



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ İLE PINACEAE FAMILİYASINA
AİT BAZI KOZALAKLARDAN ELDE EDİLEN LİGNİNİN
FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONUN VE BAZI BİYOLOJİK
ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

ÖZGE ÖZGÜRLÜK

DANIŞMAN

PROF. DR. AYBEN KILIÇ PEKGÖZLÜ

BARTIN-2024



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ İLE PINACEAE FAMILİYASINA AİT BAZI
KOZALAKLARDAN ELDE EDİLEN LİGNİNİN FİZİKOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONUN VE BAZI BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Özge ÖZGÜRLÜK

JÜRİ ÜYELERİ

Danışman :
Üye :
Üye :
Üye :
Üye :

BARTIN-2024

KABUL VE ONAY



BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Prof. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ danışmanlığında hazırlamış olduğum “DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ İLE PINACEAE FAMILİYASINA AİT BAZI KOZALAKLARDAN ELDE EDİLEN LİGNİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONUN VE BAZI BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı program seçin tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

15.08.2024

Özge ÖZGÜRLÜK

ÖN SÖZ

Sayın danışman hocam Prof. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ, çalışmamın her aşamasında gösterdiğiniz rehberlik, yönlendirme ve teşvikleriniz sayesinde bu noktaya ulaşabilmiş olmanın mutluluğunu yaşıyorum. Hayatımın her noktasında karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmemde büyük bir özveriyle yardımcı oldunuz. Herşey için minnettarım.

Deneyletimde bana rehberlik ederek tezimi daha ileri bir noktaya taşımamda yardımcı olan Sayın Doç. Dr. Dursun KISA'ya, tez savunma sürecimde yapıcı eleştirileri ile çalışmama büyük katkı sağlayan jüri üyelerim Sayın Prof. Dr. Hüseyin SİVRİKAYA, Prof. Dr. İlhami Emrah DÖNMEZ ve Doç. Dr. Eyyüp KARAOĞUL'a, tez sürecimde bana destek olan ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum değerli hocam Sayın Doç. Dr. Sezgin Koray GÜLSOY'a, laboratuvarında çalışmama müsaade eden Sayın Doç. Dr. İlyas BOLAT'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Destek ve motivasyonunu hiç eksik etmeyen değerli arkadaşlarım Şeyma ÖZLÜSOYLU ve Seher KUŞ CENGİZ'e, başta Doç.Dr. İsmail ÖZLÜSOYLU ve Doç. Dr. Mehmet Emin ERGÜN olmak üzere Arş. Gör. Esra CEYLAN, Arş. Gör. Ahmet ÇELİK, Vildan SAĞ ve Buket YILDIRIM'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Canım ailem ve sevgili eşim Doç. Dr.Yasin ÖZGÜRLÜK, bana verdiğiniz güven, sevgi ve destek için minnettarım. Hayatımı anlamlandıran çocuklarım Gökmen Murat ÖZGÜRLÜK ve Yasin Eymen ÖZGÜRLÜK, sizler benim en büyük ilham kaynağımsınız. Neşeniz, enerjiniz ve sevginiz, bu zorlu süreçte bana güç verdi. Beni her zaman gülümsettiğiniz için teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca beni her zaman destekleyen ve her kararında yanımda duran, fakat bugünümü göremeyen canım babam en çok da sana teşekkür ederim. Seni her zaman sevgi, saygı ve özlemle anıyorum.

Bartın Üniversitesi YÖK 100/2000 “Orman Ürünleri ve Teknolojisi” öncelikli alanlar doktora burs programı tarafından desteklenen tez çalışmamdan dolayı Yükseköğretim Kurulu'na, “1002-A Hızlı Destek Modülü” kapsamında yürütücüsü olduğum 2230417 nolu proje, TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı ile desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Özge ÖZGÜRLÜK

ÖZET

Doktora Tezi

DOĞAL DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜ İLE PINACEAE FAMILİYASINA AİT BAZI KOZALAKLARDAN ELDE EDİLEN LİGNİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONUN VE BAZI BİYOLOJİK ETKİNLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Özge ÖZGÜRLÜK

Bartın Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ

Bartın-2024, sayfa: 125

Bu tez çalışmasında çevreye dost ve yenilikçi bir çözücü olan doğal derin ötektik çözücü (DDÖÇ) kullanılarak *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach. subsp. *nordmanniana* (Doğu Karadeniz Göknaarı), *Cedrus libani* A.Rich. (Toros Sediri), *Picea orientalis* (L.) Link. (Doğu Ladini) ve *Pinus pinea* L. (Fıstık Çamı) kozalaklarından lignin edilmesi ve elde edilen ligninlerin fizikokimyasal analizleri gerçekleştirilerek kimyasal bileşimini ve yapısal özelliklerinin ortaya konulması, antioksidan, antibakteriyel ve antikolinesteraz aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. DDÖÇ hazırlanmasında kolin klorür (ChCl) ve laktik asit (LA) kullanılmıştır. Muamele mol oranı 1:10, katı:sıvı oranı 1:20, sıcaklık 150 °C, süre 1 saat olacak şekilde mikrodalga reaktöründe gerçekleştirilmiştir. Muamele sonrası örneklerin katı (selülozca zengin kısım-SZK) ve sıvı kısımları birbirinden ayrılmıştır. DDÖÇ ile elde edilen lignince zengin kısım (LZK) örnekleri ile karşılaştırma yapmak amacıyla Doğu Ladini kraft lignin üretilmiş ve ticari kraft lignin temin edilmiştir. Herhangi bir kimyasal muamele yapılmayan kontrol ve SZK örneklerinin kimyasal yapılarının belirlenmesi için Termogravimetrik Analiz (TGA), X-Işını Difraktometresi (XRD) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri gerçekleştirilmiştir. LZK, Doğu Ladini kraft

lignin ve ticari kraft lignin örneklerinin fizikokimyasal karakterizasyonu için jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), SEM, Fourier transform infrared (FTIR), ³¹P Nükleer Magnetik Rezonans (³¹P NMR) Spektroskopisi analizleri yapılmıştır. Ayrıca, LZK örneklerinin saflıklarını belirlemek için klason lignin tayini yapılmıştır. Elde edilen LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerinin antioksidan aktivitesi 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal giderim yöntemi, antibakteriyel aktivitelerinin tespiti gram (-) (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) ve gram (+) (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) suşları ile sıvı besiyeri mikrodilüsyon yöntemi ve asetilkolinesteraz (AChE) enzim inhibisyonu tayini Ellman yöntemi ile biyoaktivite özellikleri belirlenmiştir.

