantajlarıdır. Ancak saflastırıldığı zaman daha etkili olurken maliyeti de artmaktadır. Eğer bir gıda maddesi "güvenli" (GRAS) etiketi aldıysa güvenlik testi yapılmasına gerek duyulmaz. Ancak doğal antioksidanlar da bazen gıdada istenmeyen renk, koku ve tat bırakabilirler (Pokorny, 1991).

3.4.2.1. Tokoferoller

Tokoferoller dogada en yaygin olarak bulunan monofenolik ve lipofilik bilesiklerdir. Dogada sekiz farkli tokol bulunmaktadir. Bunlar E vitaminin aktivitesine sahiptir. Bunlarin hepsi veya bir kısmi yenilebilir yaglarin içinde bulunur. Tokoferoller ve tokotrienoller (tokoller) kroman halkasindaki metil gruplarinin sayisi ve pozisyonuna göre α , β , γ , δ seklinde siniflandirilir. α izomeri 5,7,8,-trimetil; β izomeri 5,8-dimetil; γ izomeri 7,8-dimetil ve δ izomeri 8-metil seklinde (Shadidi, 2000) (Sekil 3.5).

Tokoferollerin yan zincirleri doymus, tokotrienollerin ise yan zincirleri doymamistir. Tokollerin antioksidan aktivitesi kimyasal yapısına ve konsantrasyonuna baglidir. Tokoferollerin genel olarak antioksidan aktivite siralamasi δ -> γ -> β -> α - seklinde (Shadidi, 2000).



Türevleri	R ₁	R ₂	R ₃
Alfa- Tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Beta- Tokoferol	CH ₃	H	CH ₃
Gama- Tokoferol	H	CH ₃	CH ₃
Delta- Tokoferol	H	H	CH ₃

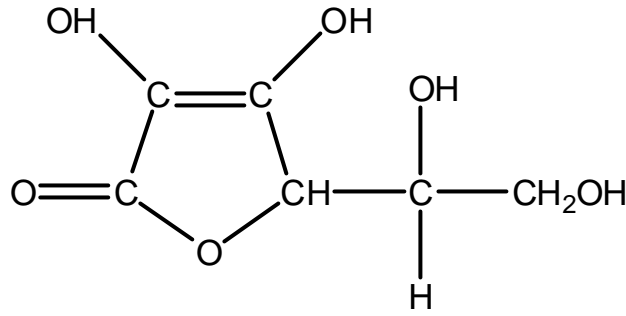
Sekil 3.5. Dogada bulunan tokoferol türevlerinin kimyasal yapıları

Hücre membranlarında yerel olarak, hücreyi koruyan ve hücre içine madde giriş çıkisini düzenleyen vitamin E, kırmızı kan hücrelerinin oluşumu için de mutlak gereklidir. Hidroksil, alkoksil, peroksil kökleri ve singlet oksijen gibi aktif oksijen formlarının neden olduğu oksidasyon zararından hücre ve dokuları koruyarak antioksidan rol oynar. Özellikle peroksil kökleri ile reaksiyona girerek, hücre içinde ve duvarlarında yağların oksidasyonunu engeller. Dolayısıyla LDL'leri (düşük yoğunluklu protein) de oksidasyondan koruyarak, damarlarda köpük hücrelerinin ve yağlı bantların oluşumunu azaltır. Ayrıca kanser riski ve gelişiminde koruyucu etkisinin olduğu; aktif oksijen birikiminin neden olduğu yaşlanma ile sonuçlanan patolojik değişimleri engellediği; katarakt gelişimini bir dereceye kadar durdurabildiği hatta geri çevirebildiği bildirilmektedir (Sivritepe, 2000).

Vitamin E'nin temel kaynağı yağ içeriği zengin olan sert kabuklu meyveler, tohumlar, bitkisel yağlar ve margarindir. Yeşil yapraklı sebzeler de az miktarda vitamin E içermektedir (Shadidi, 2000).

3.4.2.2. Askorbik asit ve tuzları

Doğal olarak meyvelerde ve sebzelerde bir vitamin olan L-askorbik asit (C vitamini- $C_6H_8O_6$), beyaz veya sarı renkte, kokusuz, kristalimsi bir yapıdadır. Erime noktası $190^{\circ}C$ civarında olan askorbik asit, suda tamamen çözünürken, etanolde biraz, dieter çözeltisinde ise hiç çözünmemektedir. Askorbik asit, özellikle konserve veya siselenmiş ürünler gibi tepe boşluğu olan gıdalarda oksijen tutucu olarak kullanılmaktadır. $1cm^3$ tepe boşluğunda bulunan oksijeni tutabilmek için yaklaşık olarak 3.5 mg askorbik asit kullanılması gerekmektedir. Havadan veya besinden oksijenin uzaklaştırılması sırasında askorbik asit dehidroaskorbik asit formuna dönüşmekte ve böylece antioksidan etkisini göstermektedir. Şekil 3.6'da kimyasal yapısı görülmektedir (Altug, 2001).



Sekil 3.6. Askorbik asit (Vitamin C)

Askorbik asidin tuzlari olan sodyum askorbat ($C_6H_7O_6Na$) ve potasyum askorbat ($C_6H_7O_6K$) da çeşitli besinlerde oksijen tutucu özellikleri nedeniyle oksidasyonu önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Altug, 2001).

Et mamullerinin üretiminde anti mikrobiyal bir madde olarak kullanılan nitrit ve nitratın, etteki serbest amin bileşikleriyle birleşerek kanserojenik bir bileşik olan nitrozaminlerin oluşmasını engellemek için askorbik asit ve sodyum askorbat kullanılmaktadır. Bu katkılar ortamdaki aminler ile nitrit ve nitratların reaksiyona girmesini engeller (Çakmakçı ve Çelik, 1998).

Antioksidanlar hezanda çözünürken yalnızca askorbik asit suda çözünmektedir (Jorge vd, 1997).

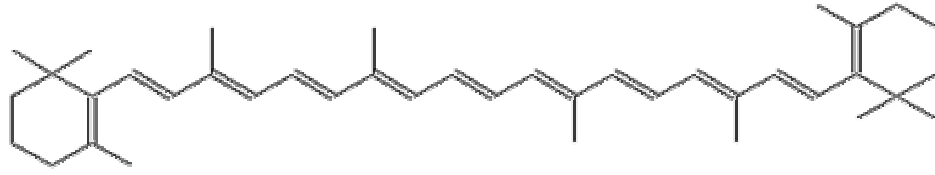
3.4.2.3. Karoten

Son bir kaç yılda karotenoitlerin antioksidan özelliklerinde artan bir ilgi mevcuttur. Karotenoitler bir zincir kirici antioksidan özelliğine sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ve ürün analizleri göstermiştir ki, karotenoitlerin serbest radikal yeme mekanizmaları oldukça karmaşıktır. Karotenoidler en az iki paralel yolla serbest radikallerle reaksiyona girmektedir.

- (i) Karotenoit ile serbest radikal arasında başka bir maddenin oluşması
- (ii) Karotenoit radikal katyonu oluşturan elektron transferi

Fenolik bir bileşikle yağ türevli serbest bir radikal arasındaki reaksiyon ile oluşan fenoksilik radikaller karotenoitlerle tepkimeye girerler. Böylece proteinler gibi biyomoleküllerin oksidasyonunu önlemiş olurlar. Fenolik

antioksidanlar ile karotenoitler arasında bir sinerjizm mevcuttur. Beta karoten (Sekil 3.7) bitki kimyasında en yaygın olarak bulunan karotenoit türevidir.



Sekil 3.7. Beta karoten

3.5. Fenolik Antioksidanlar

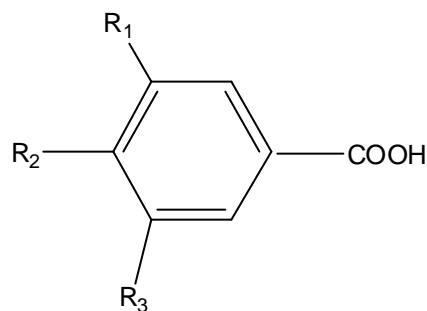
Gıdalardaki basit fenoller fenolik karboksil asidin dekarboksilasyonu sonucunda oluşmuştur (Shadidi, 1995). Fenollerin insan sağlığı bakımından antioksidan özellik taşıdığı, 1990'li yıllarda yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur. Farklı kültürlerle sahip 7 ülkenin 16 bölgesi seçilerek yapılan bir araştırmada; yöre halklarının 1960'lardan bu yana tükettiği flavonoit miktarları, yeme alışkanlıklarına uygun olarak diyetlerinde yer alan gıdaların analiz edilmesiyle tahmini olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda, bu bölgelerde son 25 yılda kronik kalp hastalıkları ve kanserden ölenlerin oranları da tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, yeterli miktarda flavonoit alımı ile kronik kalp hastalıklarından ölüm oranı arasında negatif bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Sivritepe, 2000).

Fenolik bileşikler ikincil bitki ürünlerinin çok geniş bir grubunu oluşturmaktadır. Kimyasal yapıları ve reaktiviteleri birbirinden farklılık gösterir. Oldukça basit bir yapıya sahip olan kafeik asitten çok daha karmaşık polimer bir yapıya sahip tanenlere kadar geniş bir alanı içine alır (Shadidi, 1995). Fenolik asitlerin antioksidan aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Polimerik polifenoller basit monomerik fenoliklere göre daha potansiyel bir antioksidan etkiye sahiptir. Yani polimerizasyon derecesi arttıkça süper oksit süpürme aktiviteleri de o kadar fazladır (Mortensen ve Skibsted, 1997; Shadidi, 1995).

3.5.1. Fenolik asitler

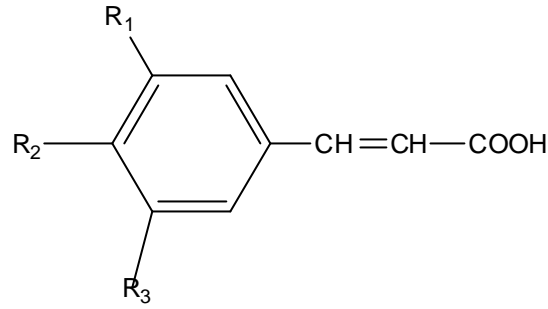
Hidrobenzoik (Sekil 3.8) ve hidrosinamik asitleri (Sekil 3.9.) temsil eden türevleri bitkisel kökenli gıdaların içinde bulunan fenolik asitlerdir. Bu türevler aromatik halkalarındaki hidroksilasyon ve metoksilasyon tiplerine göre değişmektedir (Shadidi, 1995).

Benzoik asit türevleri lignin ve tanen gibi kompleks yapılarla sahip fenolik asitler içinde daha yaygın olarak bulunmaktadır. Ayrıca organik asitlerin ve seker türevlerinin yapısını da oluşturmaktadır. Bitkisel gıdalarda sinamik aside oranla daha az görülen benzoik asit soğan, kara böğürtlen, çilek ve kus üzümü gibi meyve ve sebzelerde bulunmaktadır (Shadidi, 1995).



Asit	R ₁	R ₂	R ₃
p- hidrobenzoik	H	OH	H
Protokatesik	H	OH	OH
Vanilik	CH ₃ O	OH	H
Sirincik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik	OH	OH	OH

Sekil 3.8. Benzoik asit türevleri



Asit	R ₁	R ₂	R ₃
p- kumarik	H	OH	H
Kafeik	H	OH	OH
Ferulik	CH ₃ O	OH	H
Sinapik	CH ₃ O	OH	CH ₃ O

Sekil 3.9. Sinnamik asit türevleri

Sinnamik asit türevleri bitkisel kaynaklı gıdalarda oldukça sık bulunan bir fenolik asit grubundandır. Elma, domates, kayısı ve böğürtlenle %75'ten fazla bulunmaktadır. Ancak p-kumarik asit ananasta ve turuncgillerde en çok bulunan sinnamik asit türevidir (Shadidi, 1995).

3.5.2. Flavonoidler (Flavan türleri)

Flavonoidler genelde yaşayan hücrelerde glikozit olarak bulunurlar ve enzimlerle, asit ve sıcaklıkla aglikona ve şekere ayrışır. Flavonoidler ve sinnamik asitler ilkel antioksidanlar olarak düşünülür ve serbest radikal alıcısı ve zincir kırıcı olarak rol oynarlar (Shadidi, 2000).

Flavonoidler C₆-C₃-C₆ difenilpropan yapısındadırlar ve fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka oluşturmaktadır. Değişik flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından ve doymamışlık derecesinden kaynaklanmaktadır (Saldamli, 1998).

Yapısal olarak beş gruba ayrılırlar:

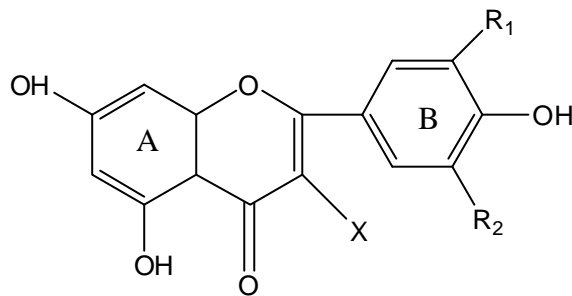
- Flavon ve flavonoller

- Flavanonlar
- Antosiyaninler
- Katesin ve löykoantosiyanidinler
- Proantosiyanidinler (Saldamli,1998).

3.5.2.1. Flavon ve Flavonoller

Flavon ve flavon glikozitleri hemen her bitkide bulunurlar ve açık sari renkli bileşiklerdir. Flavonlar ile flavonollerin arasındaki fark, orta halkadaki C₃ atomunda –H veya -OH grubu yer almasındandır.

Flavonol grubu bileşikler de besinlerin glikozit formunda yaygın olarak bulunmaktadır. Bunların başlıcaları kemferol, kersetin, mirsetin ve izoramnetin'dir (Şekil 3.10) (Saldamli, 1998).

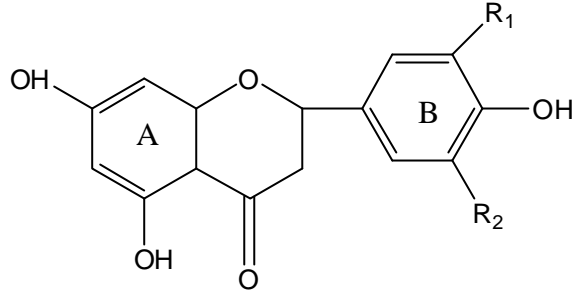


Flavonoller (X=OH)	R ₁	R ₂	Flavonlar (X=H)	R ₁	R ₂
Kemferol	H	H	Apigenin	H	H
Kersetin	OH	H	Luteolin	OH	H
Mirsetin	OH	OH	Trisin	OCH ₃	OCH ₃
Izoramnetin	OCH ₃	H	Krizoeriyol	OCH ₃	H

Şekil 3.10. Flavonon ve flavonol kimyasal yapısı

3.5.2.2. Flavanonlar

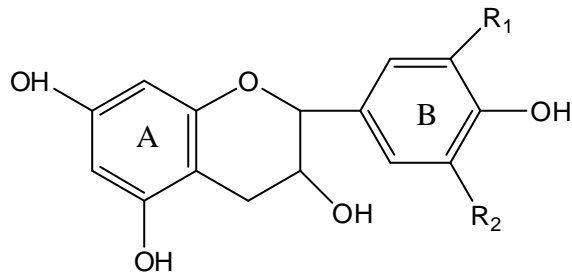
Flavanonlar, flavonlardan orta halkada yer alan bir çift bağla ayrılır (Sekil 3.11). Flavanon glikozitleri turunçgil meyvelerinde çok yaygın olarak bulunurlar (Saldamli, 1998).



Sekil 3.11. Flavanon kimyasal yapısı

3.5.2.3. Katesin ve lökosiyanidinler

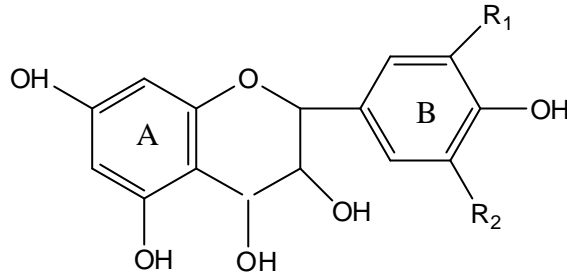
Katesinler, flavan-3-ol'lerin, bir OH grubu içeren monomerlerdir ve flavanoitlerin besinlerdeki en yaygın grubunu oluştururlar (Sekil 3.12). Katesinler, havadaki oksijen ile kolaylıkla reaksiyona girerler (Saldamli, 1998).



Katesin	R ₁	R ₂
(+)-katesin	OH	H
(-)-epikatesin	OH	H
(+)-gallokatesin	OH	OH
(-)-epigallokatesin	OH	OH

Sekil 3.12. Katesinin kimyasal yapısı

Löykosiyanidinler, flavan-3,4-diol formülünde olup iki adet OH grubu içerirler. Löykosiyanidinler besinlerde serbest halde bulunmazlar. Sekil 3.13’de kimyasal yapıları görülmektedir (Saldamli, 1998).