Kontrol örneklerine etil alkol ekstraksiyonu ve ardından klason lignin tayini yapılmıştır. Sırasıyla etil alkol ekstraksiyonu ve klason miktarları Doğu Karadeniz Göknarı %21,1; %46,2, Toros Sediri %24,7; %34,7, Doğu Ladini %13,3; %46,32 ve Fıstık Çamı %2,9; %36,1 olarak tespit edilmiştir. DDÖÇ muamelesi sonrası elde edilen SZK verimleri %42,1-63,5 aralığında bulunmuştur. SZK örneklerinin kristallik indeksleri kontrol örneklerinden yüksek çıkmıştır. LZK örneklerinin saflık değerleri birbirine yakın bulunmuştur (%78,6-%82,8). Lignin verimleri ise Doğu Karadeniz Göknarı LZK %59,2, Toros Sediri LZK %89,3, Doğu Ladini LZK %55,2 ve Fıstık Çamı LZK %41,4 olarak tespit edilmiştir. Mw değerleri 4900 g/mol ile 2400 g/mol aralığında değişmektedir. LZK ve Doğu Ladini kraft ligninin PDI değeri, ticari ligninden düşük olduğu tespit edilmiştir. En yüksek PDI değeri ticari kraft ligninin (4,00) en düşük ise Doğu Ladini kraft ligninin (2,35) olduğu görülmüştür. ³¹P NMR analiz sonuçlarına göre tüm lignin örnekleriyle karşılaştırıldığında en yüksek toplam fenolik OH (1,57 mmol/g) ve alifatik OH (1,92 mmol/g), en düşük karboksilik OH (0,26 mmol/g) ticari kraft ligninde tespit edilmiştir. LZK ve kraft ligninlerin IC₅₀ değeri sentetik antioksidan BHT'ye göre daha düşük bulunmuş olup, antioksidan etkiliğinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Tüm lignin örneklerinin çalışılan konsantrasyonlarda hem antibakteriyel hem de antiasetilkolinesteraz enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak doğal derin ötektik çözücü ile ligninlerin yüksek saflık ve verimde elde edilebildiği ve elde edilen ligninlerin yüksek biyoaktivite etkinliğinin olduğu, gıda, eczacılık ve biyomühendislik gibi birçok alanda kullanım potansiyelinin yüksek olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyoaktivite, doğal derin ötektik çözücü, kozalak, lignin, mikrodalga

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND SOME BIOLOGICAL ACTIVITIES OF LIGNIN, OBTAINED FROM CONES OF THE PINACEAE FAMILY USING NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENT

Özge ÖZGÜRLÜK

Bartın University

Graduate School

Department of Forest Industry Engineering

Thesis Advisor: Prof. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ

Bartın-2024, pp: 125

In this thesis, it was aimed to obtain lignin from *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach. subsp. *nordmanniana* (Nordmann Fir), *Cedrus libani* A.Rich. (Taurus Cedar), *Picea orientalis* (L.) Link. (Oriental Spruce) and *Pinus pinea* L. (Stone Pine) cones by using natural deep eutectic solvent (NADES), which is an environmentally friendly and innovative solvent, and to reveal the chemical composition and structural properties of the obtained lignins by performing physicochemical analyzes and to determine their antioxidant, antibacterial and anticholinesterase activities. Choline chloride (ChCl) and lactic acid (LA) were used in the preparation of NADES. The treatment was carried out in a microwave reactor with ChCl:LA for 1 hour with molar ratio of 1:10, solid:liquid ratio of 1:20 and temperature of 150 °C. After the treatment, the solid (cellulose rich fraction-CRM) and liquid fractions of the samples were separated from each other. In order to make comparison with the lignin-rich fraction (LRM) samples obtained by NADES, Oriental spruce kraft lignin was produced and commercial kraft lignin was supplied. Thermogravimetric Analysis (TGA), X-Ray Diffractometry (XRD) and scanning electron microscope (SEM) analyses were carried out to determine the chemical structures of the control sample without any chemical treatment and CRM samples. Gel permeation chromatography (GPC), SEM, Fourier transform

infrared (FTIR), ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance (^{31}P NMR) Spectroscopy analyses were carried out for the physicochemical characterization of LRM, Oriental spruce kraft lignin and commercial kraft lignin samples. Also, the purity of LRM samples we determined with klason lignin treatment. The antioxidant activities of the obtained LRM, Oriental Spruce kraft lignin and commercial kraft lignin samples were determined by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method. For antibacterial activities gram (-) (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) and gram (+) (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) strains by broth microdilution and for acetylcholinesterase (AChE) enzyme inhibition Ellman's method was used.

Control samples were subjected to ethyl alcohol extraction and then klason lignin determination. Ethyl alcohol extraction and klason amounts were determined as 21.1%; 46.2% for Nordmann Fir, 24.7%; 34.7% for Taurus Cedar, 13.3%; 46.32% for Oriental Spruce and 2.9%; 36.1% for Stone Pine, respectively. CRM yields obtained after NADES treatment were found to be in the range of 42.1-63.5%. Crystallinity indices of CRM samples were higher than control samples. The purity values of LRM samples were found to be close to each other (%78.6-82.8). Lignin yields were determined as 59.2% for Nordmann Fir LRM, 89.3% for Taurus Cedar, 55.2% for Oriental Spruce and 41.4% for Stone Pine. Mw values range from 4900 g/mol to 2400 g/mol. PDI values of LRM and Oriental Spruce kraft lignin were found to be lower than commercial lignin. The highest PDI value was found in commercial kraft lignin (4.00) and the lowest in Oriental Spruce kraft lignin (2.35). According to ^{31}P NMR analysis results, when compared with all lignin samples, the highest total phenolic OH (1.57 mmol/g) and aliphatic OH (1.92 mmol/g) and the lowest carboxylic OH (0.26 mmol/g) were detected in commercial kraft lignin. IC_{50} values of LRM and kraft lignins were found to be lower than synthetic antioxidant BHT, and it was concluded that their antioxidant activity was higher. It was determined that all lignin samples had both antibacterial and antiacetylcholinesterase enzyme activity at the studied concentrations. As a result, it was concluded that lignin can be obtained with high purity and yield with natural deep eutectic solvent from the cones and it has a bioactivity properties. Lignin can be use in many areas such as food, pharmacy and bioengineering.

Keywords: Bioactivity, cone, lignin, microwave, natural deep eutectic solvent

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	ii
BEYANNAME	iii
ÖN SÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Lignin	2
1.1.1. Lignin Biyosentezi	5
1.1.2. Ligninin Kalitatif ve Kantitatif Olarak Belirlenmesi	6
1.1.2.1. Kalitatif yöntemler	7
1.1.2.2. Kantitatif yöntemler	7
1.1.3. Ligninin Ekstraksiyonu ve Ayrıştırılması.....	8
1.1.4. Ligninin Kullanım Alanları.....	10
1.2. Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ)	24
1.2.1. Derin Ötektik Çözücülerin Avantajları	26
1.2.2. Doğal Derin Ötektik Çözücü (DDÖÇ)	27
1.3. Biyolojik Aktivite Tayin Yöntemleri.....	28
1.3.1. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	29
1.3.1.1. Elektron transferi (ET) reaksiyonuna dayalı testler	32
1.3.1.2. Hidrojen atomu transferi (HAT) reaksiyonuna dayalı testler	32
1.3.2. Antibakteriyel Test Yöntemleri	34
1.3.2.1. Disk difüzyon yöntemi.....	35
1.3.2.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu.....	36
1.3.2.3. Antimikrobiyal Gradyan Yöntemi (Etest)	37
1.3.2.4. Zamana bağlı öldürme testi.....	38
1.3.2.5. Agar seyreltme ve sıvı besiyeri seyreltme yöntemleri	38
1.3.3. Alzheimer Hastalığı ve Antikolinesterazlar	39

1.4. Kozalaklar	40
2. MATERYAL VE METOT	50
2.1. Materyal.....	50
2.2. Metot	51
2.2.1. Kozalak Örneklerinin Hazırlanması	51
2.2.2. Kozalak Örneklerine Ait Gravimetrik Analizler	51
2.2.3. DDÖÇ hazırlanması.....	52
2.2.4. Kozalaklardan Lignin Eldesi	52
2.2.4.1. Mikrodalga Ekstraksiyonu ile DDÖÇ Lignin Eldesi	52
2.2.4.2. Kraft Yöntemi ile Lignin Eldesi	54
2.2.5. Fizikokimyasal Karakterizasyon Yöntemleri.....	55
2.2.5.1. Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	56
2.2.5.2. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC).....	56
2.2.5.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	56
2.2.5.4. Termogravimetrik Analiz (TGA).....	56
2.2.5.5. X-Işını Difraktometresi (XRD).....	57
2.2.5.6. ³¹ P Nükleer Magnetik Rezonans (³¹ P NMR) Spektroskopisi	57
2.2.6. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	57
2.2.6.1. Antibakteriyel aktivite tayini	58
2.2.6.2. Antioksidan Aktivite Tayini	59
2.2.6.3. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzim İnhibisyonu Tayini	59
2.2.7. İstatistiksel Analizler	59
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	60
3.1. Gravimetrik Analizlere Ait Bulgular	60
3.1.1. Kontrol örneklerinin gravimetrik analiz sonuçları	60
3.1.2. SZK Örneklerinin Verimine Ait Bulgular	60
3.1.3. Lignin Saflığı	61
3.2. Fizikokimyasal Analizlere Ait Bulgular	64
3.2.1. X-Işını Difraktometresi (XRD) Analiz Bulguları.....	64
3.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	66
3.2.3. TGA Analiz Bulguları.....	75
3.3.2. FT-IR Analiz Bulguları	77
3.3.4. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) Bulguları	79

3.3.5. ³¹ P NMR Bulguları.....	81
3.4. Biyolojik Aktivite Sonuçlarına Ait Bulgular	83
3.4.1. Antibakteriyel Aktivite Bulguları.....	85
3.4.2. Antioksidan Aktivite Bulguları.....	93
3.4.3. Antiasetilkolinesteraz Aktivite Bulguları.....	100
4. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
KAYNAKLAR.....	107
ÖZGEÇMİŞ	122



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
No	No
1.1: İğne yapraklı ağaç lignin yapısı.	3
1.2: Lignin yapıtaşları (H: <i>p</i> -hidroksifenil, G: Guayasil, S: Şiringil) ve arasındaki bağlar.....	4
1.3: Glukozdan fenilpropana lignin yapıtaşlarının metabolik yolu.	6
1.4: Lignin eksraksiyon yöntemleri.....	9
1.5: Ligninin kullandığı alanlar.	11
1.6: Ligninin biyolojik aktiviteleri ve etkin kullanımları.	13
1.7: DÖÇ hazırlama teknikleri.	25
1.8: IL'lerin, DÖÇ'ün ve DDÖÇ'ün rapor edilen gelişmeleri ve özelliklerinin zaman çizelgesi.....	27
1.9: Doğal derin ötektik çözücü sentezi için kullanılan doğal bileşenler.....	28
1.10: Doğal antioksidanların sınıflandırılması	31
1.11: Disk difüzyon metodu.	36
1.12: Agar disk difüzyon yönteminin şematik gösterimi.	37
1.13: E testi inhibisyon bölgesinin şematik gösterimi.....	38
1.14: <i>Abies nordmanniana</i> subsp. <i>nordmanniana</i> genel görünüşü	41
1.15: <i>Abies nordmanniana</i> subsp. <i>nordmanniana</i> 'nın Türkiye'de yayılışı.....	42
1.16: <i>Cedrus libani</i> genel görünüşü	43
1.17: <i>Cedrus libani</i> 'nin Türkiye'de yayılışı	44
1.18: <i>Picea orientalis</i> genel görünüşü.....	45
1.19: <i>Picea orientalis</i> 'in Türkiye'de yayılışı	46
1.20: <i>Pinus pinea</i> genel görünüşü	47
1. 21: <i>Pinus pinea</i> 'nın Türkiye'de yayılışı.....	48
2.1: Doğu Karadeniz Gökmar kozalağı (a), Toros Sediri kozalağı (b), Doğu Ladini kozalağı (c) Fıstık Çamı kozalağı (d).....	50
2.2: DK Gökmarı, Toros Sediri, Doğu Ladini ve Fıstık Çamı kozalağı unu.....	51
2.3: DDÖÇ muamele iş akışı.....	54
2.4: Siyah çözelti (a), Kraft lignin (b)	55
2.5: Antibakteriyel deney aşamaları.....	58
3.1: DDÖÇ muamelesinin katı kalıntı verimi üzerine etkisi	61

3.2: Kontrol ve DDÖÇ ile işlenmiş kozalak numunelerinin XRD spektrumları	65
3.3: DK Göknarı kontrol (a) 500x (b) 1.00kx büyütme ve SZK örneklerinin (c) 500x (d) 1.00kx büyütme SEM görüntüleri	67
3.4: Toros Sediri kontrol (a) 500x (b) 1.00kx büyütme ve SZK örneklerinin (c) 500x (d) 1.00kx büyütme SEM görüntüleri	68
3.5: Doğu Ladini kontrol (a) 500x (b) 1.00kx büyütme ve SZK örneklerinin (c) 500x (d) 1.00kx büyütme SEM görüntüleri	69
3.6: Fıstık Çamı kontrol (a) 500x (b) 1.00kx büyütme ve SZK örneklerinin (c) 500x (d) 1.00kx büyütme SEM görüntüleri	70
3.7: DK Göknarı LZK örnekleri SEM görüntüleri.....	72
3.8: Toros Sediri LZK örnekleri SEM görüntüleri.....	72
3.9: Doğu Ladini LZK örnekleri SEM görüntüleri	73
3.10: Fıstık Çamı LZK örnekleri SEM görüntüleri.....	73
3.11: DK Göknarı kraft lignin örnekleri SEM görüntüleri.....	74
3.12: Ticari kraft lignin örnekleri SEM görüntüleri	74
3.13: Kontrol ve SZK örneklerinin TGA ve DTG eğrileri.....	75
3.14: Ligninlerin FT-IR spektrumları.....	77
3.15: ³¹ P NMR analiz sonuçları.....	82
3.16: Ticari kraft ligninin %3, %10 ve %100 DMSO'da <i>B. Subtilis</i> ve <i>E. coli</i> üzerine etkisi	84
3.17: DMSO'nun <i>E. coli</i> üzerinde etkisi (DMSO konsantrasyonları A:%30; B:%25; C:%20; D:%15; E:%10; F:%5)	84
3.18: %3 DMSO'da lignin çözünürlüğü a) ticari kraft lignin b) DK Göknarı LZK c) Toros Sediri LZK c) Doğu Ladini LZK d) Fıstık Çamı LZK	85
3.19: a) DK Göknarı LZK b) Toros Sediri LZK c) Doğu Ladini LZK d) Fıstık Çamı LZK e) Doğu Ladini kraft lignin f) Ticari kraft lignin örneklerinin <i>Basillus subtilis</i> üzerine etkisi g) <i>Basillus subtilis</i> pozitif ve negatif kontrol	86
3.20: a) DK Göknarı LZK b) Toros Sediri LZK c) Doğu Ladini LZK d) Fıstık Çamı LZK e) Doğu Ladini kraft lignin f) Ticari kraft lignin örneklerinin <i>Enterococcus faecalis</i> üzerine etkisi g) <i>Enterococcus faecalis</i> pozitif ve negatif kontrol	87
3.21: a) DK Göknarı LZK b) Toros Sediri LZK c) Doğu Ladini LZK d) Fıstık Çamı LZK e) Doğu Ladini kraft lignin f) Ticari kraft lignin örneklerinin <i>Escherichia coli</i> üzerine etkisi g) <i>Escherichia coli</i> pozitif ve negatif kontrol	88