Löykoantosiyandinhidrat	R₁	R₂
Löykoasiyandinhidrat	OH	H
Löykodelfinidindinhidrat	OH	OH

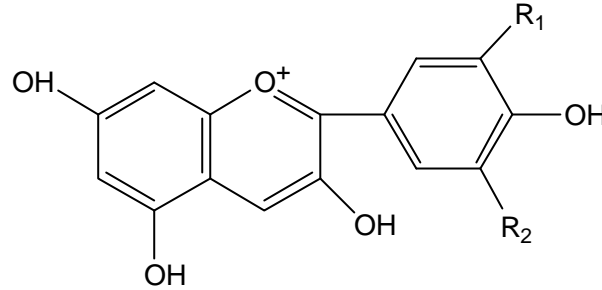
Sekil 3.13. Löykoantosiyandinhidrat kimyasal yapisi

3.5.2.4. Antosiyandinler

Antosiyandinler, dogal olarak genelde antosiyanın adi verilen glikozit formunda bulunurlar. Meyve ve sebzelerin kirmizidan mora kadar degisen tipik renkleri bu antosiyandinlerden kaynaklanmaktadır (Saldamli, 1998).

Antosiyanınler bitki alemindeki maddeler içinde suda çözünen pigmentler olarak bilinirler. Dogada 3-monoglikozit veya 3,5-diglikozit olarak bulunurlar. Antosiyanınlerde ikinci glikozil grubunun bulunmasi bunların absorpsiyon araliklarında karakteristik bir kaymaya neden olur. Bu özellik antosiyanınlerin spektral olarak belirlenmesinde bir araç olarak kullanılmaktadır. Antosiyanınlerin hidrolizinden sonra kalan aglikona antosiyandin denir. Dogadaki bir çok antosiyanın perlargonidin, siyanidin, peonidin, delfinidin, petunidin ve malvidin glikozitleri olarak bulunur. Pelargonidin gibi bazi önemli antosiyandinler çilek ve turpta, siyanidinler elma ve kirmizi lahanada, malvidin ve delfinin ise üzümde bulunur. Bu antosiyandinlerin temel yapısında flavilyum kasyonu vardır (Shahidi, 1995).

Siyanidin dogada en yaygin bulunan antosiyanidindir ve en çok tüketilen meyvelerin yaklasik %90'ında saptanmistir. Sekil 3.14'de besinlerdeki baslica antosiyanidinlerin yapilari verilmektedir (Saldamli, 1998).



Antosiyanidin	R ₁	R ₂
Pelargonidin	H	H
Siyanidin	OH	H
Delfinin	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Sekil 3.14. Besinlerde bulunan baslica antosiyanidinlerin yapilari

3.5.2.5. Proantosiyanidinler

Proantosiyanidinler, katesinlerin flavan-3-ol yapisinin kimyasal veya enzimatik olarak dimer, oligomer ve polimerlere kondensasyonu ile olusan bilesiklerdir. Proantosiyanidinler yaygin olarak bitkisel kökenli besinlerde bulunurlar (Saldamli, 1998).

3.6. Ideal Antioksidanların Özellikleri

Yağların ve yağ içeren besinlerin acilasmaşını önleyen antioksidanların etkileri çok değişiktir. Karanlık ortamda klorofil, yağları antioksidan olarak koruduğu halde aydınlık ortamda tam tersine pro-oksidan etki yapar.

Antioksidanların toksik etkilerinin dikkatle göz önünde bulundurulması gerekir. Antioksidanların toksik etkileri hayvanlar üzerinde tespit edilmektedir. Bunun için denemelerin en az iki ayrı laboratuvarında ve iki yıl süre ile üç cins hayvan üzerinde yapılması ve bu hayvanlardan birinin fareden başka bir memeli hayvan olması gerekmektedir (Keskin, 1975).

İdeal bir antioksidanda bulunması gereken özellikler şu şekilde sıralanabilir:

- Güvenli olmalı, toksik olmamalıdır.
- Yiyecek içinde birleşmesi kolay olmalı
- Düşük konsantrasyonlarda etkili olmalı
- İstenmeyen koku ve tada sahip olmamalı
- Rengi olmamalı
- Uçucu olmamalı ve ısıya dayanıklı olmalı
- Maliyeti düşük olmalı
- Yağlarda yapılan pişirme, kızartma gibi işlemlerden sonra etkisini kaybetmemelidir
- Az miktarda etkili olmalıdır
- Yağda kolayca çözünmelidir (Shadidi, 2000).

3.7. Gıda Antioksidanları

Antioksidanlar gıda maddelerinin içinde doğal bileşik olarak bulunabildikleri gibi gıdaya sonradan da katılabilirler. Gıda maddelerinde bulunan basit antioksidan bileşikler Bölüm 3.5 de açıklanan fenolik maddelerdir. Gıdaların bozunmasını önleyici ve dışarıdan katılacak antioksidan maddeler ise daha çok sentetik antioksidanlardır. Ancak kullanımlarındaki soru işaretleri sentetik antioksidan maddelerin yerini doğal antioksidanların alması yönünde çalışmalarını hızlandırmış olmasına rağmen sentetik antioksidan maddeler günümüzde hala büyük bir oranda kullanılmaktadır.

Katı ve sıvı yağlar ile yağlı gıdalar depolanma ve kullanma süresince okside olurlar ve oluşan çeşitli oksidasyon ürünleri kötü tat ve kokuya neden olur. Oksidatif bozunmaya uğrayabilecek besinler şunlardır:

- Yenilebilir yağlar

- Domuz yagi
- Kizartmalarda kullanılan kati ve sivi yağlar
- Kati ve sivi yağ içeren proses edilmiş gıdalar
- Süt yagi
- Patates gibi kızarmış sebzeler
- Kavrulmuş fındık
- Salata sosları
- Kurutulmuş et
- Dondurulmuş balık ve balık yagi
- Pasta ve kekler
- Çikletler
- Konsantre edilmiş vitamin preparatları
- Uçucu yağlar ve tatlandırıcılar (Pokorny, 1991).

Gıdada en çok kullanılan antioksidanlar bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) ve terbütillhidrokinon (TBHQ)'dur. Bu antioksidanlar yemeklik yağ ve diğer gıdalardaki yağ içeriğine göre maksimum 200 ppm oranında kullanılmaktadırlar. 1940'li yıllarda BHA'nin yağların oksidasyonunu geciktirmesinin keşfi ile birlikte sentetik antioksidanların gıdada kullanılmasına başlanmıştır. Antioksidan kullanımı ile demir ve bakır gibi bazı metallerin zararlı etkilerinin giderildiği görüldü. Sitrik asit (CA), etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) ve türevlerinin metal deaktivatörleri olarak görev yaptığı bulundu (Sivritepe, 2000).

Daha sonra 1954'te Amerika'da BHT'nin gıdada kullanılması onaylandı ve TBHQ 1972'te piyasaya sunuldu. Buna rağmen gıdada kullanılan sentetik antioksidanların kansere neden olabilen etkilerine dair düşünceler gelişmeye başladı. Böylece Japonya'da ve bazı ülkelerde BHA'nin gıdada kullanılmasına izin verilmedi. TBHQ'da Kanada'da, Japonya'da ve Avrupa ülkelerinde yasaklandı (Sivritepe, 2000).

Gıda oksidasyonunun doğal inhibitörleri genelde bitki bazlı maddelerden elde edilmektedir. Ayrıca gıdadaki kimyasal değişimlerle de elde edilebilirler veya gıda olmayan bileşiklerden de elde edilmektedirler. Buna rağmen serbest radikal süpürücü özelliğine sahip bir dipeptit olan karnosin gibi doğal antioksidanların

varligi da unutulmamalidir. Karnosin kümes hayvanlari gibi hayvanlarin kas dokularinda bulunur. Buna ek olarak vitaminler, mineraller ve enzimler gibi antioksidanlarda düşünölmelidir (Sivritepe, 2000).

En fazla aktif olan antioksidanlar fenolik ve polifenolik bilesikleri familyasina aittir. Tokoferoller, karotenoitler ve C vitamini hayvan dokularinda ve bitkilerde sikça bulunabilen diger bilesik gruplaridir (Shadidi ve Nazck, 1995).

3.8. Antioksidan Aktivite Tayin Metotlari

3.8.1. Yaglarin peroksidasyonu inhibisyonuna dayali metotlar

Antioksidanlarin aktivitesi, yaglarda otooksidasyon sonucu olusan birincil ve ikincil ürönlere bakilarak belirlenebilir. Genellikle olusumunda gecikme veya otooksidasyon sonucu olusan ikincil ürönlere gözlenmesine dayanan yöntemler kullanilir. Bu yöntemler bozulmus besinlere direkt olarak uygulanabilecegi gibi, antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde de yaglarin önceden belirli kosullarda oksidasyona ugramis olmasi gerekir. Yaglarin oksidasyonu ve buna bagli olarak da stabiliteleri ya normal depolama kosullarinda saklanan gidalar üzerinde direkt olarak veya hizlandirilmis stabilite testlerinin uygulandigi yöntemlerle belirlenmektedir. (Shadidi ve Nazck, 1995).

3.8.1.1. Peroksit sayisi

Yaglarin bozunmasinin baslica nedeni, yaglarin kendisinde olusan oksidasyon olayidir. Oksijen ile doymamis yag asitleri arasinda gerçeklesen reaksiyon sonucu hidroperoksitler olusur. Hidroperoksitler çok çabuk bozularak aldehitleri olustururlar. Bunlar keskin, hos olmayan tat ve kokulara sahiptirler. Peroksit konsantrasyonu genelde peroksit sayisi diye adlandirilir. Oksidasyon veya acimislignin bir ölçüsü olarak kabul edilir (O'Brien, 1998). Peroksit sayisi yaglarda bulunan aktif oksijen miktarinin ölçüsü olup 1 kg yagda bulunan peroksit oksijenin milimol olarak miktaridir (TS-894, 1975). Peroksit sayisini ölçen bir çok analitik yöntem vardir. Tüm metotlarda sonuç ve hassasiyet deneysel kosullara

baglidir. En yaygın kullanılan yöntem iyodometrik titrasyondur. İyodometrik metotta yağların peroksit içerikleri asetik asitteki potasyum iyodürden serbest hale geçen iyodun tiyosülfatla titrasyonu sonucu bulunur. Peroksit sayısının belirlenmesi için kullanılan bu yöntem tüm hayvansal ve bitkisel yağlar için uygulanabilmektedir.

Peroksitlerin iyodometrik metotta tayininde baslıca iki hata kaynagi vardır. Birincisi yağın doymamis bağlarının serbest hale geçen iyodu absorplaması, ikincisi titre edilmekte olan çözeltideki oksijen tarafından potasyum iyodürdeki iyodun serbest hale geçirilmesidir. İkinci hata genellikle oksijen hatası olarak adlandırılır. Diğer hatalar; numunenin ağırlığındaki değışmeler, süre ve sıcaklık gibi reaksiyon şartları ve kullanılan çözücünden kaynaklanabilir (Allean ve Hamilton, 1989).

Peroksit sayısını belirlemek tam olarak yağın kalitesini belirlemez. Bunun sebebi de peroksidin hemen bozularak diğer maddelere dönüşmesidir. Yağ oksidasyonunda peroksit sayısı ve tat derecesi arasında doğrusal bir ilişki söz konusudur. Fakat bu yöntem tek başına tat kalitesinin belirlenmesi için yeterli değildir. Çünkü peroksit sayısı ilk önce maksimum değerine ulaşır ve depolama zamanı arttıkça azalmaya başlar. Bu nedenle yüksek peroksit sayısı kötü bir tat anlamına gelirken düşük peroksit sayısı her zaman yağın iyi bir tada sahip olduğunu göstermez (O'Brien, 1998).

Peroksit sayısının tayini, oksidasyonun yani sıra yağlara ilave edilen antioksidanların etkinliğinin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Antioksidan eklenen ve eklenmeyen yağlar, belirli sıcaklık ve çevre koşullarında tutulup, periyodik olarak peroksit sayısı belirlenerek antioksidanların etkinliği ve yağların acılaşmaya karşı kararlılığı saptanabilir (Felekoglu, 2001).

3.8.1.2. Aktif oksijen yöntemi (AOM)

Aktif oksijen yöntemi hayvansal ve bitkisel yağların oksidatif stabilitesini belirlemede kullanılan en yaygın yöntemdir. Bu yöntem rutin kalite kontrollerinde ve yeni ürünlerin araştırılmasında ve geliştirilmesinde kullanılır. AOM' de bitkisel ve hayvansal yağların bozunmasını hızlandırmak için ısı ve

hava uygulanir. AOM testi her yagın acilasmasinin basladigi noktaya kadar devam ettirilir. Bu degerler hayvansal yaglar için 20 PV (Peroksit Degeri), bitkisel yaglar için 70-100 PV arasındadır (O'Brien, 1998).

3.8.1.3. Schaal firin testi

Schaal Firin Testi'nin amacı sıcaklık artisina bagli olarak olusan oksidasyona karsi direnci ölçmektir. Bu testte yagın acilasmaya baslayacağı ana kadar geçen süre tespit edilir.

Bu testin birkaç kusuru bulunmaktadir ki bunlardan biri oksidasyon sartlarının yetersiz kontrolüdür. Bir diğeri ise kisisel koku ve tat duyusuyla son noktanin bulunmasıdır (Allean ve Hamilton, 1989).

Schaal Firin testinde de diğeri hizlandırılmış stabilite testlerinde olduğu gibi düzenegin çok temiz olması gerekmektedir. Çünkü yagların otooksidasyonu otokatalitik bir olaydır. Eger firinin içinde önceki testlerden kalan oksitlenmiş bir yag artigi var ise, bu artık oksitlenmeyi çabuklastırarak numunenin stabilitesinin düşük çıkmasına neden olacaktır. Bu nedenle numunenin konulduğu cam kap titizlikle temizlenmelidir. Schaal Firin Testi yaglardan ziyade bisküvi ve kraker ürünleri için uygulanmaktadır (O'Brien, 1998).

3.8.1.4. Oksijen absorpsiyon yöntemi

Test edilecek numune cam bir kabin içine konur ve kap basınca dayanikli baska bir paslanmaz çelik kabin (bombanın) içine yerlestirilir. Çelik kap kapatilir ve oksijen basinci altında tutulur. Bombanın tamamı kaynar su banyosuna batirilir. Oksijenin absorpsiyonu ile meydana gelen basınç düşmesi kaydedici tarafından kaydedilir ve zamana karsi grafigi geçirilir. Hizli bir basınç düşmesinin gözlemlendiği ana kadar geçen süre numunenin oksidatif stabilitesini gösterir. Bu metodun AOM yöntemine göre bir çok üstünlüğü bulunmaktadir. Bunlar;

- . AOM'e göre 1,5 kat daha hizlidir.
- . Bitkisel ve hayvansal yagların yanında yag içeren besinler için de uygulanabilir.

. AOM'e göre daha kısa sürede sonuç vermektedir.

Bu testin tek dezavantajı aynı anda sadece tek bir numunenin test edilebilmesidir (O'Brien, 1998).

3.8.1.5. Tiyobarbitürük asit (TBA) testi

TBA yağ oksidasyonunun belirlenmesi için kullanılan diğer bir yöntemdir. Test peroksit değerinin bulunması için uygun değildir (Allean ve Hamilton, 1989). Metodun esası, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan monoaldehitlerin, asetik asitle ve 2-tiyobarbitürük asitle isitilmesi sonucu oluşan kırmızı rengin absorbans değerinin spektrofotometrik yöntemle ölçümüne dayanmaktadır (Felekoglu, 2001). Özellikle sıvı yağların ve domuz yağının acimaya başladığı ilk anları tespit etmek için kullanılmaktadır (Allean ve Hamilton, 1989). Bu test yeşil çay ve onun ekstresindeki antioksidanların aktivite tayininde kullanılmıştır (Köseoglu vd, 1996).

3.8.1.6. Ransimat metodu

Bitkisel ve hayvansal yağların bozunumu sırasında koku ve tat bakımından değişiklikler (ransidite) meydana gelmektedir ve bu değişiklikler atmosferik oksijenin neden olduğu kimyasal değişikliklerdir. Buldukları sıcaklıklarda yavaşça oluşan oksidasyon prosesleri otooksidasyon olarak bilinmektedir. Doymamış yağ asitlerinde radikal reaksiyonları ile başlar, çoklu bir prosesle ürünlerin, peroksitlerin, alkollerin, aldehitlerin ve karboksilik asitlerin bozunmasına kadar ilerler. Ransimat yöntemi yağların hem sıcaklık hem de oksijen (hava) etkisi ile bozunması hızlandırılması ve bozunma ürünlerinin suda absorplanarak suyun iletkenliğinin ölçülmesinin izlenmesi prensibine dayanır.

Numune 50-220 °C arasında değişen sıcaklıklarda bir hava akımına maruz bırakılır. Uçucu oksidasyon ürünleri özellikle formik asit hava akımı sayesinde ölçme çözeltisi (distile su) içine absorbe edilir. Bu ölçüm çözeltisinin iletkenliği sürekli olarak kaydedildiğinde bir oksidasyon eğrisi elde edilir ki bu

egrinin dönüm noktası indüksiyon zamanı olarak bilinir. Bu da oksidasyon kararlılığı için iyi bir karakteristik değer sağlar (Joaquin vd., 2004).

Ransiditenin bitkisel ve hayvansal yağlarda gelişmesi otooksidasyonun bir sonucudur. Aşağıda sıralanan bazı faktörler ransiditenin artmasına neden olur:

- . Doymamışlık derecesi: Yüksek oranda doymamış bir yağ az oranda doymamış bir yağdan daha fazla reaktiftir.

- . Doymamışlık tipi: Çiftli alilik tipi tekli olana göre daha fazla reaktiftir. Örneğin esansiyel hayvansal yağlara oleik aside göre daha reaktiftir.

- . Çeşitli valans metal iyonuna maruz kalmak: Bakır iyonları demir iyonlarına göre daha zarar vericidir.

- . Isıya maruz kalmak

- . Isıya maruz kalmak: Florasanlar ampullere göre daha kötüdür.

- . Oksijene maruz kalmak.

Yaşayan bir bitki dokusunda ransiditeye neden olan serbest radikallerin oluşması ile ransidifikasyonu önleyen doğal antioksidanların oluşması arasında bir denge mevcuttur. Ancak oksidatif dayanıklılık proses derecesine, paketleme koşullarına ve depolama sıcaklığına bağlı faktörlerce kaybolabilmektedir. Oksidatif dayanıklılık azaldığında hızlı bir otooksidasyon başlar (Allean ve Hamilton, 1989).

3.8.2. Serbest radikal süpürücü aktivite tayin yöntemleri

Antioksidanların serbest radikal süpürücü aktivitelerini ölçebilmek için bir çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak antioksidanların kapasiteleri belirlenir. Yaygın olarak kullanılan serbest radikal süpürme yöntemleri DPPH, TRAP, FRAP ve süperoksit anyon süpürme kapasitesinin belirlenmesi yöntemleridir (Frankel ve Mayer, 2000).

3.8.2.1. DPPH radikal testi

2,2,-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali fenolik antioksidanların aktivite tayini çalışmalarında kullanılan en eski sentetik radikallerdendir.



Yukarıdaki tepkimeye göre antioksidanlar hidrojeni DPPH· radikaline verirler. Bu testin süresi 10 dakika ile 6 saat arasında değişmektedir. Bu test polifenolik bileşiklerin antiradikal etkilerini belirlemede kullanılmaktadır (Sanchez vd, 1998).

DPPH testinin kullanımı sınırlıdır. Çünkü DPPH radikalleri diğer radikallerle (alkil) etkileşirler ve DPPH radikalleri sabit hale gelene kadar geçen süre doğrusallıktan sapar (Frankel ve Mayer, 2000).

Bu test su-yag emülsiyon sistemindeki zeytin yağı polifenollerinin antioksidan aktivitelerinin pH ve demir iyonlarının etkisiyle ilgili çalışmada kullanılmıştır (Sanchez vd, 1998).

3.8.2.2. TRAP testi

Toplam radikal yakalama kapasite (TRAP) testi toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilmiştir. Bu testte 2,2-azobis (2-amidinopropan) hidroklor (ABAP) plazma antioksidanlarını oksitlemek için peroksit radikallerini üretir ve bu oksidasyon olayı oksijen absorpsiyonu ile gözlemlenebilir (Frankel ve Mayer, 2000).

3.8.2.3. FRAP testi

Antioksidan demir indirgeme gücü (FRAP) olan bu test direkt olarak antioksidanın demir tripiridil-triazine kompleksini ($\text{Fe}^{+3} - \text{TPTZ}$) demir kompleksine ($\text{Fe}^{+2} - \text{TPTZ}$) indirgeyebilme kabiliyetini ölçmektedir. Bu olay düşük pH değerlerinde gerçekleşir. Bu durum antioksidanın elektron yakalama kapasitesi ile doğru orantılıdır. FRAP testi antioksidanların koruyucu özellikleri konusunda herhangi bir bilgi sağlayamaz (Frankel ve Mayer, 2000).

3.8.2.4. Süperoksit anyon süpürücü

Süperoksit radikal anyonu (O_2^-) yağ oksidasyonunu direk olarak baslatamaz. O_2^- süpürücü biyolojik ve yağ sistemlerinde oksidasyonu engelleyen tek mekanizma değildir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin O_2^- süpürücü etkileri vardır. Fakat yağ oksidasyonunu önlemek için etkili değildirler. Bu test büyük bir dikkat ile uygulanmalıdır. Çünkü süperoksit radikalleri test süresince üremeye başlarlar ve dengeye gelme söz konusu değildir (Frankel ve Mayer, 2000).

3.9. Antioksidanların Besinlerde Kullanım Alanları

3.9.1. Hayvansal yağlar

Yenilebilen ve yenilemeyen kati yağlar ile yüksek oranda hayvansal yağ içeren kati yağlar olarak tanımlanan bu yağlar düşük doymamışlıklarının yani sıra, minimum doğal stabiliteye sahiptirler. Bu yağlar genellikle firinlanmış ürünlere katılmakta ve antioksidan kullanılabilir. Yağların kullandıkları üründe maksimum koruma gerektiğinde yüksek oranda BHA içeren karışımlar kullanmak gerekmektedir. Ticari uygulamalarda kullanılan en uygun antioksidan kombinasyonu %20 BHA + %6 propil gallat (PG) + %4 sitrik asit içeren karışım olduğu belirtilmektedir. Bu karışım hem raf ömrü, hem de yağın kullanıldığı üründe oluşturulan stabilite açısından oldukça etkili olup %10 BHA + %6 PG + %6 sitrik asit içeren karışımlarda hem hayvansal hem de bitkisel yağlar kullanılarak elde edilen kati yağlarda da kullanılabilir. Hayvansal kati yağlar bünyelerinde çok az miktarda antioksidan içerdiklerinde bunlara yapılan tokoferol ilavesi oksidatif stabiliteyi oldukça arttırmaktadır.

Antioksidan çözeltilerin hayvansal yağlara ilave edilmesi için bir çok yöntem bulunmaktadır. Yöntem seçiminde işletme ortamı, eritilecek kati yağ miktarı ve kullanılacak ekipmanlar gibi faktörler etkili olabilmektedir. Büyük uygulamalarda antioksidan karışımları sıcak kati yağ akışkan olduğu sırada boru hattına bir pompa ile enjekte edilerek katılmaktadır. Bu tekniğin başarılı olması

antioksidan-kati yağ karışımının birlikte dolastığı süre ve dolasını sağlayan pompanın yarattığı türbülansa bağlıdır. Depolama tanklarında bekletilen az miktardaki hayvansal yağlara antioksidan direkt olarak ilave edilebilmektedir. Bu teknikte yağ isitilmakta ve bütün yağ hareket edebileceği uygun bir karıştırıcı ile karıştırılmaktadır. Karıştırma çok kuvvetli olmamalı ancak yağdaki artık havayı çıkartmaya yetecek şekilde ayarlanmalıdır. Karışım ile bütün yağ harekete başladığı sürede antioksidan yavaş olarak ilave edilmektedir. Homojen bir karışımın sağlanması için karıştırma yaklaşık olarak 20 dakika daha devam etmelidir. Bazı durumlarda da antioksidanlar yüksek konsantrasyonlarda hazırlandıktan sonra ürünlere katılmaktadır (%10 antioksidan içeren yağ karışımları gibi). Sıcak haldeki bu antioksidanlar boru hattına ya da direkt ilave şeklinde kati yağlara katılabilmektedirler (Altug, 2001).

3.9.2. Bitkisel yağlar

Bu gruba yenilebilen ve yenilemeyen sıvı yağlar ile kati yağlar girmektedir. Bu tip yağlar çok yüksek orandaki kimyasal doymamışlıklarının yanında genellikle bir miktar doğal antioksidan içermektedirler. Yüksek doymamışlıklarından dolayı bitkisel yağları normal miktarlardaki antioksidanlar ile stabilize etmenin güçlüğüne yani sıra bazen çok yüksek antioksidan konsantrasyonları daha etkili olmaktadır. Bu tip çoklu doymamış yağlar için PG gibi çok sayıda hidroksil (OH) grubu içeren antioksidanların uygun olduğu ve maksimum stabiliteyi sağlamak amacıyla bunların izin verilen en yüksek oranlarında kullanılmaları gerektiği belirtilmektedir.

Yapay antioksidanların etkileri konusunda yapılan çalışmalar göstermiştir ki bitkisel yağların stabilitesinde en etkili antioksidan TBHQ'dur. Bunu PG ve daha sonra sırasıyla BHT ve BHA izler.

Antioksidan karışımları bitkisel yağlara bir çok uygulamada boru hattına pompa yardımı ile enjekte edilmektedir. Bir çok metalin katalitik etkisini azaltmak için askorbik asit ve diğer antioksidanlar işlemler sırasında bitkisel yağlara ilave edilmektedir (Altug, 2001).

3.9.3. Yüksek oranda kati yağ içeren ürünler

Patates cipsleri, fındık ezmesi gibi bu kategoriye giren ürünler genellikle yağda kızartılarak elde edildikleri için %50'ye kadar kati ve sivi yağ içerebilmektedirler. Bu kızartma işlemlerinde bitkisel yağlar ve kati yağlar kullanılmaktadır. Hamur isleri, pastalar ve tatlılar gibi %8-10 yağ içeren besinler de bu gruba dahil edilmektedir. Ancak bu tip durumlarda hazırlama aşamasında hayvansal yağların kullanılması gerekmektedir.

Bu tip besinle antioksidan seçiminde kullanılan kati yağın cinsi ve ürünün hazırlanma aşamasındaki işlem şartlarının da dikkate alınması gerekmektedir. Yağda kızartma işleminde kullanılan bitkisel yağlarda veya kati yağlarda %10 BHA+%10BHT+%6 PG + %6 sitrik asit içeren antioksidan karışımının en fazla etkiyi gösterdiği ifade edilmektedir. Hayvansal kati yağlar kullanıldığında ve özellikle alkali ortamlarda (değişik hamur isleri ve fırınlanmış ürünler), BHA, PG ve sitrik asit karışımları uygulanmaktadır. Antioksidan karışımlarının bitkisel veya hayvansal yağlara kızartma işleminden önce katılması gerekmektedir. Kızartma işlemlerinde antioksidan kullanarak yağın bu işlemlerde oluşabilecek yüksek sıcaklıklarda oksidasyonu engellenebilmektedir. Fenolik tipteki antioksidanlar buharla sürüklenebileceklerinden dolayı yağda kızartma işlemleri sırasında sürekli olarak antioksidan ilavesi gerekmektedir. Modern tip kızartıcılarda besin ve yağ oranı çok yüksek olduğu için taze yağın kızartma işleminde sürekli olarak ilave edilmesi önerilmektedir. Bu şekilde ortama sürekli olarak taze antioksidan da katılabilmektedir (Altug, 2001).

3.9.4. Düşük oranda kati yağ içeren besin ürünleri

Kahvaltılık hububatlar, dehidre patatesler ve bazı kek karışımları bu tip besinlerde örnek olarak verilmektedir. Bunlar yağ içerikleri %1-2 veya daha az olan bitkisel kaynaklı ürünlerdir. BHT ve BHA gibi antioksidanlar ile stabilize edilebilmektedirler. Bu tip besinlerde karşılaşılan en önemli problem düşük miktarlardaki ürünlerde ve kati yağlarda maksimum raf ömrünü sağlamak için

BHA, BHT, PG ve sitrik asidin birlikte kullanildigi kombinasyonlari etkili oldugunun kanitlandigi belirtilmektedir (Altug, 2001).

3.9.5. Sekerlemeler

Sekerlemelerde kullanılan bir çok katkı maddesi kolaylıkla bozunabilmektedir. Örneğin süt tozu, kati ve sivi yağlar, fındık, fıstık türü maddeler ve uçucu yağlar tat ve kokunun kaybolmasına veya istenmeyen kötü koku oluşumuna neden olan değişik tipte bozulmalara maruz kalabilmektedir. Antioksidanlar değişik tip sekerlemelerdeki acilasmayı engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Antioksidan uygulaması stabilize edilecek kati yağın tipine bağlı olarak değişmektedir (Altug, 2001).

3.9.6. Et ve et ürünleri

Et ürünlerindeki uygulamalar, antioksidanın parçalanmış etlere dağılmış olması ilkesine dayanmaktadır. Ticari uygulamalarda bu işlem BHA ve sitrik asit içeren bir tuz kullanılarak bu kristallerin yüzeyine dağılması ile yapılmaktadır. Antioksidan katılmış tuz, et emülsiyonu içinde karışmakta ve böylece yağlı doku içinde çözünmektedir (Altug, 2001).

3.9.7. Balık ve balık ürünleri

Doğal balık yağlarının A ve D vitaminlerince zengindir. Ancak bu vitaminler oksidatif yan ürünleri ile bozulmaktadır. Bu bozulmayı önlemek için antioksidanlar kullanılmaktadır. Vitamin A ve D'nin bozunmasının engellenmesinde BHA, PG ve sitrik asit içeren karışımlar etkili olmaktadır.

Islenmiş hayvansal dokularda, hem yağda çözünebilir (BHA, BHT), hem de suda çözünebilir (askorbik asit, sitrik asit) antioksidanlar acilasmayı engelleyebilmektedir. Ancak bu antioksidanlar özellikle bozunmaya ve raf ömrünün kısalmasına neden olan bakteriler üzerine çok fazla etkili olamamaktadır. Bunun yanı sıra bakterilerin gelişmesini engellemek için

kullanılan ajanlar, bakteri gelişimi ile oluşan indirgen maddelerin üremesini engellediklerinden oksidatif acilasmayı kolaylastırmaktadır. Bu nedenle az miktarda askorbik asit veya suda çözünebilen askorbik asit tuzları bir antioksidan ile beraber kullanıldığında balık dokuları üzerinde oksidatif acilasmanın önlenmesi konusunda etkili olabilmektedir (Altug, 2001).

3.9.8. Uçucu yağlar

Portakal yağı, limon yağı, ve terpen benzeri lezzet verici yağlar, fosfolipidler ve trigliseridler gibi sert radikal oksidasyonuna uğramaktadırlar. Besinlere katılan antioksidanlar, bu yağlarda kullanıldıklarında lezzet ve koku maddelerindeki bozunmaları azaltmakta etkili olmaktadır. Bu amaçla BHA'nin diğer antioksidanlar içerisinde en fazla etkiye sahip olduğu ve genellikle yağın cinsine bağlı olarak yaklaşık %0.3 oranında kullanıldığı ifade edilmektedir. Antioksidanların oksidasyonu engellemek amacı ile uçucu yağlara işlemden hemen sonra ve mümkün olduğu kadar düşük sıcaklıklarda ilave edilmesi gerekmektedir (Altug 2001).

3.9.9. Çiklet hamuru

Çiklet hamurları doymamış bileşenlere sahip polimer ve petrol mumları içermekte ve bu maddeler sürekli oksidasyona maruz kaldıklarında, polimerlerin çapraz bağlanması ile ilişkili olarak oldukça kırılabilir bir yapı oluşmaktadır. Bu şekilde istenilmeyen lezzet ve koku maddeleri oluşabilmekte ve ancak antioksidan kullanımı ile bu tip bozunmalar engellenebilmektedir. BHA ve BHT bu uygulamalarda kullanılan en önemli antioksidanlar olup, çiklet hamurunun üretimi sırasında ilave edilmeleri gerekmektedir (Altug 2001).

4. DENEYSEL ÇALIŞMA

Bu çalışmada Hatay yöresinden elde edilen defne ağacı (*Laurus nobilis* L.) meyvelerinin içermiş olduğu polar bileşiklerinin lipit peroksidasyonunu inhibe edici ve serbest radikal süpürücü etki yönünden antioksidan kapasiteleri incelenmiştir.

Kabuk, meyve içi ve tüm meyve olarak öğütülen örnekler ortalama parçacık boyut analizine tabi tutulduktan sonra, ekstre ve fraksiyon verimlerinin kuru baz üzerinden verilebilmesi için nem tayini yapılmış ve içermiş oldukları sabit yağ petrol eteri ile ekstre edilerek ayrılmıştır. Yağı alınmış kabuk, meyve içi ve tüm meyvenin içermiş olduğu polar bileşikler laboratuvar ölçeğinde soxhlet, 40°C sıcaklıkta ve oda sıcaklığında olmak üzere su, etanol/su, aseton/su çözücülerini ile ekstre edilmiş ve kuru baz üzerinden ekstre verimleri hesaplanmıştır. Ekstreler daha sonra etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuş ve etil asetat ve su fazları elde edilmiştir. Kabuk ve meyve içinden elde edilen ekstratlar daha sonra Sefadex G-25 kolonda Etanol/su çözücü sisteminde polifenolik bileşenlerce zengin fraksiyonlarına ayrılmıştır.

Defne meyvesinden elde edilen ekstratların ve fraksiyonların antioksidan kapasiteleri, lipit peroksidasyonunu inhibe edici yöntemler, Ransimat ve beta-karoten-linoleik asit sistemi, serbest radikal süpürücü etkileri ise DPPH radikali üzerinden tespit edilmiştir.

Etkili ekstre ve fraksiyonların içermiş oldukları polifenollerin toplam miktarları Folin-Chicalcou yöntemi ile bulunmuştur. Ayrıca etkili fraksiyonlar Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-DAD spektrofotometresi (HPLC-DAD) sisteminde analize tabi tutulmuş ve içermiş oldukları fenolik bileşikler (fenolik asit ve flavonoid) cinsinden ekstre profilleri elde edilmeye çalışılmıştır.