3.22: a) DK Göknarı LZK b) Toros Sediri LZK c) Doğu Ladini LZK d) Fıstık Çamı LZK e) Doğu Ladini kraft lignin f) Ticari kraft lignin örneklerinin <i>Klebsiella pneumoniae</i> üzerine etkisi g) <i>Klebsiella pneumoniae</i> pozitif ve negatif kontrol.....	89
3.23: a) İnkübasyon öncesi b) inkübasyon sonrası LZK, Kraft lignin ve ticari Kraft lignin mikrop laka görüntüleri	93
3.24: LZK, ticari kraft lignin ve Doğu Ladini kraft lignin %inhibiyon değerleri	94
3.25: LZK, ticari kraft lignin ve Doğu Ladini kraft lignin IC ₅₀ değerleri	95
3.26: DMSO'nun antiasetilkolinesteraz aktivitesi.....	100
3.27: LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari lignin örneklerinin enzim inhibisyon aktiviteleri	101



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
No	No
1.1: Farklı bitkilerde bulunan lignin yapıtaşları miktarı.	2
1.2: Ligninin belirlenmesinde kullanılan kantitatif yöntemler.....	8
1.3: Lignin izolasyonu yöntemleri	10
1.4: DÖÇlerin sınıflandırılması.....	25
1.5: Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)	33
1.6: Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)	34
2.1: Kozalak örneklerinin DDÖÇ muamele koşulları.....	53
2.2: Uygulanan enstrümental analizler.....	55
3.1: Kontrol örneklerinin gravimetrik analiz sonuçları.....	60
3.2: Lignince zengin kısımların (LZK) saflıkları ve verimleri.....	62
3.3: Kontrol ve DDÖÇ ile işlenmiş kozalak numunelerinin 2θ, yoğunluk ve KI değerleri.....	65
3.4: Ti% (% 10 Ağırlık Kaybındaki Sıcaklık) ve Tmax% (%50 Ağırlık Kaybındaki Sıcaklık) ve TGA analizi sonucunda kalan kütle miktarı	76
3.5: Lignin örneklerine ait FT-IR analiz sonuçları.....	78
3.6: Lignin örneklerine ait GPC analizi sonuçları.....	80
3.7: Ligninlerin etil alkolde çözünürlükleri.....	85
3.8: Lignin örneklerinin minimum inhibitör kapasitesi.	90
3.9: LZK, ticari kraft lignin ve Doğu Ladini kraft lignin IC ₅₀ değerleri	95

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

g	: gram
ha	: hektar
kg	: kilogram
m	: metre
m ³	: metreküp
MJ	: megajul
mL	: mililitre
mmol	: milimol
nM	: nanometre
µl	: mikrolitre
pH	: hidrojen kuvveti

KISALTMALAR

AA	: Asetik Asit
Aβ	: Amiloid Beta
AChE	: Asetilkolinesteraz
AcI	: Asetiltiyokolin İyodür
BHA	: Butilhidroksianisol
BHT	: Butilhidroksitoluen
BuChE	: Butirilkolinesteraz
CA	: Sitrik Asit
ChCl	: Kolin Klorür
DDÖÇ	: Doğal Derin Ötektik Çözücü
DEL	: Çift Enzimatik Lignin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DÖÇ	: Derin Ötektik Çözücü
DPPH	: 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit

EG	: Etilen Glikol
FA	: Formik Asit
FTIR	: Fourier Transform İnfrared
G	: Guayasil
Gly	: Gliserol
GPC	: Jel Geçirgenlik Kromatografisi
H	: P-Hidroksifenil
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
LA	: Laktik Asit
LZK	: Lignince Zengin Kısım
MA	: Malik Asit
MEA	: Monoetanolamin
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PDI	: Polidispersite İndeksi
PAA	: Peroksiasetik Asit
PFA	: Peroksiformik Asit
PMA	: Fosfomolibdik Asit
PTA	: Fosfotungstik Asit
RSI	: Serbest Radikal Süpürücü İndeks
S	: Siringil
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
STA	: Silikotungstik Asit
SZK	: Selülozca Zengin Kısım
TGA	: Termogravimetrik Analiz
THF	: Tetrahidroksifuran
Tris HCl	: Tris (Hidroksimetil) Aminometan Hidroklorür
XRD	: X-Işını Difraktometresi

1. GİRİŞ

Son yıllarda COVID-19 pandemisi ve iklim değişikliği, toplumların sağlık, çevre ve sürdürülebilirlik konularına daha fazla odaklanmasına neden olmuştur. Bu yüzden, insanlar sağlık açısından daha güvenli, çevre dostu ve sürdürülebilir ürünlere yönelmeye başlamıştır. Doğal ürünler bu yönelimin en önemli bileşenlerinden biridir. Pandemi sırasında, sağlık sistemlerindeki yüklenme ve global tedarik zincirlerindeki aksaklıklar, yerel ve doğal kaynaklara yönelimi hızlandırmıştır. İklim değişikliği de sürdürülebilir ürünlerin önemini bir kez daha gündeme getirmiştir. Özellikle fosil yakıtlara dayalı üretim süreçlerinin çevre üzerindeki olumsuz etkileri, daha çevre dostu alternatiflerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Bu süreçte, bitkilerden ve tarımsal atıklardan elde edilen biyo-bazlı ve yeşil kimya yöntemleriyle üretilen ürünler ilgi görmeye başlamıştır. Lignin ve derin ötektik çözücüler (DÖÇ) bu alanda büyük potansiyele sahip bileşenler olarak öne çıkmaktadır.

Lignin, bitkilerin hücre çeperinde bulunan ve bitkilere mekanik dayanıklılık kazandıran doğal bir polimerdir. Özellikle odunsu bitkilerde, selüloz ve hemiselülozlar ile birlikte hücre çeperinin önemli bir bileşeni olarak yer alır. Ligninin başlıca kaynakları orman ürünleri ve tarımsal atıklardır. Bu biyokütle kaynakları arasında ağaç kabukları, kozalaklar, buğday sapları ve mısır koçanı gibi yan ürünler bulunur. Lignin, yenilenebilir bir kaynak olması, biyobozunur ve biyopolimer gibi özellikleri nedeniyle endüstriyel uygulamalarda büyük ilgi görmektedir. Fenolik yapısı sayesinde antioksidan ve antibakteriyel etkinliğe sahip olup, kozmetik, biyomedikal malzemelerde ve ilaç sanayisinde kullanılabilir. Biyoplastikler, biyokompozitler ve kaplamalar gibi alanlarda plastik türevlerine karşı alternatif olarak öne çıkmaktadır. Lignin bazlı biyoaktif malzemeler, yara iyileştirici ürünler, biyosensörler veya ilaç taşıyıcı sistemler gibi uygulamalara da entegre edilebilir. Pandemi sonrası dönemde sağlık teknolojilerine olan talep arttıkça, ligninin bu alandaki potansiyeli daha da önem kazanmaktadır.

Lignin'in geleneksel yöntemlerle ekstraksiyonu, genellikle kimyasal çözücüler kullanılarak yapılır ve bu süreç çevreye zararlı atıklar oluşturmaktadır. Ancak, DÖÇ, çevre dostu bir alternatif sunmaktadır. DÖÇ'ler, en az bir hidrojen bağı donörü ve bir hidrojen bağı alıcısından oluşan, düşük donma noktaları ile karakterize şeffaf karışımlardır. Ayrıca, DÖÇ'ler düşük maliyetli, yeniden kullanılabilir ve kolayca üretilirler. Genellikle doğal

bileşenler (örneğin, kolin klorür ve laktik asit gibi) kullanılarak elde edilen, düşük toksisiteye sahip ve biyolojik olarak parçalanabilir çözücülerdir. Düşük enerji gereksinimi ve biyobozunur yapılarıyla karbon ayak izini minimumda tutar.

Bu çalışma ile lignin ve DDÖÇ gibi 21. yüzyılda önemleri giderek artan iki temanın bir araya getirilmesi hedeflenmiştir.