4.1. Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Kirici (Retsch SK-1)

Elek sistemi (Retsch AS200)

Vakumlu buharlastırıcı (Büchi R-114)

Çalkalayıcı (Heidolph Vibramax 100)
 Liyafilizatör (Lyovac GT2-Leybold-Heraeus)
 Konsantratör (Eppendorf Concentrator 5301)
 Uv spektrofotometre (Shimadzu, UV-Vis 160)
 Gaz Kromatografisi (HP-6890)
 HPLC (Shimadzu, LC-10A)
 Sefadeks G-25 (Sigma)
 Petrol Eteri (40-60°, Delta Kimya Sanayi)
 Etil alkol (Analitik Saflik, Merck)
 Aseton (Analitik Saflik, Merck)
 Deiyonize su

4.2. Ekstraksiyon İşlemi İçin Defne Meyvelerinin Hazırlanması

Defne meyvelerinin kabukları elle ayrılmış, tüm meyvede bulunan kabuk/meyve içi oranları tartım yolu ile bulunmuştur.

Defne meyvesinin fiziksel özelliklerini belirlemek için 100 g'daki meyve sayısı, boyutları ve meyvenin kabuk/çekirdek oranları incelenmiştir. 100 g'daki meyve sayısını belirlemek için 100 g'lık gruplar halinde oluşturulan 5 gruptaki bütün meyveler sayılmıştır. Yaklaşık 10 adet meyvenin boy ve çapları kumpasla ölçülmüştür. Yine 500'er gramlık iki grup halinde meyvelerin ağırlıkları alınmış ve kabuklarından ayrıldıktan sonra ayrı ayrı kabukları ve meyve içleri tartılmıştır. Böylece kabuk ve çekirdek % oranları belirlenmiştir.

4.3. Boyut Küçültme ve Nem Tayini

Kabuklarından ayrılmış meyve içleri ve tüm meyvenin öğütme işlemi 5,0 mm'lik kirici eleğine sahip kiricida (Retsch SK-1) öğütülmüştür. Kabukları kırma işlemi sırasında kiriciya yapışmış macun kıvamında yağlı kabuk elde edildiği için kırma işlemi havanda elle yapılmıştır. Öğütme işleminden sonra örneklerin ortalama parçacık boyutlarının belirlenmesi için 1,8-0,425 mm gözenek aralığına sahip standart Retsch AS200 elek sisteminde 40 titretilim/s hızda 15

dakika elenmiş ve eleklerin üzerinde kalan materyalin tartılması sonucu elde edilen sonuçlar diferansiyel metot elek analizine tabi tutularak ortalama parçacık boyutları belirlenmiştir.

Kabuk, meyve içi ve tüm meyve örneklerinin nem tayinleri paralel olarak, etüvde 120 °C sıcaklıkta sabit tartıma gelinceye kadar kurutulması ile gerçekleştirilmiştir.

Örneklerin nem tayinleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Nem miktarı \%} = (\ddot{O}.A_1 - \ddot{O}.A_2) \times 100 / \ddot{O}.A_1 \quad (4-1)$$

Burada; $\ddot{O}.A_1$, örnek ağırlığını

$\ddot{O}.A_2$, kurutulduktan sonraki örnek ağırlığını göstermektedir.

4.4. Sabit Yağ Ekstraksiyonu

Kabuk, meyve içi ve tüm meyvede bulunan polar bileşiklerinin ekstraksiyonu işleminde kullanılacak materyallerin sabit yağlarından ayrılması işlemi için Soxhlet cihazı kullanılmıştır. Meyvelerin içermiş olduğu yağ kaynama aralığı 40-60°C olan Petrol Eteri ile Soxhlet cihazında 6 saat ekstre edilmiş ve ekstredeki çözücü 40°C sıcaklık ve 175 Torr basınç altında bir vakumlu buharlaştırıcı (Büchi R-114) yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Paralel olarak ekstre edilen yağ miktarının tartılması suretiyle kuru baz üzerinden yağ verimleri hesaplanmıştır. Yağlarından arındırılmış meyve örneklerinin çözücüleri uzaklaştırılmış ve polar madde ekstraksiyonuna kadar buzdolabında saklanmıştır. Yağsız materyal ihtiyacı olduğunda yağ arındırma işlemi tekrarlanmıştır.

4.5. Polifenollerin Ekstraksiyonu

Defne meyvesinin içermiş olduğu polar bileşikler Soxhlet cihazında (6 saat), oda sıcaklığında karıştırılmalı (24 saat) ve 40 °C'de karıştırılmalı (6 saat) ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak su, etanol/su (%80), etanol/su (%50) ve aseton/su (%80) çözücüleri ile ekstre edilmiştir.

4.5.1. Soxhlet ekstraksiyonu

Ögütülmüş ve sabit yağından uzaklaştırılmış 15'er gram kabuk, meyve içi ve tüm meyve etanol:su (80:20) çözücüsü ile 6 saat boyunca ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstrelerin etil alkolleri vakumlu buharlastiricida, 40°C sıcaklıkta uzaklaştırılmış, kalan sulu kısım dondurularak liyofilizatörde suyu uzaklaştırılmıştır. Suyu uzaklaştırılan ekstrelerin miktarları tartılmış ve kuru baz üzerinden ekstre verimleri hesaplanmıştır. Ekstraksiyon işlemleri paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

4.5.2. Oda sıcaklığında karistirmali ekstraksiyon

10'ar gram yagsız kabuk ve meyve içi 100 ml etil alkol:su (80:20) çözücüsü ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca çalkalayıcıda (120 kez/dakika) ekstre edilmiştir. Elde edilen ekstrelerin etil alkolleri vakumlu buharlastiricida, 40°C sıcaklıkta uzaklaştırılmış, kalan sulu kısım dondurularak liyofilizatörde suyu uzaklaştırılmıştır. Suyu uzaklaştırılan ekstrelerin miktarları tartılmış ve kuru baz üzerinden ekstre verimleri hesaplanmıştır. Ekstraksiyon işlemleri paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

4.5.3. 40°C sıcaklıkta karistirmali ekstraksiyon

5'er gram yağı alınmış ve öğütülmüş kabuk ve meyve içi örnekleri 40°C sıcaklıkta karistirmali su banyosunda ayrı ayrı 50 'ser ml etil alkol:su (80:20), etil alkol:su (50:50) ve aseton:su (80:20) çözücü karışımları kullanılarak 30 dakika boyunca ekstre edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış süzülen sıvı kısımlar birleştirilerek organik çözücülerini 40°C'de vakumlu buharlastiricida uzaklaştırılmıştır. Kalan sulu kısım dondurularak liyofilizatörde suyu uzaklaştırılmıştır. Suyu uzaklaştırılan ekstrelerin miktarları tartılmış ve kuru baz üzerinden ekstre verimleri hesaplanmıştır.

Kabuk ve meyve içleri aynı yöntemle bu kez su ile 3 saat boyunca ekstre edilmiş, sulu ekstre süzölmüş ve kalan drog su ile iki kez daha ekstre edilmiştir.

Sulu ekstreler birleştirilerek liyofilizatörde suyu uzaklaştırılmış ve ekstre verimleri hesaplanmıştır.

4.6. Polifenol Ekstrelerinin Fraksiyonlanması

Elde edilen ham ekstrelerin polifenol bakımından zenginleştirilmesi sivi-sivi ekstraksiyonu ve Sefadeks kolonda jel kromatografisi yöntemleri kullanılarak fraksiyonlarına ayrılması ile gerçekleşmiştir.

4.6.1. Sivi-sivi ekstraksiyonu ile fraksiyonlarına ayırma

Soxhlet yöntemi ile elde edilen kabuk ve meyve içi ekstre örneklerinin fraksiyonlanması, organik çözücüsü uzaklaştırılmış sulu kısımların etil asetat ile sivi sivi ekstraksiyonuna tabi tutulması ile gerçekleşmiştir. Bu işlemde sulu faz 20 ml etil asetat (EtOAc) ile 3 kez ekstre edilmiş ve daha sonra EtOAc fazları birleştirildikten sonra EtOAc uzaklaştırılmıştır. Kalan kuru kısımların tartımları alınarak EtOAc fazına geçen ekstre miktarları belirlenmiştir. Sivi-sivi ekstraksiyonundan ayrılan sulu kısım ise dondurularak liyofilizatörde suyunun uzaklaştırılması sonucu kurutulmuş sulu ekstre tartımları alınarak sulu kısma geçen ekstre miktarı belirlenmiştir (Çizelge 5.1).

4.6.2. Sefadeks kolonda fraksiyonlarına ayırma

Polifenollerin fraksiyonlanması Sefadeks kolonda yapılmıştır (Wang ve Lee 1996 ; Strumeyer ve Malin, 1975). 25 g Sefadeks G-25 (Sigma) jeli 50 ml %96'lik etil alkolde 1 gece sismesi için bekletilmiş ve 1,5 cm çaplı 30 cm uzunluktaki cam kolona doldurulmuş ve dolgu materyalinin kolonun %80'ini doldurduğu gözlenmiştir. Kolondan geçen çözücü akış hızı yaklaşık olarak 0,4 ml/dk ye ayarlanmıştır. %80'lik etil alkol ile Soxhlet ekstraksiyonu sonucu elde edilen kabuk ve meyve içi ekstreleri apolar bileşiklerinden kurtulması için önce 3 kez dietil eter ve 3 kez de petrol eteri ile ekstre edilmiş ve kalan ekstre çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Kurutulan ekstrelerden yaklaşık 0,5 gram alınıp 5 ml

%96'lik EtOH'da çözülmüş ve kolon kromotografisine uygulanmıştır. Elüsyon işlemine %96 lik EtOH (70 ml) ile başlanmış ve işlem metanol (25 ml) ve aseton:su (50:50, 20 ml) ile sonlandırılmıştır. Kolonun altından 3'er ml fraksiyonlar toplanmış ve her fraksiyonun 280, 360 ve 520nm'lerde absorbanları ölçülerek, ölçülen dalga boylarındaki benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. Elde edilen sıvı fraksiyonların çözücüleri 45°C sıcaklıkta vakumda konsantratör cihazında uzaklaştırılmış ve kurutulmuş örneklerin miktarları belirlenmiş ve -18°C'de muhafaza edilmiştir.

4.6.3. Hidroliz

Bitkilerde polifenoller serbest halde bulunabildikleri gibi daha çok oksijen veya karbon glikozitleri halinde de bulunurlar. Oksijen glikozitlerinin asidik veya bazik ortamda hidroliz edilmeleri ile serbest fenolik ve seker bilesiklerinin ayrilmaları gerçekleştirilebilir. Bu çalışmada da defne kabuk ve meyve ekstralarının içermiş oldukları fenolik bilesiklerin yapılarını öngörebilmek üzere asidik ve bazik ortamda hidrolizi yapılmış ve ürünlerin HPLC-DAD analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.6.3.1. Asit hidroliz

Yağı alınmış meyve içi ve kabuk örnekleri (3 g) 90 ml %50 metanol içinde 1 M HCl ile 30 dakika boyunca geri soğutuculu balonda hidroliz edilmiş ve süzgeç kagidından süzülerek ekstre ayrılmıştır. Ekstre içindeki metanol vakumlu buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan sulu ekstre etil asetat ile ekstre edilmiştir. Etil asetat fazları birleştirilerek etil asetat çözücüsü vakumlu buharlaştırıcıda, kalan sulu kısmın suyu ise liyafilizatörde uzaklaştırılmış ve miktarları belirlenmiştir.

4.6.3.2. Alkali hidroliz

Yagi alınmış meyve içi ve kabuk örnekleri (3 g) 90 ml 2M NaOH çözeltisi ile 30 dakika boyunca geri soğutuculu balonda hidroliz edilmiş ve süzgeç kagidından süzülerek ekstre ayrılmıştır. Ekstre içindeki metanol vakumlu buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan sulu ekstre etil asetat ile ekstre edilmiştir. Etil asetat fazları birleştirilmiş, etil asetat çözücüsü vakumlu buharlaştırıcıda uzaklaştırılmıştır. Kalan sulu kısmın suyu ise liyofilizatörde uzaklaştırıldıktan sonra ekstrelerin miktarları belirlenmiştir.

4.7. Defne Yaginin Karakterizasyonu

Defne meyvelerinin kabuk, meyve içi ve tüm meyvelerinin sabit yağlarının içermiş oldukları yağ asidi bileşenlerinin belirlenmesi, yağ asitlerinin esterleştirilmesinden sonra Gaz Kromatografisi sisteminde gerçekleştirilmiştir.

4.7.1. Yağ asitlerinin esterleştirilmesi

Defne kabuk, meyve içi ve tüm meyve sabit yağlarının yağ asitlerinin esterleşmesi örneklerin hacimce %35 BF₃/MeOH (%12 BF₃), %45 MeOH ve %29 heksandan oluşan çözücü karışımı ile geri soğutucu altında 45 dk kaynatılması sonucu gerçekleştirilmiştir. Oluşan esterler heksan ile ekstre edilmiş ve susuz Na₂SO₄'a süzülerek heksan uçurulmuş ve Gaz Kromatografisinde analize hazır hale getirilmiştir.

4.7.2. Yağ asitlerinin gaz kromatografisinde analizi

Yağ asidi metil esterleri Alev İyonizasyon Dedektörü (FID) kullanılarak Hewlett Packard 6890 Gaz Kromatografisi sisteminde analiz edilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak azotun kullanıldığı yöntemde, yağ asitleri HP-Innowax FSC kolonda (60 m x 0,25 mm iç çap, film kalınlığı 0,25 µm) ayrılmıştır. Dedektör sıcaklığı ve enjeksiyon sıcaklığı 250 °C'a ve split oranı ise 60:1 olarak ayarlanmıştır. Kolon

sicakligi 10 dk 60 °C'de tutulmuş ve 4 °C/dk hızda 220 °C'a çıkartılmış ve 10 dk bu sıcaklıkta sabit kaldıktan son sıcaklık olan 240 °C'ye 1 °C/dk hızda ulaşılmıştır.

4.8. Toplam Fenol Miktar Tayini

Ekstreler ve fraksiyonlar içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemine (Gamez-Meza, 1999) göre yapılmıştır. Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit %70'lik metanolde çözülmüştür.

Hazırlanmış tüm ekstrelerin içindeki toplam fenol miktarı gallik asit referans maddesi kullanılarak yapılmıştır. 10,6 mg Gallik asit 50 ml %70'lik metanolde çözülmüş (0,212 mg/ml) ve bu çözeltilerden 0,0212-0,212 mg/ml aralıkta seyreltmeler yapılmıştır. 0.5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış ekstre ve fraksiyonlardan 0,025 ml alınarak üzerlerine 0,5 ml Folin Ciocalteu ve 1,5 ml sodyum bikarbonat çözeltileri ilave edilerek karıştırılmış 2 saat oda sıcaklığında bekletilen örneklerin 750 nm'de absorbanları UV-Vis Spektrofotometrede (Shimadzu 160) ölçülmüştür. Toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Üçer kez tekrarlanan ölçümlerde sonuçlar ortalama değer cinsinden verilmiştir.

4.9. Fenolik Bileşiklerin Yüksek Basınçlı Sivi Kromatografisi (YBSK) Analizi

Kabuk, meyve içi, tüm meyveden elde edilen ekstrelerin ve fraksiyonların içermiş oldukları fenolik bileşikleri YBSK-DAD sistemi (Shimadzu LC10 AVp), ve otomatik enjektör (Shimadzu) kullanılarak analiz edilmiştir. Ters faz C₁₈ (Nucleosil, 250 x 4,6 mm; partikül çapı 5 µm ve 2x4,6 mm, 5 µm partikül boyutlu ön kolon ile beraber) kolonu kullanılmıştır. Çözücü A, metanol:su:asetik asit (10:88:2, hacimce yüzde oran) ve çözücü B, metanol:su:asetik asit (90:8:2, hacimce yüzde oran) gradient sistemi fenolik asitler ve flavonlar için hareketli faz olarak kullanılmıştır. Gradient programı 0'dan %15 B'ye 15 dakikada, 15'den %50 B'ye 5 dakikada, 50'den %70 B'ye 9 dakikada 70'den %100 B'ye 6 dakikada artırılmış ve 5 dakikada da başlangıç konsantrasyonuna dönmüştür. 1 ml/dk akış hızı kullanılmış ve bileşiklerin 250-

520 nm'ler arasında DAD spektrumları alınmış ve değerlendirmeler standart fenolik asit ve flavonoid bileşenlerinin alikona (tR) zamanları ve spektral değerleri ile karşılaştırılarak yapılmıştır.

4.10. Antioksidan Aktivite Tayinleri

4.10.1. Ransimat yöntemi

Defne meyvesi kabuk ve meyve içi ekstralarının ve sentetik antioksidan olarak kullanılan BHT nin antioksidan aktiviteleri yağlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan bozunma ürünlerinin su içine absorbe edilerek suyun iletkenliğinin değişmesi prensibine göre çalışan Ransimat cihazı ile test edilmiştir. Bu testte linoleik asitçe zengin (%60-65) ham zeytin yağı kullanılmıştır. 3 g yağ içine %0,02 ve 1'lik olacak şekilde numune ilave edilerek yağ içerisinde dağılması sağlanmıştır. 110 °C'de, 20 lt/saat hava akısına maruz bırakılan kontrol (yağ) ve numunelerin (yağ+numune) inkübasyon zamanları ölçülerek örneklerin antioksidan aktiviteleri, İndüksiyon İndislerinden (Induction Index, I.I.= $I_{\text{numune}}/I_{\text{kontrol}}$) hesaplanmıştır. Bu formüle göre indüksiyon zamanları kontrole oranla büyük olan numunelerin antioksidan aktivitelerinin daha fazla olduğu görülmektedir (Joaquin vd., 2004).

4.10.2. Serbest radikal süpürücü etki yöntemi

Ekstrelerin ve fraksiyonların DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno (1998) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. 3'er ml 5×10^{-5} M metanollü DPPH çözeltisine metanol içinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan ekstre çözeltilerinden 100 µl, 200 µl ve 400 µl oranlarında ilave edilmiştir. Kontrol için aynı miktarlarda metanol kullanılmıştır. Karışım 30 saniye karıştırılmış ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 30 dk sonunda 517 nm'de absorbans değerleri okunarak ortamda kalan DPPH konsantrasyonu

üzerinden % inhibisyon degerleri asagidaki formüle göre hesaplanmistir. Deneyler üçer kez tekrarlanarak ortalama degerler kullanilmistir.

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (4-2)$$

Burada; A_{kontrol} , kontrol çözeltisinin absorbans degerini

$A_{\text{örnek}}$, örnek çözeltisinin absorbans degerini göstermektedir.

4.10.3. Beta karoten -linoleik asit sistemi

10,2 mg beta-karoten 3 ml kloroform içinde çözülmüş ve kloroform azot gazı altında uzaklaştırıldıktan sonra 39,5 mg Linoleik asit ve 404,6 mg Tween 80 ilave edilmiş ve karışım oksijen ile doyurulmuş distile su ile 100 ml ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltinin 3 ml' sine 0,2 mg /ml metanolde hazırlanan ekstre ve fraksiyon örneklerinden 200 µl ilave edilmiştir. Hazırlanan çözeltiler 50 °C sıcaklıkta etüvde inkübe edilmiş ve 15'er dk aralıklarla toplam 120 dk 470 nm'de suya karşı absorbans degerleri okunmuştur. Aynı işlem numune içermeyen kontrol çözeltisi ile de gerçekleştirilmiştir. Zamana karşı beta-karoten konsantrasyonundaki bozunma grafiğe geçirilerek kontrol grubuna göre aktivite içeren ekstreler belirlenmiştir (Martinez-Tome, 2001; Wettasinghe ve Shahidi, 1997).

5. DENEYSEL BULGULAR

5.1. Boyut Küçültme ve Nem Tayini

Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan defne meyvelerinin kabuk ve meyve içi ve tüm meyvelerin ortalama tanecik boyutunun belirlenebilmesi amacıyla yapılan öğütme işlemi sonucunda ortalama tanecik boyutu diferansiyel elek analizi sonucunda hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Kabuk, meyve içi ve tüm meyvenin ortalama tanecik boyutları (n=1)

Kisim	Ortalama tanecik boyutu (cm)
Kabuk	0,113
Meyve İçi	0,096
Tüm Meyve	0,108

Kabuk, meyve içi ve tüm meyve örneklerinin nem tayinleri paralel olarak, etüvde 120 °C sıcaklıkta sabit tartıma gelinceye kadar kurutulması ile gerçekleştirilmiş ve ortalama nem tayini sonuçları Çizelge 5.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2. Kabuk , meyve içi ve tüm meyvenin % nem miktarları (n=2)

Kisim	Ortalama % Nem
Kabuk	4,40 ± 0,2
Meyve İçi	8,42 ± 0,3
Tüm Meyve	6,88 ± 0,2

5.2. Sabit Yağ Ekstraksiyonu

Soxhlet aparatında petrol eteri ile kabuk, meyve içi ve tüm meyvenin sabit yağlarının ekstre edilmesi sonucu elde edilen yağ verimi Çizelge 5.3’de verilmiştir.

Çizelge 5.3. Kabuk ve meyve içinin ve tüm meyve sabit yağ verimleri (n=2)

Kisim	Ortalama % Yağ
Kabuk	40,97 ± 0,1
Meyve İçi	25,87 ± 0,1
Tüm meyve	36,87 ± 0,4

5.3. Polifenollerin Ekstraksiyonu

Defne kabuk, meyve içi ve tüm meyvenin çeşitli ekstraksiyon yöntemleri ve çözücüler kullanılarak ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların kuru baz üzerinden hesaplanan verimleri Çizelge 5.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.4. Çözücü ve ekstraksiyon yönteminin polifenol ekstre verimine etkisi (n=2) (%)

No	Ekstraksiyon yöntemi	Kabuk	Meyve içi	Tüm meyve
1	Soxhlet %80 EtOH, 6 sa	16,25±1,80	23,35±1,30	17,24±0,90
2	Su, 3 hx3, 40°C, 100 ml karıstırmalı	13,40±1,78	13,60±1,90	-
3	%80 EtOH, 24 saat, karıstırmalı, oda sıcaklığı	12,70±1,50	9,48±1,40	-
4	%80 EtOH, 30dkx3, karıstırmalı, 40°C	6,17±0,10	9,20±1,40	-
5	%80 Aseton, 30dkx3, karıstırmalı, 40°C	6,88±0,40	13,01±0,40	-
6	%50 EtOH, 30dkx3, karıstırmalı, 40°C	10,98±0,50	20,63±1,00	-

5.4. Sivi-Sivi Ekstraksiyonu ile Fraksiyonlarına Ayırma

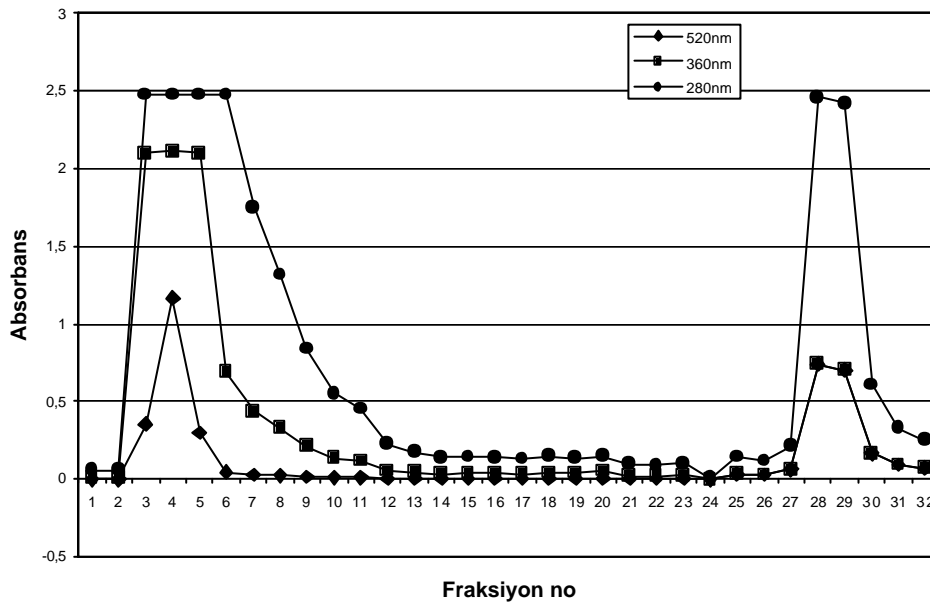
Soxhlet cihazında %80 etanol ile yapılan ekstraksiyon işleminde elde edilen ekstraktlar organik çözücülerini uzaklaştırıldıktan sonra fenolik maddece zengin fraksiyonlar elde etmek üzere etil asetat ile sivi-sivi ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Toplam ekstraktın etil asetat fazına geçen ve suda kalan yüzde miktarları Çizelge 5.5'de verilmektedir.

Çizelge 5.5. Toplam ekstrede sulu ve etil asetat fraksiyonlari miktarlari

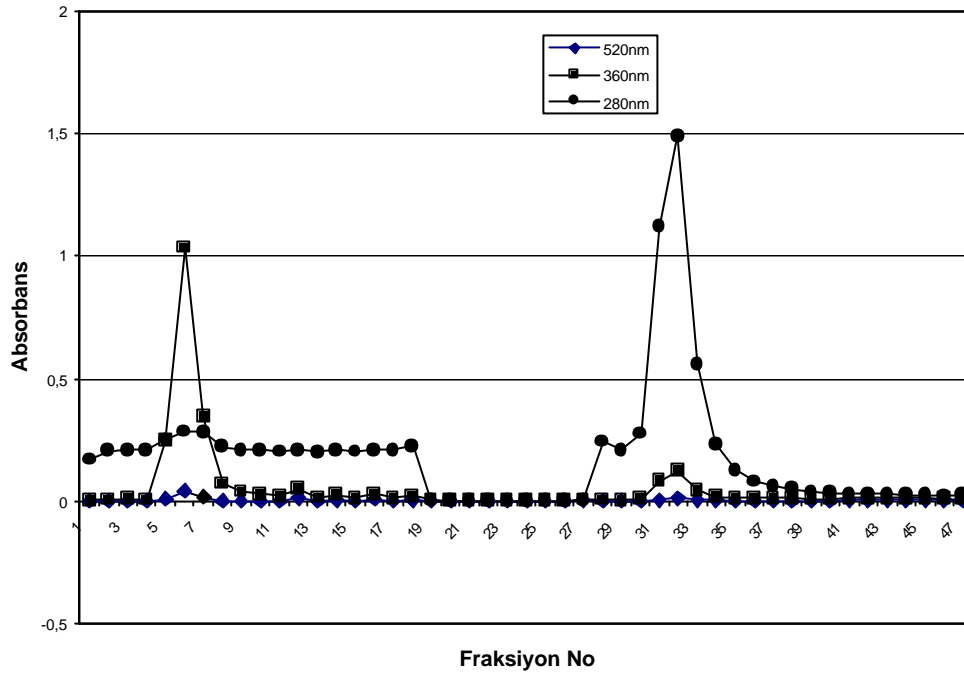
Ekstre	A-Su (%)	B-EtOAc (%)
Kabuk	95,9	4,1
Meyve içi	91,3	8,7
Tüm meyve	95,4	4,6

5.4.1. Sefadeks kolonda fraksiyonlarına ayırma

Kabuk ve meyve içlerinin Soxhlet cihazından %80 Etanol kullanılarak Sefadeks G-25 kolonda fraksiyonlarına ayrılmış ve toplanan fraksiyonların birleştirilmesi 280 nm, 360 nm ve 520 nm lerdeki absorbands değerlerine göre yapılmıştır. Kabuk ve meyve içi ekstralarının 280, 360 ve 520 nm lerdeki fraksiyon-absorbans eğrileri Sekil 5.1 ve 5.2’de, toplanan fraksiyonlar ise Çizelge 5.5’te verilmiştir.



Sekil 5.1. Kabuk ekstrasınınin 280, 360 ve 520 nm’lerde Sefadeks kolondan alınan fraksiyonların absorbands eğrisi



Sekil 5.2. Meyve içi ekstresinin 280, 360 ve 520 nm’lerde Sefadeks kolondan alınan fraksiyon-absorbans eğrisi

Çizelge 5.6. Kabuk ve meyve içi ekstralarının Sefadeks kolonda fraksiyonlanması sonucu birleştirilen örnekler ve fraksiyon numaraları

Kabuk			Meyve İçi		
Örnek Kodu	Fraksiyon No	Çözücü Sistemi	Numune Kodu	Fraksiyon no	Çözücü Sistemi
K1	1-2	%96 EtOH	M1	1-4	%96 EtOH
K2	3	%96 EtOH	M2	5	%96 EtOH
K3	4	%96 EtOH	M3	6-8	%96 EtOH
K4	5	%96 EtOH	M4	9-18	%96 EtOH
K5	6-8	%96 EtOH	M5	19-26	%96 EtOH
K6	9-11	%96 EtOH	M6	27-30	MeOH
K7	12-23	%96 EtOH	M7	31	MeOH
K8	24-27	MeOH	M8	32	MeOH
K9	28-29	MeOH	M9	33	MeOH
K10	30-32	MeOH	M10	34-47	MeOH

5.4.2. Polifenollerin hidrolizi

Kabuk ve meyve içi örneklerindeki glikozit yapısındaki polifenoller asidik ve bazik ortamda hidroliz edilerek serbest (aglikon) formları elde edilmiş

ve serbest fenoller etil asetat ile ekstraksiyon edilerek ekstraksiyon verimleri kuru baz üzerinden Çizelge 5.7’de verilmiştir.

Çizelge 5.7. Kabuk ve meyve içi örneklerinin hidroliz verimleri (n=1)

	% verim (kuru baz)			
	Asit hidroliz		Alkali hidroliz	
	A-Su	B-EtOAc	A-Su	B-EtOAc
Kabuk	13,92	4,07	17,46	1,60
Meyve içi	12,08	1,20	19,94	1,71

5.5. Defne Meyvesi Sabit Yağı Karakterizasyonu

Defne meyvelerinin kabuk, meyve içi ve tüm meyvelerinin sabit yağlarının içermiş oldukları yağ asidi bileşenlerinin belirlenmesi, yağ asitlerinin esterleştirilmesinden sonra Gaz kromatografisi sisteminde gerçekleştirilmiştir. Ana bileşenler cinsinden yağ asitleri bileşimleri Çizelge 5.8’de gösterilmiştir.

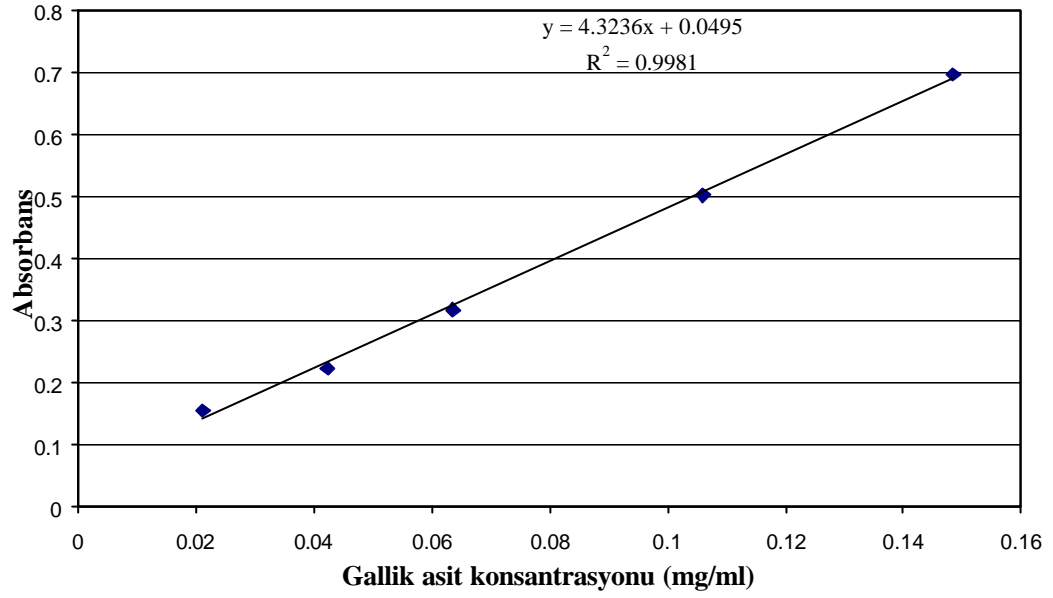
Çizelge 5.8. Defne meyvesi sabit yağı bileşimi (%) (n=1)

Yağ asidi	Kabuk	Meyve içi	Tüm meyve
Oleik asit	52,94	17,36	38,88
Palmitik asit	20,84	6,39	17,23
Linoleik asit	19,48	18,91	18,31
Stearik asit	1,62	0,90	1,47
Linolenik asit	1,07	0,38	0,88
Laurik asit	0,16	50,21	20,36
Miristik asit	0,12	1,56	0,75

5.6. Toplam Fenol Miktar Tayini

Toplam fenol miktar tayinleri gallik asit referans maddesi kullanılarak yapılmış ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan gallik asidin Folin-Ciocalteu reaktifi ile Na₂CO₃ ortamında oluşturulan reaksiyon sonucu oluşan rengin 750 nm de ölçülen absorbans değerleri konsantrasyona karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 5.3) ve hazırlanan örneklerdeki toplam fenol miktarı bu grafik kullanılarak gallik asit

cinsinden hesaplanmıştır (Çizelge 5.9). Sefadeks kolondan alınan fraksiyonların içermiş olduğu fenolik madde miktarı ise Şekil 5.4’de gösterilmiştir.