1.1. Lignin

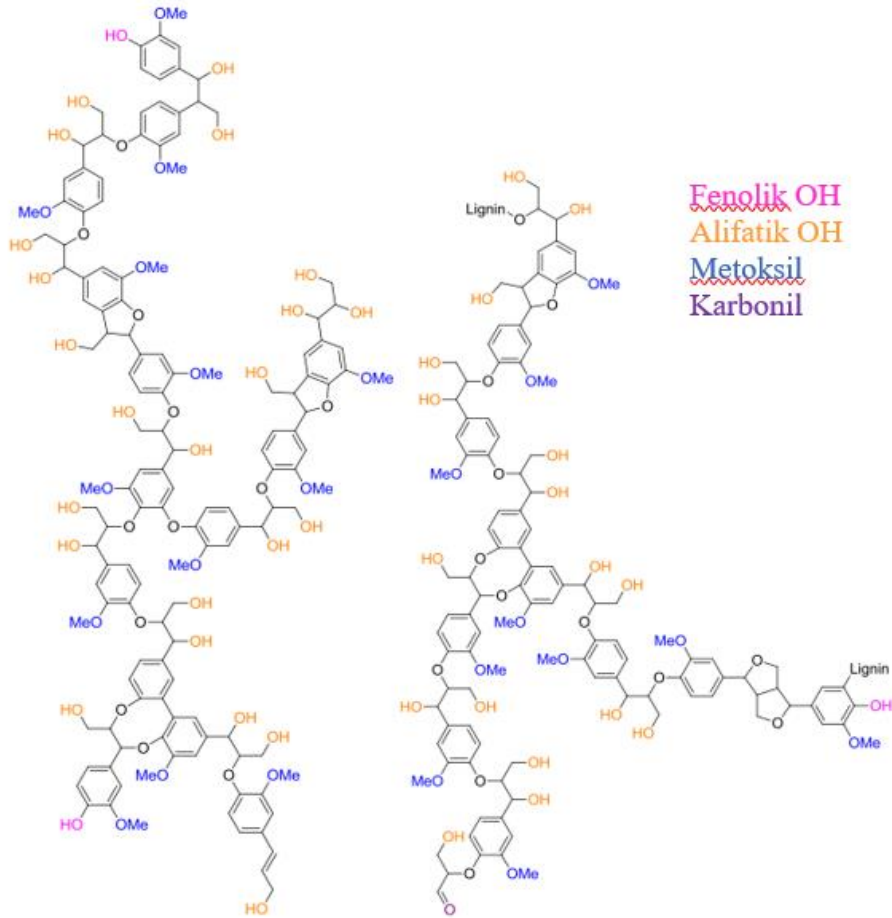
Lignin, selülozdan sonra ikinci en bol bulunan biyopolimerdir ve doğada en çok bulunan aromatik polimerdir (Beisl vd., 2017). Anatomik olarak lignin, karasal vasküler bitkilerin hücre çeperini oluşturmak için önemli bir yapısal malzemedir (Bruijninx vd., 2015). Hücre çeperinde lignin, selüloz, hemiselülozlar ve pektin arasındaki boşlukları doldurur, kovalent olarak hemiselüloza bağlanır, çeşitli bitki polisakkaritleri için bir birleştirme maddesi olarak görev yapar ve sonuçta bitki hücre çeperine bütünlük kazandırır (Doherty vd., 2011).

Bitkilerde lignin farklı oranlarda bulunmaktadır. İğne yapraklı ağaçlarda %25-35 ve yapraklı ağaçlarda %20-25 oranında lignin bulunmaktadır (Christensen, 2013). Lignin, üç yapıtaşından, yani p-hidroksifenil (H), guayasil (G) ve siringil (S) fenilpropanoid birimlerinin (C9 birimleri) radikal polimerizasyonu yoluyla sentezlenir (Zhao vd., 2010). İğne yapraklı ağaçlardan elde edilen lignin esas olarak koniferil alkolden (G) türetilen kısımlardan oluşur, yapraklı ağaç lignini hem koniferil hem de sinapil alkollerden (G-S) türetilmiş kalıntıları içerir, otsu bitkilerden elde edilen ligninler ise üç temel fenol birimlerini içerir (H-G-S) (Fengel ve Wegener, 1984). Ayrıca her lignin grubundaki monolignollerin oranı da bitki türüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Tablo 1.1) (Gellerstedt ve Henriksson, 2008).

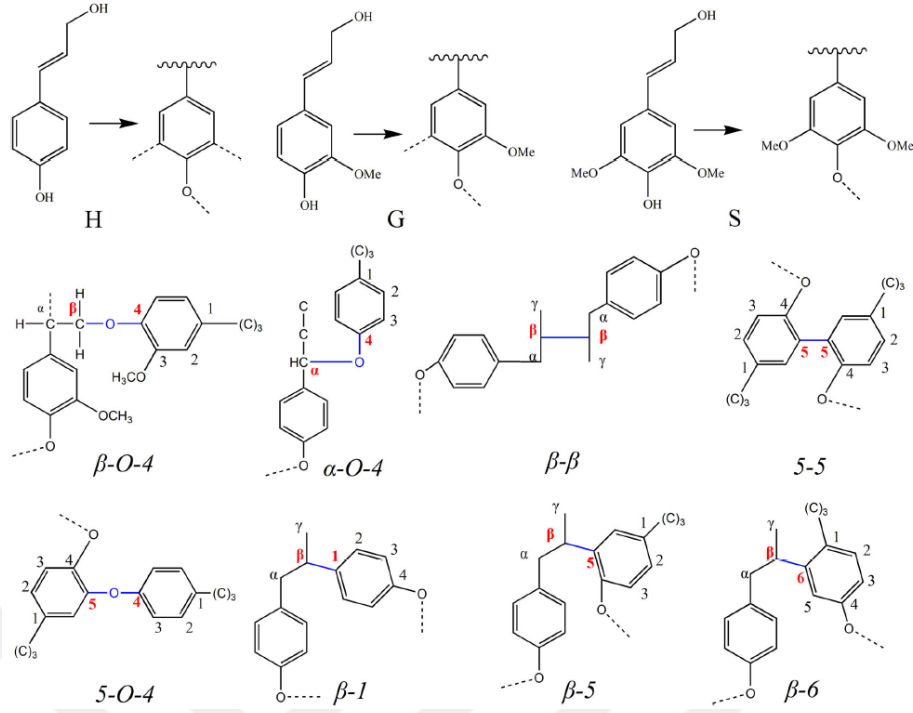
Tablo 1.1: Farklı bitkilerde bulunan lignin yapıtaşları miktarı (%) (Gellerstedt ve Henriksson, 2008)

	P-kumaril alkol	Koniferil alkol	Sinapil alkol
İğne yapraklı ağaç odunu	<5	>95	0
Geniş Yapraklı ağaç odunu	0-8	25-50	45-75
Otsu bitkiler	5-35	35-80	20-55

Lignin çeşitli fonksiyonel gruplar içerir; en yaygın olanları aromatik metoksil ve fenolik hidroksil, alifatik hidroksil ve az miktarda karbonil grubudur (Şekil 1.1). Monomerik C9 birimi, C–O–C ve C–C bağlarıyla bir polimer oluşturacak şekilde bağlanır. Lignindeki birimler arası bağların yaklaşık %50'sini (iğne yapraklı ağaçlarda yaklaşık %45 ve geniş yapraklı ağaçlarda %60'a kadar) β -O-4 eter tipi bağlar oluşturur. Diğer yaygın lignin birimleri arası bağlar, α -O-4 tipi, resinol (β - β'), fenilkumaran (β -5), 5-5' ve 4-O-5'dir (Şekil 1.2). Bu yapıların sayısı farklı ligninlerde değişiklik gösterir (Mandlekar vd., 2018).