Şekil 5.3. Gallik asit konsantrasyonu-absorbans kalibrasyon doğrusu

Çizelge 5.9. Defne meyvesi kabuğu ve meyve içi ekstre ve fraksiyonlarında toplam fenol miktarı (mg GAE/g örnek)^a (n=3)

Kabuk		
Ekstraksiyon tipi	Ekstre/Fraksiyon	Toplam fenol ^b
1	E	14,63±0,45
1	Et	14,52±0,32
2	E	14,24±0,30
3	E	14,42±0,20
4	E	14,24±0,23
5	E	16,81±0,50
6	E	16,53±0,50
7	Et	16,34±0,50
8	Et	15,80±0,20
Meyve İçi		
1	E	23,30±0,20
1	Et	23,38±0,10
2	E	23,38±0,20
3	E	23,48±0,40
4	E	23,30±0,50
5	E	23,90 ±0,20
6	E	24,03±0,40
7	Et	23,32±0,60
8	Et	24,43±0,50

¹ Soxhlet %80 EtOH, 6 sa - ²Su, 3 hx3, 40°C, 100 ml karistirmali-

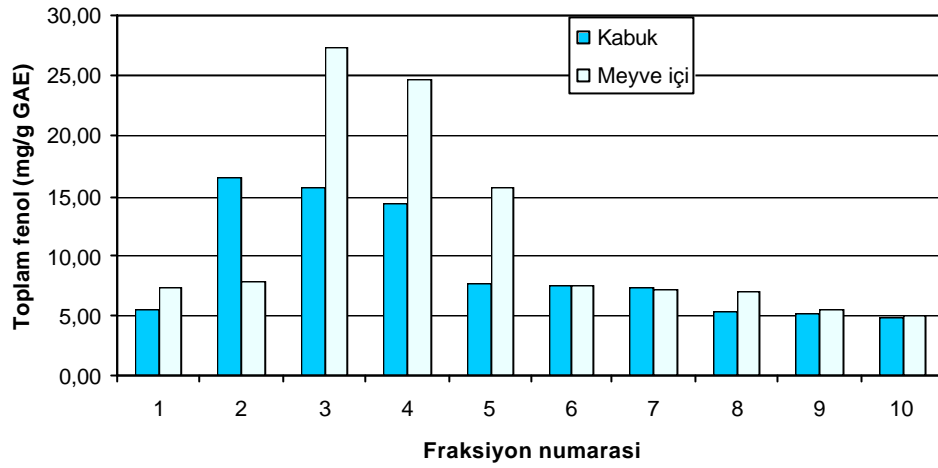
³%80 EtOH, 24 saat, karistirmali, oda sicakligi-⁴%80 EtOH, 30dkx3, karistirmali, 40°C-

⁵%80 Aseton, 30dkx3, karistirmali, 40°C-⁶%50 EtOH, 30dkx3, karistirmali, 40°C-⁷Asit

hidroliz-⁸ Alkali hidroliz

^aToplam fenolik madde içeriği gallik asit (GAE) esdegeri cinsinden verilmiştir.

^bortalama±standart sapma (n=4). E: Toplam Ekstre, Et: Etil asetat fraksiyonu



Sekil 5.4. Defne meyvesi kabuğu ve meyve içi %80 etanollü ekstralarının Sefadex G-25 kolonda elde edilen fraksiyonlarında toplam fenol miktarı (mg GAE/g örnek) (n=3)

5.7. Defne Meyvesinde Antioksidan Aktivite Tayini

5.7.1. Ransimat yöntemi

Defne meyvesi kabuk, meyve içi ve toplam meyveden elde edilen ekstraların ve fraksiyonların %0,02 ve %1 konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltilerinin Ransimat yöntemi ile ham zeytin yağının oksidasyonunu inhibe edici etkileri, Bozunma Indisleri cinsinden (Induction Index, I.I.= $I_{\text{numune}}/I_{\text{kontrol}}$) Çizelge 5.9'da verilmistir. Zeytin yağı 5,50 ($\pm 0,4$) saatte bozunmustur.

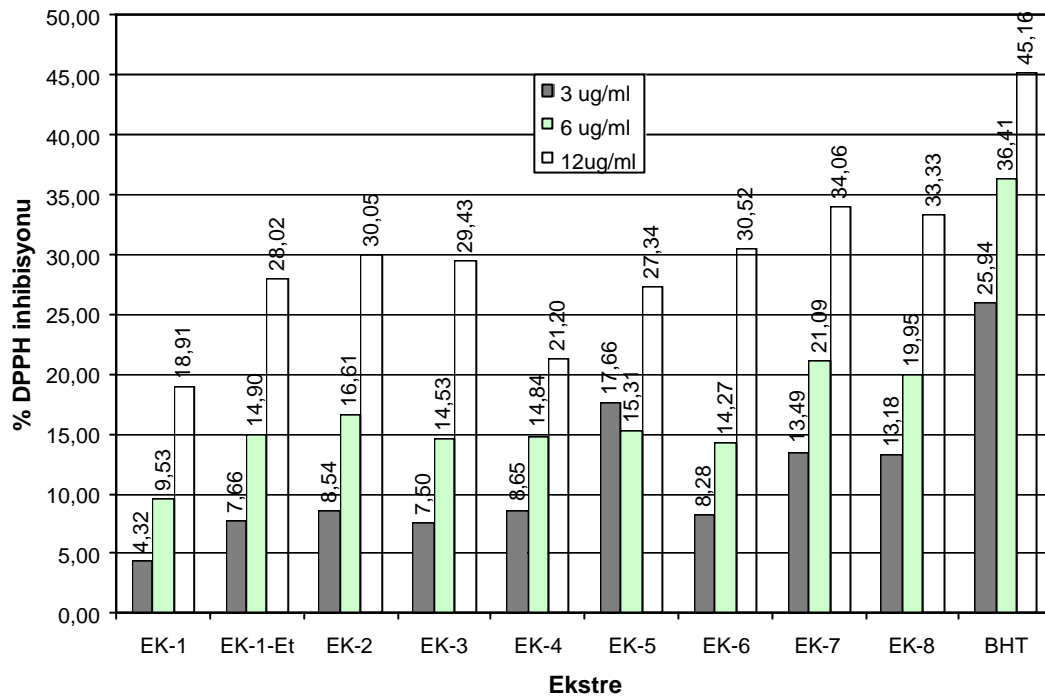
Çizelge 5.10. Defne meyvesinden elde edilen ekstrelerin ve sentetik antioksidanların %0,02 ve %1 konsantrasyonlarda Ransimat yöntemi kullanılarak zeytin yağının oksidasyonunu inhibe edici aktivitesi*

Ekstre	Bozunma indisi (I.I.= $I_{\text{numune}}/I_{\text{kontrol}}$)			
	Kabuk		Meyve içi	
	0,02 %	1,00 %	0,02 %	1,00 %
1	1,09	1,17	1,30	1,19
1Et	1,00	1,12	1,19	1,88
2	1,02	1,15	1,13	2,24
3	1,11	1,26	1,00	2,89
4	-	1,20	-	-
5	-	1,21	-	1,80
6	-	1,18	-	1,74
7	-	1,25	-	1,74
8	-	1,22	-	1,75
Toplam meyve (1 Et)	1,27	2,03	-	-
BHT	1,05	2,83	-	-
BHA	1,73	2,19	-	-

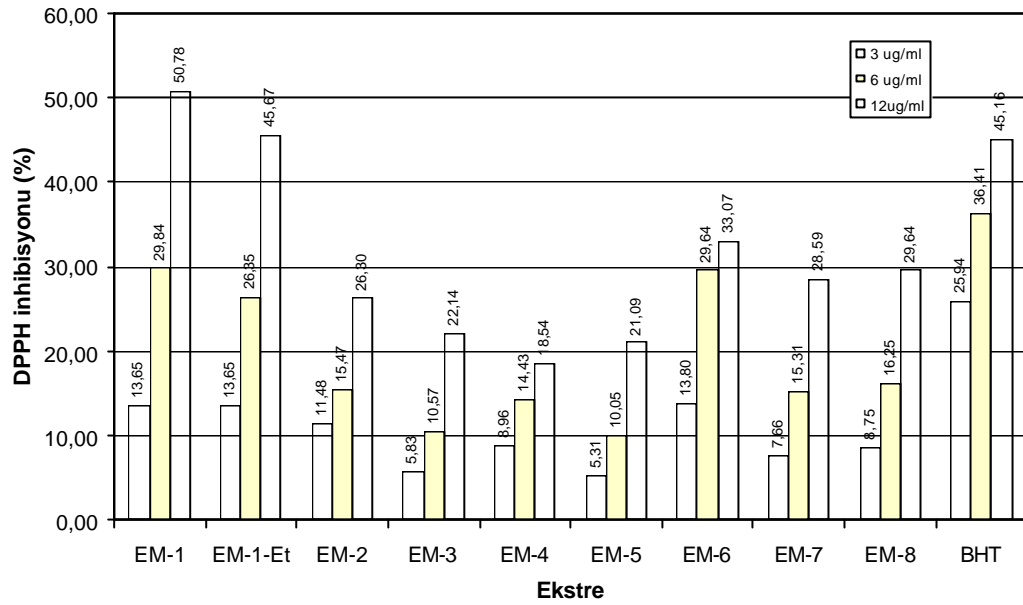
*Ekstraksiyon tipi Çizelge 5.8 de verildiği gibidir.

5.7.2. DPPH

Defne meyvesi kabuk, meyve içinden elde edilen ekstrelerin/fraksiyonların ve sentetik antioksidan olarak kullanılan BHT nin 3 µg/ml, 6 µg/ml ve 1,2 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin DPPH serbest radikalini inhibe edici etkileri Şekil 5.5 ve 5.6'da verilmistir.



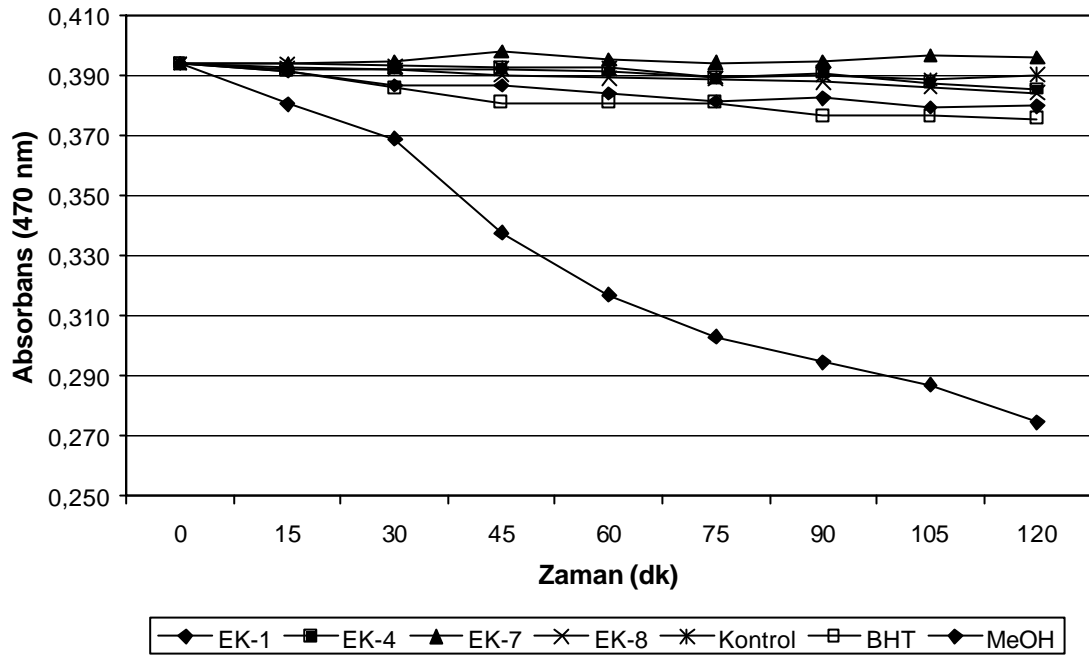
Şekil 5.5. Defne meyvesi kabukundan elde edilen ekstre ve fraksiyonların DPPH üzerinde serbest radikal süpürücü etkileri (n=3)



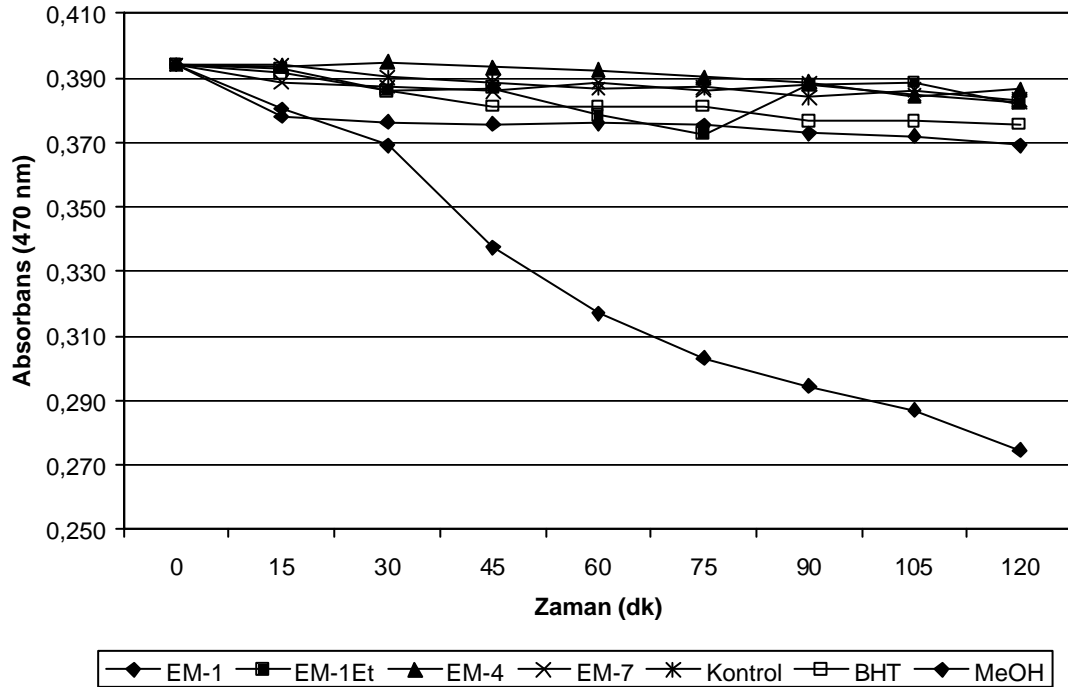
Sekil 5.6. Defne meyvesi, meyve içinden elde edilen ekstre ve fraksiyonların DPPH üzerinde serbest radikal süpürücü etkileri (n=3)

5.7.3. Beta karoten ve linoleik asit model sistemi

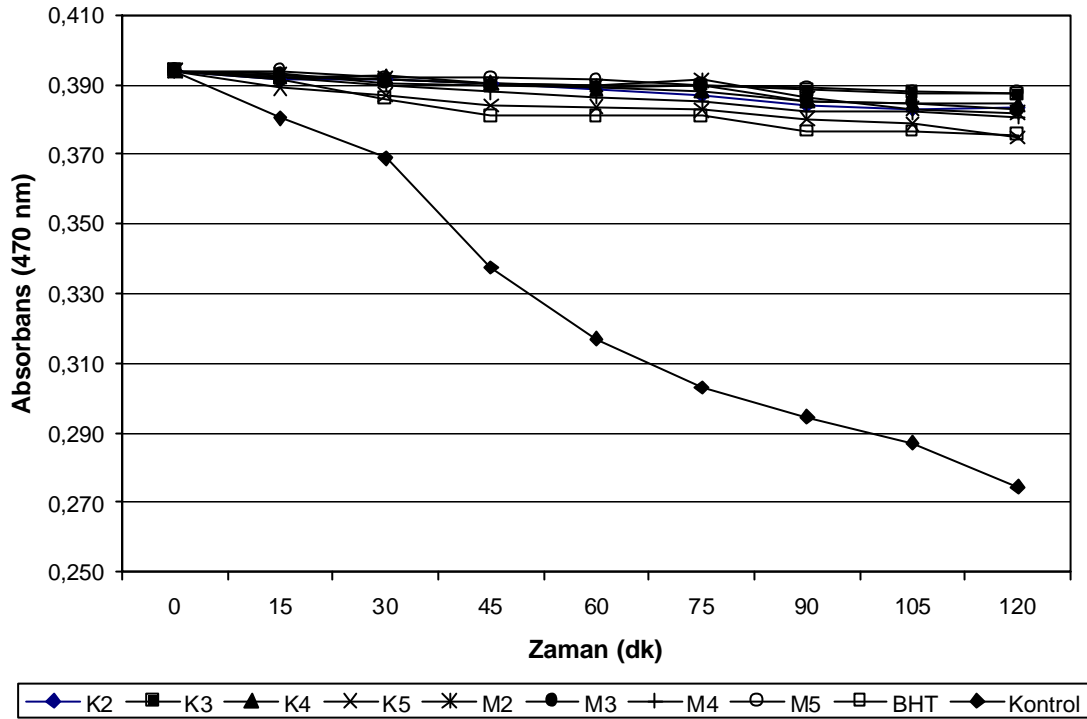
Defne meyvesi kabuk, meyve içinden elde edilen ekstrelerin/fraksiyonların, kontrol ve sentetik antioksidan olarak kullanılan BHT nin beta-karoten linoleik asit sisteminde beta-karotenin soldurmasını inhibe edici etkileri Sekil 5.7, 5.8 ve 5.9’da verilmiştir.



Sekil 5.7. Defne meyvesi, kabuktan elde edilen ekstratların beta-karoten linoleik model sistemi üzerindeki inhibe edici etkileri (n=3)



Sekil 5.8. Defne meyvesi, meyve içinden elde edilen ekstratların beta-karoten linoleik model sistemi üzerindeki inhibe edici etkileri (n=3)



Şekil 5.9. Defne meyvesi, meyve içinden elde edilen %80 etanolü ekstralarının safadeks kolonda elde edilen beta-karoten linoleik model sistemi üzerindeki inhibe edici etkileri (n=3)

5.7.4. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK) analizi

Defne meyvesinin kabuk ve meyve içinin çeşitli çözücülerle ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraların, hidroliz ürünlerinin ve fraksiyonlarının fenolik bileşik profillerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan YBSK analizleri 280, 320 ve 360 nm dalga boylarında, ters faz kolonda gerçekleştirilmiştir. Üç dalga boyunun seçilmesinin nedeni farklı fenolik grupların farklı dalga boylarında maksimum absorbans vermelerinden dolayıdır. Ticari olarak sağlanan standart fenolik bileşenlerin 220-480 nm dalga boyu aralığında Diode Array Spektral değerlerinin analizleri sonucu, benzoik asit (BA) türevi fenolik bileşenlerin 280 nm de, sinamik asit (SA) türevlerinin 320 nm de ve flavonoid (Fl) türevlerinin 360 nm de maksimum absorbans gösterdikleri gözlemlenmiştir. Bu amaçla ekstre ve fraksiyonlar içindeki fenolik bileşenler benzoik asit türevleri, sinamik asit türevleri ve flavonoidler olarak üç grup dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

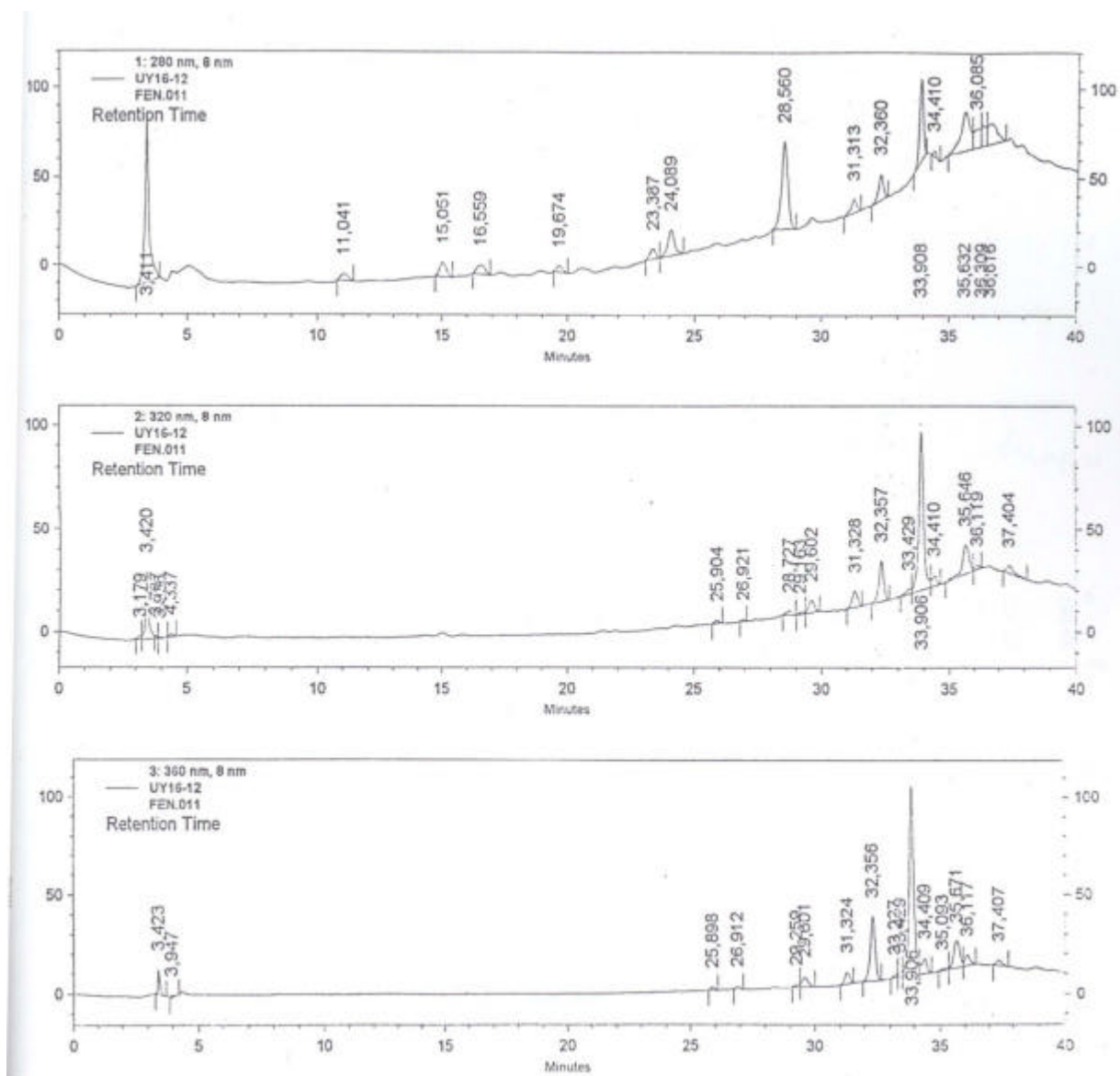
Ekstre ve fraksiyonların YBSK-DAD analizleri sonucunda bazı bileşen piklerinin alikonma ve absorban değerlerinin standart bileşen değerleri ile uygunluk göstermesine rağmen doğada en az 4000 fenolik bileşen olduğu göz önüne alınarak kesin bir isimlendirme yapılmasının doğru olmayacağı düşünülerek sadece ekstraların içerdiği fenolik bileşen grupları belirlenmiştir.

Çalışmada tüm ekstre ve fraksiyonlar analiz edilmesine rağmen fenolik bileşikçe zengin olanlar değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Sefadeks kolondan ayrılan fraksiyonların da analizleri yapılarak bileşen gruplarının daha sağlıklı değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

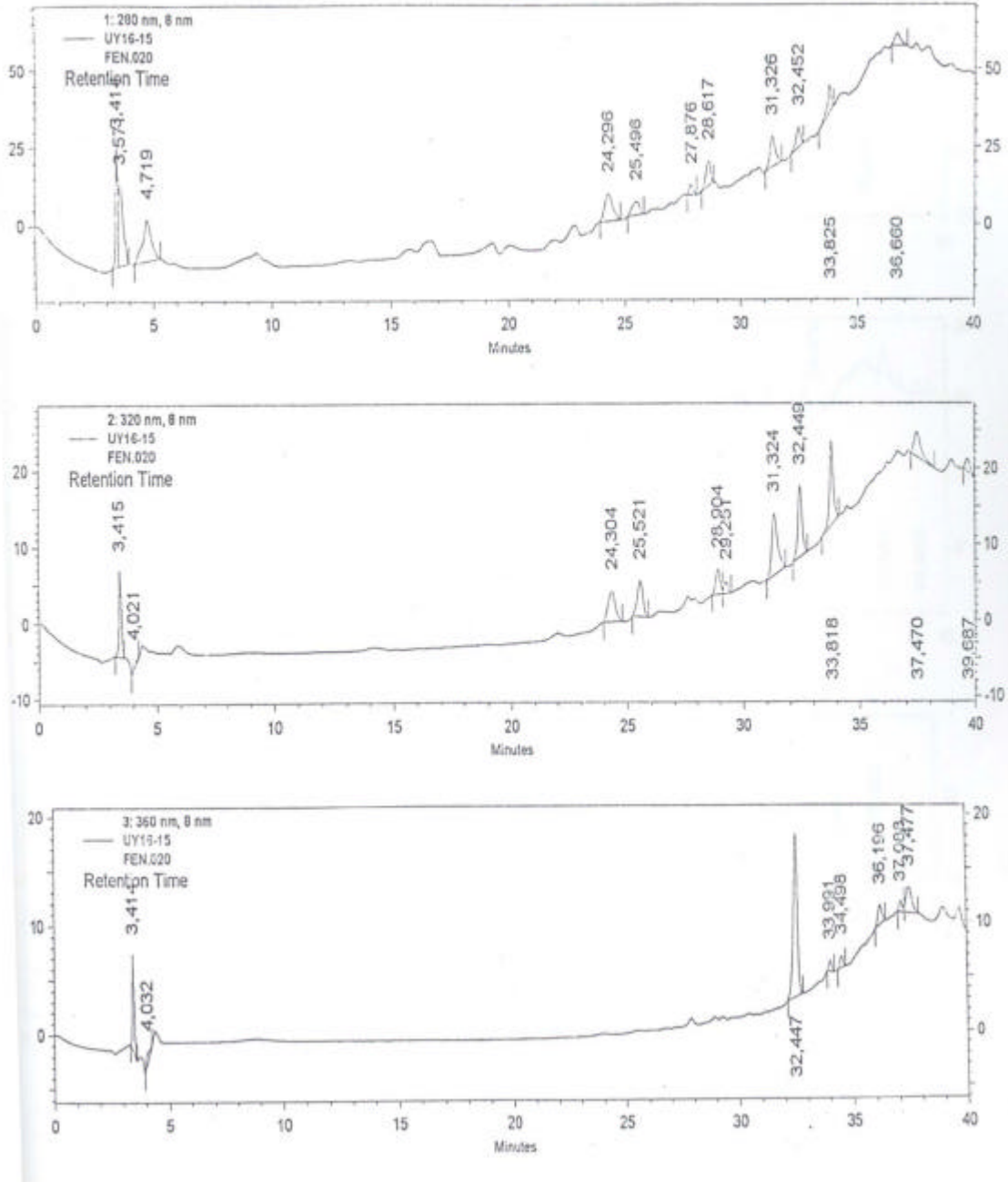
Defne meyvesi kabuklarının etanol ekstresi YBSK kromatogramı Şekil 5.10, meyve içi etanol ekstresi Şekil 5.11 ve toplam meyve etil asetat fraksiyonu Şekil 5.12’de verilmiştir. Kromatogramlarda görülen piklerin alikonma zamanları (tR) ve maksimum absorban değerleri (I max) standart fenoliklerin değerleri (Çizelge 5.11) ile karşılaştırılması sonucu kabuk, meyve içi ve toplam meyve fenolik bileşen profilleri sırasıyla Çizelge 5.12, 5.13 ve 5.14’de gösterilmiştir.

Çizelge 5.11. Standart fenolik bileşenlerin YBSK-DAD analizi sonucu elde edilen piklerin alikonma değerleri ve maksimum absorbanları

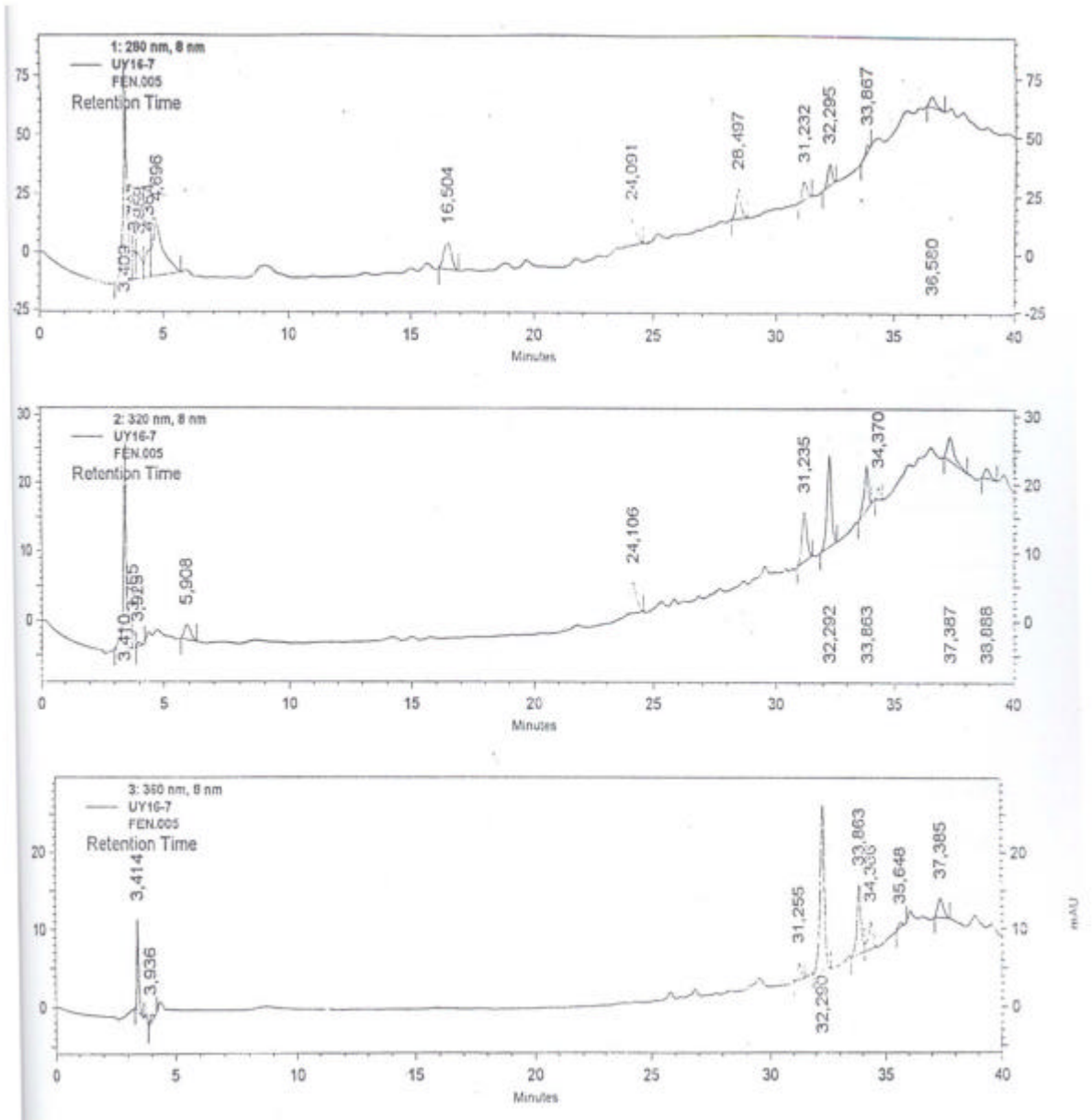
Bileşen adı	tR (dk)	I max (nm)	Fenolik grup
fumarik asit	5,30	280, 254	Benzoik asit türevi
gallik asit	6,10	280, 254	Benzoik asit türevi
protokatesik asit	11,10	280, 254	Benzoik asit türevi
p-OH-Benzoik asit	16,86	280, 254	Benzoik asit türevi
vanilik asit	21,10	280, 254	Benzoik asit türevi
kafeik asit	22,10	320, 280	Sinnamik asit türevi
p-kumarik asit	26,90	320, 280	Sinnamik asit türevi
ferulik asit	29,00	320, 280	Sinnamik asit türevi
kesretin	36,00	360, 280	Flavonoit türevi
luteolin	37,10	360, 280	Flavonoit türevi
kamferol	38,46	360, 280	Flavonoit türevi
apigenin	39,15	360, 280	Flavonoit türevi



Sekil 5.10. Defne meyvesi kabuk etanol ekstresi YBSK kromatogrami



Sekil 5.11. Defne meyvesi meyve içi etanol ekstresi YBSK kromatogramı



Sekil 5.12. Defne meyvesi tüm meyve etil asetat ekstresi YBSK kromatogramı

Çizelge 5.12. Kabuk etanol ekstresinin YBSK analizi sonucu içermiş olduğu fenolik bileşen grupları

Fenolik bileşen grubu	Fenolik bileşen grubuna ait piklerin alikonma zamanları (tR)*	Maksimum dalga boyu (λ max)
Benzoik asit türevi	11,04, 15,05, 16,56, 19,67, 23,39, 24,10, 28,56, 34,41	280
Sinamik asit türevi	28,79, 29,16, 32,36	320
Flavonoit türevi	25,90, 26,91, 29,25, 29,60, 31,32, 32,36, 33,91, 35,09	360

*Şekil 5.10'daki kromatogram değerlendirilerek gruplandırılmıştır.

Çizelge 5.13. Meyve içi etanol ekstresinin YBSK analizi sonucu içermiş olduğu fenolik bileşen grupları

Fenolik bileşen grubu	Fenolik bileşen grubuna ait piklerin alikonma zamanları (tR)*	Maksimum dalga boyu (λ max)
Benzoik asit türevi	27,87, 28,61	280
Sinamik asit türevi	24,30, 25,52, 28,90, 29,25, 31,32, 33,82	320
Flavonoit türevi	32,44	360

*Şekil 5.11'deki kromatogram değerlendirilerek gruplandırılmıştır.

YBSK-DAD analizleri sonucu kabuk ekstresinin benzoik asit ve flavonoit türevlerince, Meyve içinin de sinamik asit türevlerince zengin olduğu belirlenmiştir. Ancak kesin sonuçlar için bileşenlerin miktar tayinlerinin de yapılması gerekmektedir.

Çizelge 5.14. Tüm meyve etilasetat ekstresinin YBSK analizi sonucu içermiş olduğu fenolik bileşen grupları

Fenolik bileşen grubu	Fenolik bileşen grubuna ait piklerin alikonma zamanları (tR)*	Maksimum dalga boyu (λ max)
Benzoik asit türevi	16,50, 28,50	280
Sinamik asit türevi	24,10, 31,25	320
Flavonoit türevi	32,29, 33,86, 34,36	360

*Şekil 5.12'deki kromatogram değerlendirilerek gruplandırılmıştır.