Şekil 1. 1: İğne yapraklı ağaç lignin yapısı (Brunow, 2001)



Şekil 1. 2: Lignin yapıtaşları (H: *p*-hidroksifenil, G: Guayasil, S: Şiringil) ve arasındaki bağlar (Tao vd., 2020)

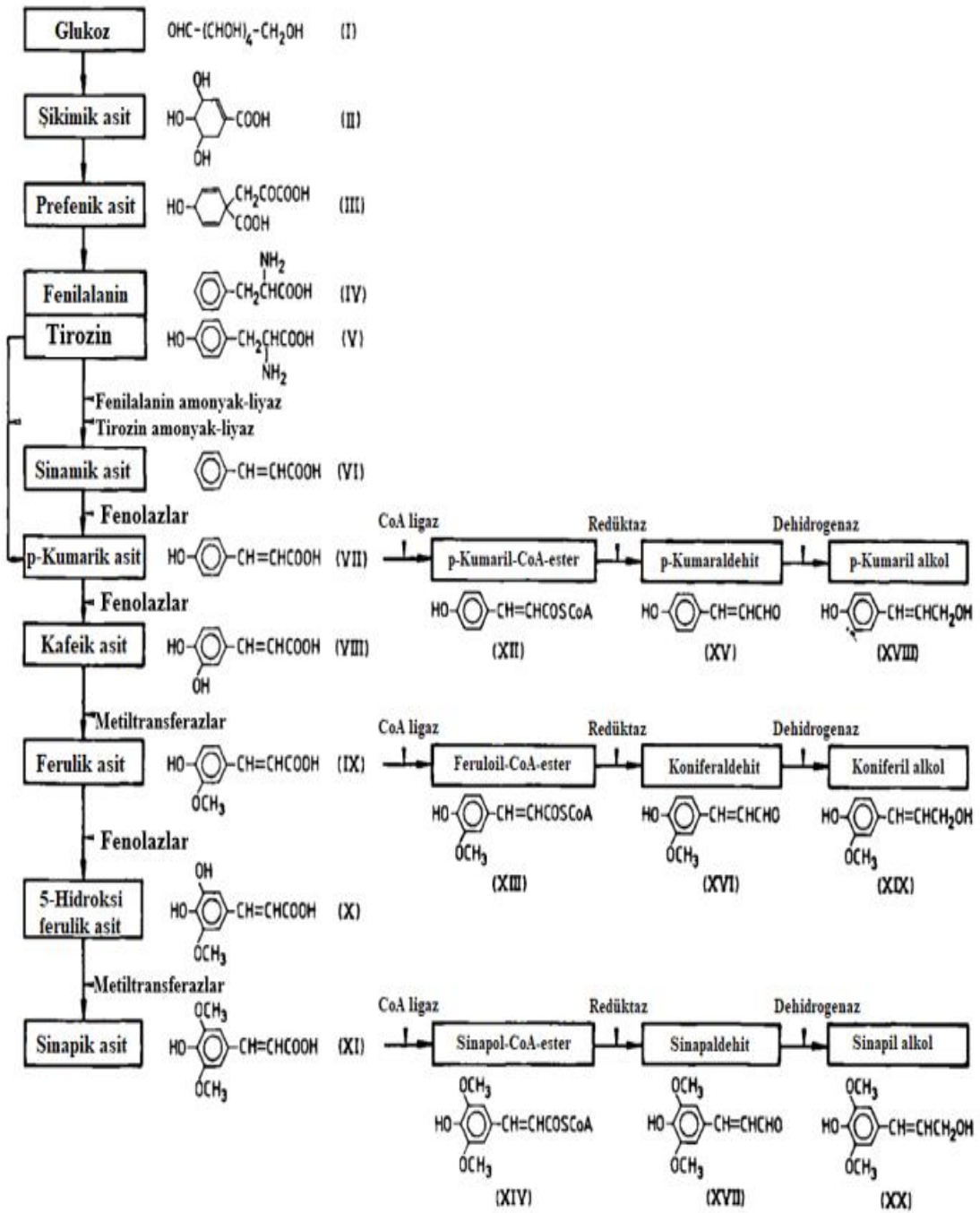
Lignin bitkilerde özellikle aşağıdaki dört temel role sahiptir (Flores vd., 2015):

- Hücre çeperine sertlik kazandırır; odunsu bitki hücre çeperlerindeki polimerleri polisakkaritlerle yakın ilişki içinde çimentolar ve sabitler, böylece lifleri nispeten sert hale getirerek gövdeler ve dallar için mekanik bir destek görevi görür.
- Odunsu dokulardaki farklı hücreleri birbirine yapıştırır; odunda orta lamel esas olarak, farklı hücreleri bir arada tutan etkili ve dayanıklı bir yapıştırıcı görevi gören ligninden oluşur.
- Hücre çeperini hidrofobik hale getirir; suda hücre çeperinin şişmesini engeller ve böylece odunsu hücre çeperinden suyun sızmasını yani hücre çeperinin su geçirmez olmasını sağlar.
- Odunun mikrobiyal bozulmasına karşı korur; odunlaşmış doku o kadar kompakttır ki, mikroorganizmalar tarafından salgılanan polisakkarit parçalayıcı proteinler hücre çeperine nüfuz edemez. Böylece, mikroorganizmalara karşı bariyer görevi görür.

1.1.1. Lignin Biyosentezi

Ligninin bitki tarafından oluşturulması, kapsamlı bir şekilde incelenen ve tekrar tekrar gözden geçirilen karmaşık biyolojik, biyokimyasal ve kimyasal sistemlerden oluşmaktadır.

Ligninin biyosentezi, fotosentezden elde edilen glukoz (I) ile başlar. şikimik asit yolunun en önemli ara maddesi olan şikimik asite (II) dönüşür. İki aromatik amino asit L-fenilalanin (IV) ve L-tirozin (V), bu yolun son bileşikleri olarak prefenik asit (III) aracılığıyla indirgeyici aminasyonu ile oluşturulur. Öte yandan bunlar, aktifleştirilmiş sinamik asit türevleri yoluyla yalnızca üç sinamil alkole değil, aynı zamanda flavonoidler veya stilbenler gibi ekstraktif bileşenlere de yol ačan enzimatik fenilpropanoid metabolizması (sinnamik asit yolu) için başlangıç maddeleridir. Amino asitler, deaminazlar (fenilalanin amonyak liyaz ve tirozin amonyak liyaz) tarafından ilgili sinamik asitlere (VI, VII) deamine edilir. Dięer adımlar, p-kumarik asit (VI), kafeik asit (VIII), ferulik asit (IX), 5-hidroksi-ferulik asit (X) ve sinapik asit (XI) ile sonuçlanan ardışık (fenolazlar (hidroksilazlar) yoluyla) hidroksilasyon ve (O-metiltransferazlar tarafından) metilasyondur. Sinnamil alkoller (XVIII-XX) son olarak ilgili asitlerin koenzim-A tioesterler (XII-XIV) ve aldehytler (XV-XVII) aracılığıyla enzimatik aktivasyonu (CoA ligaz) ve indirgenmesi (NADP redüktaz, NADP hidrojenaz) yoluyla oluşur (Fengel ve Wegener, 1989) (şekil 1.3).



Şekil 1. 3: Glukozdan fenilpropana lignin yapıtaşlarının metabolik yolu (Fengel ve Wegener, 1989)

1.1.2. Ligninin Kalitatif ve Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Bir biyokütlede ligninin varlığının belirlenmesi kalitatif yöntemlerle gerçekleştirilir. Bunlar kısaca kimyasal testler, spektroskopik teknikler ve basit boyama yöntemleri olarak

sınıflandırılabilir. Lignin miktarı ve konsantrasyonu ise kantitatif yöntemlerle belirlenir. Kalitatif yöntemlere göre daha karmaşık olan bu yöntemler gravimetrik, spektrometre, kromatografi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi ileri teknikleri içermektedir. Sınıflandırılan yöntemler ilgili bölümlerde detaylı olarak ele alınmıştır.

1.1.2.1. Kalitatif yöntemler

Lignin yapısında bulunan fonksiyonel grupların sayısı nedeniyle, ligninler çeşitli kimyasal reaktiflerle reaksiyona girebilir, bu da sito ve histokimyasal tespitinde kullanılan çok sayıda renk reaksiyonuna yol açabilir. Ligninin tespiti, çoğu botanikçiler ve bitki fizyologları tarafından geliştirilen 150'den fazla renk reaksiyonu kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Renk reaksiyonunu gerçekleştirmeden önce, odunlaşmış malzeme etanol/benzen (1:2, h/h) ile ve ardından testleri etkileyebilecek ürünleri uzaklaştırmak için su ile ekstrakte edilmelidir. Brauns, 1952'de bu reaksiyonlarda kullanılan reaktifleri beş gruba ayırmıştır; bunlar alifatik bileşikler, fenoller, aromatik aminler, heterosiklik bileşikler ve inorganik reaktiflerdir (Brauns vd., 1960).

1.1.2.2. Kantitatif yöntemler

Ligninin kantitatif tespiti doğrudan ve dolaylı olarak iki kategoride gruplandırılabilir (Tablo 1.2) (Flores vd., 2015).

En eski ve en yaygın yöntem olan doğrudan yöntemler gravimetriye dayanmaktadır ve iki alt kategoriye ayrılabilir:

- Selüloz ve diğer karbonhidratların çözülmesine dayanan ve lignini çözünmeyen bir kalıntı olarak bırakanlar.
- Lignini çözerek onu selüloz ve diğer karbonhidrat türevlerinden ayıranlar.

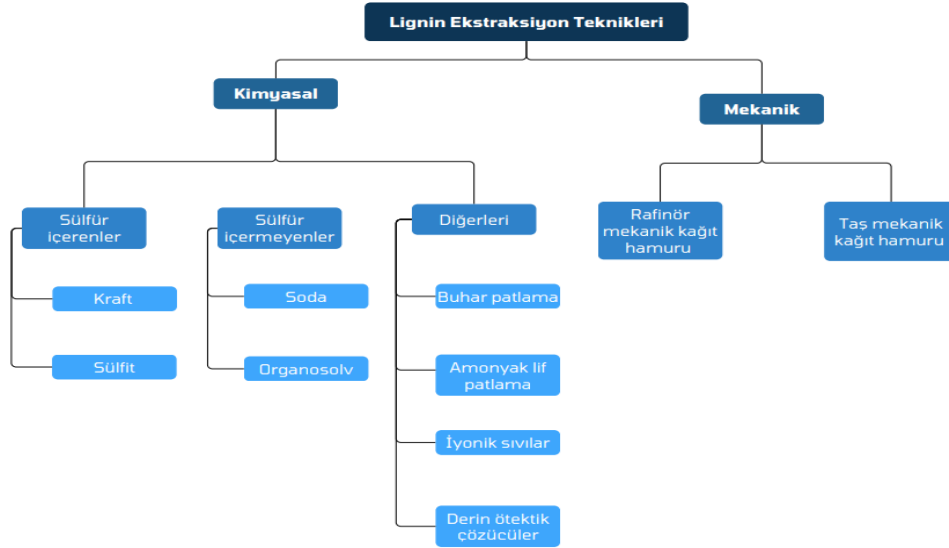
Dolaylı yöntemler, bir lignin izolasyonunu içermez. Bunun yerine, lignin içeriği genellikle polisakkarit içeriğinin %100'e olan farkı olarak veya daha yaygın olarak, belirli bir yapısal işlevselliği, özelliği veya kimyasal tepkiyi ölçerek ve sonucunu konsantrasyonla ilişkilendirerek hesaplanır.

Tablo 1. 2: Ligninin belirlenmesinde kullanılan kantitatif yöntemler

Doğrudan Yöntemler	Kalıntı Olarak Lignin Yöntemleri	Sülfürik Asit Yöntemi: Klason Yöntemi
		Ellis Yöntemi
		Asit Deterjanı
		Dumanlı Hidroklorik Asit Yöntemi
		König ve Rump Yöntemi
		Çökelti Oluşturma Yöntemi
	Çözelti Yöntemlerinde Lignin	Spektrofotometrik Yöntemler
Dolaylı Yöntemler	Kimyasal Yöntemler	Alkali (Mehta) Yöntemi
		Schulze Yöntemi
		Benedikt ve Bamberger Yöntemi
		Cross, Bevan ve Briggs Yöntemi
		Seidel Yöntemi
		Waentig ve Gierisch Yöntemi
	Spektrofotometrik Yöntemler	Mehta Yöntemi
		Asetil Bromür Yöntemi
		Tiyoglikolat Yöntemi
		Pearl ve Benson Yöntemi: Nitrozasyon Yöntemi
		Morrison Yöntemi
		Klor: Roe Klor Numarası
	Oksidan Tüketimine Dayalı Yöntemler	Hipoklorit: Hipo Sayısı
		Metanol Sayısı
		Permanganat Sayı Testi
		Kappa Numarası

1.1.3. Ligninin Ekstraksiyonu ve Ayrıştırılması

Lignoselülozik biyokütleden geleneksel lignin ekstraksiyon yöntemleri, lignin ve diğer yan ürünlerin (selüloz ve hemiselüloz) nihai uygulamasına bağlı olarak genel olarak kimyasal veya mekanik ekstraksiyon olarak da kategorize edilmektedir (Şekil 1.4) (Lobato-Peralta vd., 2021).



Şekil 1. 4: Lignin ekstraksiyon yöntemleri (Lobato-Peralta vd., 2021)

Ligninin ayrıştırılması, bu doğal polimerle ilgili birçok endüstriyel prosesin yanı sıra bunlardan türetilen herhangi bir ligninin nihai uygulamalarının çoğunun ölçeklendirilmesini ve optimizasyonunu belirleyen bir başlangıç adımıdır. Bu tür bir ayrıştırmanın altında yatan temel sorulardan biri, tekrarlanabilir bir ayrıştırma yöntemi bulunurken kalitenin mi yoksa niceliğin mi seçileceğine dayanır. Hem doğal lignine çok benzeyen bir ligninin elde edilmesi arzu edilir hem de yüksek miktarda lignin üretilmesine ihtiyaç vardır. Bu iki öncül, yani nitelik ve nicelik basit görünebilir, ancak her ikisini de aynı anda tatmin edici bir şekilde yerine getirmek kolay değildir (Ramos, 2003).