6. SONUÇ VE TARTISMA

Yasam için temel unsur olan besinlerin ana bileşenlerinden olan yağların bozunmasına neden olan etkenlerden biri de oksijendir. Oksijen besinlerdeki yağların otooksidasyonuna neden olarak istenmeyen ve zararlı yan ürünler oluşturmakta, besinlerin proses ve saklanma koşullarında kalitelerinin bozunmalarına neden olmaktadır. Besinlerdeki yağların oksidasyonunu engellemenin bir yolu onların reaktif oksijen türleri ile temasını engellemektir. Bu amaçla besinlere antioksidan denilen katkı maddeleri ilave edilerek oksidasyon önlenmektedir.

Defne meyvelerinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan bu çalışmaya başlamadan önce meyveler kabuklarından ayrılmış ve öğütülerek kabuk, meyve içi ve tüm meyvelerin boyut analizleri yapılmıştır. Daha sonra içerdikleri nem miktarları ölçülen örneklerde meyve içinin (%8,42) kabuktan (%4,40) daha fazla nem içerdiği görülmüştür. Soxhlet cihazında petrol eteri ile sabit yağların ekstraksiyonu sonucu kabuktan %40,97; meyve içinden %25,87 ve tüm meyveden de %36,87 oranında yağ elde edilmiş ve kabuk kısmının daha yağlı olduğu belirlenmiştir. Kabuk yağında oleik asit (%51,29), meyve içi yağının da laurik asit (%50,21)'in ana bileşen olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5.8).

Yağsız kabuk, meyve içi ve tüm meyve örneklerinden Bölüm 4.5'te ayrıntıları verilen yöntemler ve çözücü sistemleri kullanılarak polar bileşikler ekstre edilmiş ve elde edilen ekstrelerin kuru baz verimleri hesaplanmıştır. Çizelge 5.4'te de görüldüğü gibi en fazla verimi Soxhlet cihazında %80 etil alkol ile yapılan ekstraksiyon vermiştir. Buna göre kabuktan %16,25, meyve içinden %23,35 ve tüm meyveden ise %17,24 oranında ekstre verimi elde edilmiştir.

Soxhlet cihazında %80 etanol ile yapılan ekstraksiyon işlemi elde edilen ekstreler organik çözücülerini uzaklaştırıldıktan sonra fenolik maddece zengin fraksiyonlar elde etmek üzere etil asetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Toplam ekstrenin etil asetat fazına geçen ve suda kalan yüzde miktarları Çizelge 5.5'de verilmiştir. Meyve içinden elde edilen toplam ekstrenin % 8.7 oranında etil asetat fazına geçtiği görülmüş ve meyve içinin fenolik maddelerce daha zengin olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar toplam fenol miktarları ile de uyum göstermektedir. Kabuk ve meyve içlerinden elde edilen %80 lik etanol ekstralarında antioksidan aktivite gösteren etkili

bilesiklerin belirlenebilmesi amacıyla, etanollü ekstre Sefadeks kolonda fraksiyonlarına ayrılmış fraksiyonların absorbanları 280 nm (λ_{\max} / fenolik asit), 360 nm (flavonoit) ve 520 nm (λ_{\max} / antosiyanin)lerde ölçülmüş ve aynı dalga boylarında maksimum absorban gösteren fraksiyonlar birleştirilmiştir. Birleştirilen fraksiyonların antioksidan kapasiteleri beta-karoten-linoleik asit sisteminde test edilmiş ve kontrol grubuna göre incelenen tüm fraksiyonların belirgin etkileri gözlenmiştir. Kolondan ayrılan fraksiyonlar YBSK-DAD ile analiz edilmiş ve defne meyvelerinde bulunan fenolik grupların belirlenmesinde kullanılmıştır. Kabuk ve meyve içi örneklerindeki glikozit yapısındaki polifenoller asidik ve bazik ortamda hidroliz edilerek serbest (aglikon) formları elde edilmiş ve serbest fenoller etil asetat ile ekstre edilerek ekstre verimleri kuru baz üzerinden Çizelge 5.7 de verilmiştir. Buna göre asit hidrolizinde etil asetat fazına geçen kabuk ekstresi %4.07 oranında olup bu oran alkali hidrolizinde %1.6'dır. Asit hidrolizinde etil asetat fazına geçen meyve içi ekstre oranı %1.20 olup bu oran alkali hidrolizinde %1.71'dir. Görülüyor ki, asit hidrolizinde etil asetat fazının içermiş olduğu kabuk ekstresi, alkali hidrolizindeki meyve içi konsantrasyonundan daha fazladır. İlk bakışta kabuk ekstresinin glikozit yapısı bileşenlerce daha zengin olduğu yorumu yapılabilir. Ancak toplam fenol bakımından meyve içi hidroliz ürününün kabuk hidroliz ürününe göre daha zengin olduğu görülmektedir (Çizelge 5.9) Bu da kabuk ekstresinde fenolik olmayan ve etil asetat fazına geçebilen başka bileşen gruplarının varlığından kaynaklanabilir.

Gallik asit referans bileşine göre belirlenen toplam fenol miktarları (mgGAE/g örnek) bakımından meyve içi ekstralarının kabuk ekstralarına göre daha zengin olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5.9). Ekstraksiyon için kullanılan çözücünün ve ekstraksiyon yönteminin birim miktar ekstrenin içermiş olduğu toplam fenol miktarı üzerine etkisi etkisi gözlenmemiştir.

Sefadeks kolondan alınan fraksiyonların içermiş olduğu fenolik madde miktarı ise Şekil 5.4'de gösterilmiştir. Buna göre toplam fenolik bileşik bakımından en zengin fraksiyon kabuk ekstresinde 16 mg GAE/g örnek konsantrasyonu ile K2 fraksiyonu, meyve ekstresinde ise 27 mg GAE/g örnek konsantrasyonu ile M3 fraksiyonudur. Defne meyvesi kabuk, meyve içi ve toplam meyveden elde edilen ekstraların ve etil asetat fraksiyonlarının %0,02 ve %1 konsantrasyonlarında hazırlanmış çözeltilerinin Ransimat yöntemi ile ham zeytin yağının oksidasyonunu inhibe edici etkileri, Bozunma İndisleri

cinsinden (Induction Index, $I.I. = I_{\text{numune}}/I_{\text{kontrol}}$) Çizelge 5.10' da verilmiştir. Bozunma indislerinin yüksek degerleri yüksek oranda antioksidan etkiyi göstermektedir. En yüksek aktiviteye ($I.I. = 2,89$) %1 konsantrasyonda meyve içi %80 etanol (Ekstre no. 3) ekstresinin sahip olduğu gözlenmiş bu degeri yine meyve içinin sulu ekstresi ($I.I. = 2,24$), etil asetat fraksiyonu ($I.I. = 1,88$) ve aseton ekstresi ($I.I. = 1,80$) takip etmiştir. Toplam meyvenin etil asetat ekstresi de aynı konsantrasyonda yüksek bir aktivite göstermiştir ($I.I. = 2,03$). Bu degerler gıdalarda sıklıkla kullanılan BHT aktivite degerleri ile kıyaslanabilir degerlerdir (Çizelge 5.10). Gıdalarda maksimum %0,02 oranında sentetik antioksidan kullanımına izin verildiği düşünülüğünde ise, bu konsantrasyonda hiçbir ekstre/fraksiyonun aktivitesi BHA nin aktivitesine ulaşamamıştır. Ancak doğal bileşiklerin sentetiklere göre yan etkilerinin az olması nedeniyle kullanım limitleri sentetiklere göre daha fazla olabilmektedir. Yine de elde edilen ekstre ve fraksiyonların kullanılan yüksek konsantrasyonlarda toksik etkilerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Serbest radikal süpürücü aktivite tayini için DPPH serbest radikalının inhibe etme özelliği incelenmiştir. DPPH inhibisyonu ne kadar yüksek ise radikal süpürücü etkisi de o kadar yüksek olmaktadır. Defne meyvesi kabuk, meyve içinden elde edilen ekstrelerin/fraksiyonların ve sentetik antioksidan olarak kullanılan BHT nin 3 µg/ml, 6 µg/ml ve 1,2 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerinin DPPH serbest radikalını inhibe edici etkileri Şekil 5.5 ve 5.6'da verilmiştir. Yüksek konsantrasyonda (1,2 µg/ml) meyve içinden elde edilen etanol ve su ekstrelerinin aktivitelerinin (sırasıyla %50,78 ve %45,67) sentetik antioksidan BHT aktivitesine (%45,16) göre kıyaslanabilir degerlerde olduğu görülmüştür. Ekstrelerin konsantrasyonları arttıkça inhibisyon aktiviteleri de beklendiği gibi artis göstermiştir.

Defne meyvesi kabuk, meyve içinden elde edilen ekstrelerin/fraksiyonların, kontrol ve sentetik antioksidan olarak kullanılan BHT' nin beta-karoten linoleik asit soldurmasını inhibe edici etkileri Şekil 5.7, 5.8 ve 5.9'de verilmiştir. Tüm ekstrelerin kontrol grubuna göre çok yüksek bir aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Meyve içi ve kabuk ekstrelerinin YBSK-DAD analizleri sonucunda kabuk ekstrelerinin benzoik asit ve flavonoit türevlerince, meyve içi ekstrelerinin de sinamik asit türevlerince zengin olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak defne meyvesinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan bu çalışmada gerek meyve içi gerekse kabukların belirgin bir

antioksidan etkiye sahip oldukları gözlenmiştir. Bulunan sonuçların daha önce defne meyveleri ile ilgili bu yönde yapılmış bir çalışma bulunmaması nedeniyle karşılaştırılması yapılamamış olmakla beraber, incelenen sistemlerde sentetik antioksidan olarak kullanılan BHT'nin antioksidan kapasitesi ile kıyaslanabilecek derecede aktiviteye sahip olmaları, defne meyvelerinin özellikle meyve içinin potansiyel bir doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

- ALLEAN, J.C. ve HAMILTON, R.J., *Rancidity in Foods*, London, England, 2-45, (1989).
- ALTUG, T., *Gıda Katkı Maddeleri*, İzmir, Türkiye, **19-20**, 32-36, (2001).
- BAYTOP, A., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, s. 520, (1984).
- ÇAKMAKÇI, S. ve ÇELİK, I., *Gıda Katkı Maddeleri*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, Türkiye, **66**, (1998).
- DAVIS, P.H., 1982, *Flora of Turkey*, **7**, Edinburgh University Press, Edinburgh, 947, 1986.
- DUKE, J.A., *Handbook of Medicinal Herbs*, Florida, USA, 677, (1984).
- FELEKOĞLU, E., *Biberiye Ekstrakti ve Sogan Suyu Kullanımının Sardalya Etinin Oksidatif Stabilitesi Üzerine Etkilerinin Arastırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Avlanma ve İşleme Teknolojisi, ABD, 17-31, 2001.
- FRANKEL, E.N. ve MAYER, A.S., *The Problems of Using One Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants*, *Journal Science Food Agriculture*, **80**, 1925-41, (2002).
- GAMEZ-MEZA, N.; NORIEGA-RODRIGUEZ, J.A.; MEDINA-JUAREZ, L.A.; ORTEGA-GARCIA, J.; CAZAREZ-CASANOVA, R. ve ANGULO-GUERRERO, O. *Antioxidant Activity in Soybean Oil of Extracts from Thompson Grape Bagasse*, *JAOCS.*, **76**, 1445-1447, (1999).
- GRIEVE, M., *A Modern Herbal*, Lyle, Middlesex, England, 912, (1982).
- HAFIZOĞLU ve REAUNANEN, *Studies on the Components of Laurus nobilis from Turkey With Special Reference to Laurel Berry Fat*, *Fat Sci. Tech.*, Turkey, (1993).
- HIDENORI, H., *Plant Extract-Containing Deodorants for Treating Indoor Air*, Tokyo, Japan, 112, (1989).
- JOAQUIN, V., MOGENS, L. A. ve LEIF H. S., *Evaluation of Oxidative Stability of Vegetable Oils by Monitoring the Tendency to Radical Formation and A Comparison of Electron Spin Resonance Spectroscopy with the Rancimat Method and Differential Scanning Calorimetry*, *Food Chemistry*, **85(4)**, 623-632, (2004).

JORGE, A., OSUNA-GARCIA, WALL, M. ve M., WADDELL, *Natural Antioxidants For Preventing Color Loss in Stored Paprika*, Journal of Food Science, **62**, 1017, (1997).

KESKIN, H., *Gıda Kimyasi*, Sirketi Mürettibiye Basimevi, Istanbul, Türkiye s. 73-139, (1975).

KÖSEOĞLU, S.S., RHEE, K.C. ve WILSON, R.F., *Advances in Oils and Fats Antioxidants and Oilseed by Products*, Istanbul, Türkiye, 244, (1996).

LARSON, R.A., *Autooxidizable Substances: Weathering, Naturally Occuring Antioxidants*, Lewis Publishers, New York, USA, 1-21, (1997).

MARTINEZ-TOME, M. (2001) *Comparison of the Antioxidant and Pro-antioxidant Activities of Broccoli Amino Acids with Those of Common Food Additives*, Journal Science Food Agriculture, **81**, 1019-26, (2001).

MINA, J.D., *Composition for the Treatment of Hair*, Britain 237, 656, 29 May, (1969).

MORTENSEN, A., ve SKIBSTED, L.H., *Importance of Caretenoid Structure in Radical-Scavenging Reactions*, American Chemical Society, Journal Agricultural Food Chemistry, **45(8)**, 2970-2977, (1997).

O'BRIEN, R.D., *Fats and Oils Formulating and Processing for Applications*, Technomic Publishing Company Inc., Pensilvanya, USA, 4-258, (1998).

ODETE, RR., *Seasonal Variation in Oil Composition of Laurus Nobilis Grown In Portugal*, Journal Essential Oil Research, **113**, 199-200, (1989).

PEKIN, B., *Biyokimya Mühendisligi (Temel İlkeler)*, Ege Üniversitesi Matbaasi, Bornova, Izmir, Türkiye, 65-79, (1979).

POKORNY, J., *Natural Antioxidants For Food Use, Trends In Food Science and Technology*, Elsevier Science Publishers Ltd., UK, 223-226, (1991).

PRUTHI, I.S., *Spices and Condiments National Book Trust*, New Delhi, India, 269, (1976).

RISCH, S.J. ve HO, C.T., *Antioxidative Activity of Spices and Spice Extracts, Spices-Flavor Chemistry and Antioxidant Properties*, American Chemical Society, USA, 177-186, (1997).

SALDAMLI, I., *Gıda Kimyasi*, Hacettepe Üniversitesi Basimevi, Ankara, Türkiye, 437-441, (1998).

SANCHEZ, M.C., LARRAURI, J.A. ve SAURRA, C.F., *A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols*, Journal Science Food Agriculture, **76**, 270-276, (1998).

SHADIDI, F., JANITHA, P.K. ve WANASUNDARA, P.D., *Phenolic Antioxidants, Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Florida, USA, **32(1)**, 67-103, (1992).

SHADIDI, F. ve NACZK, M., *Food phenolics*, Technomic Publishing Company Inc., USA, 1-242, (1995).

SHADIDI, F., *Antioxidants In Food and Food Antioxidants*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, Germany, (2000).

SIVRITEPE, N., *Asma, Üzüim ve Saraptaki Antioksidanlar*, Gıda dergisi, **12**, 73-78, (2000).

STRUMEYER, D.H. ve MALIN, M.J., *Condensed Tannins in Grain Sorghum: Isolation, Fractionation and Characterization*, Journal Agriculture Food Chemistry, **23**, 909-914, (1975).

TANRIVERDI, H., VIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler Cilt II, İstanbul Üniversitesi Yayınları No:3733, İstanbul, Türkiye, 364, (1989).

TANRIVERDI, H., ÖZEK, T., BEIS, S.H., BASER, K.H.C., *Composition of the Essential Oils of Turkish Laurel Leaves and Berries, Essays on Science*, Hakim Mohammad Said (Ed.), Hamdard Foundation, Karachi, Pakistan, 325, (1992).

TÜRK STANDARTLARI ENSTİTÜSÜ (TSE-894), *Yemelik Bitkisel Yağların Muayene Metotları*, Ankara, 8-9, (1975).

ÜNAL, Ö., ÖNER, G., PÜTÜN, E., *Ege Bölgesi Defne Tohumu Yağının Çözücü Ekstraksiyonu ve Yağının Karakterizasyonu*, İTÜ, İstanbul, 22-26, (1986).

WANG, C.K. ve LEE, W.H., *Separation, Characteristics and Biological Activities of Phenolics in Areca Fruit*, Journal Agriculture Food Chemistry **44**, 2014-2019, (1996).

WETTASINGHE, M. ve SHAHIDI, F., *Antioxidant Activity of Preformed Cooked Cured-Meat Pigment in A β -carotene/linoleate Model System*, Food Chemistry, **58(3)**, 203-207, (1997).

YAZICIOGLU, T., KARAALI, A., *Türk Bitkisel Yağlarının Yağ Asitleri Bileşimleri*, Tübitak Beslenme ve Gıda Teknolojisi Bölümü, Gebze, 70-105, (1983).