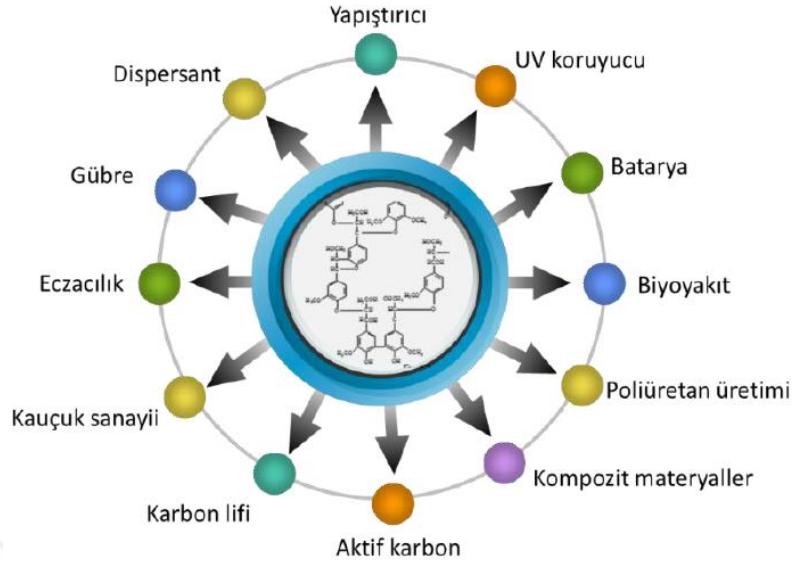
Genel bir perspektiften bakıldığında, ayrıştırma yöntemleri genellikle prosesin ölçeğine göre sınıflandırılır; bu aynı zamanda ayrıştırılan ligninin hedef uygulamasını da ifade eder. Buna göre iki ana grup oluşturulmuştur: laboratuvar amaçlı prosedürler ve ticari uygulamaya yönelik prosedürlerdir. Laboratuvar ölçekli yöntemler kalıntı olarak veya çözünme yoluyla ayrıştırma olarak sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma kapsamındaki yöntemlerden bazıları, örneğin ligninin yapısını ve özelliklerini incelemek için ayrıştırılmasını içerir. Bu yöntemler küçük ya da orta miktarlarda lignini ayrıştırır ve yalnızca bazı özel durumlarda bunlar endüstriyel veya yarı endüstriyel uygulamalara genişletilir. Daha pratik başka bir yaklaşımda, örneğin hamurlaştırma ve biyoetanol üretim süreçlerinin yan ürünleri olarak üretilen ticari ligninler olarak değerlendirilmektedir (Zakzeski vd., 2010). Laboratuvar amaçlı prosedürler ve ticari uygulamalara yönelik prosedürler Tablo 1.3'te özetlenmiştir (Flores vd., 2015).

Tablo 1. 3: Lignin izolasyonu yöntemleri

Laboratuvar Amaçlı Odun ve Otsu Bitkilerden Lignin Ayrıştırma Yöntemleri	Kalıntı Olarak Lignin	Klason Lignin (Sülfürik Asit)
		Willstätter Yöntemi (Dumanlı Hidroklorik Asit)
		Urban Lignin
		Freudenberg Lignini: Cuoxam veya Cuproxam Lignini
		Halse, Runkel ve Fengel Ligninleri
		Fredenhagen Lignini
		Periodat Lignini: Purves Lignini
	Çözünme Yoluyla Lignin	Brauns Lignini (Doğal Lignin)
		Öğütülmüş Odun Lignini (MWL)
		Selülitik Enzim Ligninleri (CEL)
		Enzimatik Hafif Asidoliz Lignini (EMAL)
		Dioksan Asidoliz Ligninler
		Organosolv Lignin
		İyonik Sıvı
		Alkoliz
		Fenol Lignin
		Alkali Yöntemi
		Buhar-patlama Lignini
		Brown-Rot Lignin (Schubert-Nord, Enzimatik Olarak Salınan Lignin)
Ticari lignin		Kraft Lignin
		Sülfite Lignin (Lignosülfonat Prosesi)
		Soda Lignin (Alkali Lignin)
		Organosolv Pulping
		Diğer yöntemler (amonyak lifi patlaması (AFEX), Piroliz lignini,vb.)

1.1.4. Ligninin Kullanım Alanları

Ligninin toksisitesinin olmayışı ve çok yönlülüğü, çeşitli potansiyel endüstriyel uygulama olanakları sağlamaktadır. Bol miktarda bulunabilirlik, maliyet verimliliği, biyo bazlı ve yenilenebilir kimyasallara yönelik artan ihtiyaç, ligninin yüksek değerlikli özellikleridir. Özellikle güç/enerji, makromoleküller ve aromatikler olarak bölümlere ayrılmış çeşitli uygulamalar için önemli potansiyellere sahiptir (Şekil 1.5) (Olgun, 2019).



Şekil 1. 5: Ligninin kullandığı alanlar (Olgun, 2019)

Lignin, kağıt hamuru endüstrisinde yan ürün olarak yılda yaklaşık 70 milyon ton üretilmektedir. Üretilen ligninin yalnızca %2'si katma değerli uygulamalar için kullanılırken, geri kalanı aynı üretim tesislerinde yakıt olarak kullanılmaktadır (Kumar vd., 2009).

Lignin, doğrudan yakıt olarak kullanılabilen veya endüstriyel ve evsel kullanımlar için çeşitli biyokütle türevli yakıt türlerine katkı maddesi olarak dahil edilebilen, yanma ısısı (ısı değeri) 26,7 MJ/kg olan dikkate değer bir ısı değere sahip karbon içeriğine (%60) sahip bir malzemedir. Kağıt endüstrisinde üretilen lignin, bu enerjiyi geri kazanmak için yakılabilir ve 1930'lardan beri birçok kağıt fabrikası enerji kaynağı olarak içerisinde yüksek oranda lignin bulunan siyah çözeltiyi kullanmaktadır.

Enerji üretimi ve ısıtma için odun türevlerinin iki ana preparatı geliştirilmiştir: briketler ve peletler. Biyokütle, briketler için yüksek yoğunluklu katı bloklara veya peletler için kabaca 6-25 mm çapında ve 5-50 mm uzunluğunda silindirlere dönüştürülmek üzere yüksek basınç altında kurutulur ve sıkıştırılır. Diğer arıtılmamış biyokütle atıklarına göre işlenmesi kolaydır ve daha temizdirler. Briketler ve peletler, sıkıştırılmamış katı biyoyakıtlara göre daha yüksek enerji yoğunluğu ve daha küçük hacim sunar ve bunların taşınması ve depolanması daha kolaydır. Pelet söz konusu olduğunda, hem endüstriyel hem de evsel

uygulamalarda elektrik üretimi veya konut ısıtması için lignin ürünlerini piyasada bulmak oldukça kolaydır. Örneğin, Kalundborg'daki (Danimarka) IBICOM biyolojik rafineri tesisi samanın odunsu kısmını şekerlere, etanol ve lignine dönüştürmektedir. Lignin peletlenir ve yakındaki bir elektrik santralinde yakılan kömürün bir kısmının yerine kullanılarak yeşil elektrik üretilir. Bu fabrika yakıt olarak yılda 11400 m³ lignin peleti üretmektedir (Flores vd., 2015). Bu anlamda peletlerin yakıt değerinin bileşime göre incelenmesine yönelik bazı akademik makaleler yayınlanmıştır. Örneğin, Stevens ve Gardner (2010), yaptıkları çalışmada pelet üretiminde oduna lignin ilavesinin peletin yakıt değerini artırdığını tespit etmiştir.

Bitkilerde ve belirli gıdalarda az miktarda bulunan biyoaktif maddeler, yaşam olguları üzerinde fizyolojik bir ilişki ve etkiye sahiptir (Vanholme vd., 2019). Biyoaktif maddeler, mükemmel biyouyumlulukları, kimyasal stabiliteleri ve iyi işlenebilirlikleri nedeniyle biyotıp ve doku mühendisliğinde antioksidan, antiviral ve antikanser malzemeleri veya ajanları olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Feroz vd., 2020). Canlı hücrelerin, dokuların veya organizmaların reaksiyonunu doğrudan tetikleyebilirler ve stabil kalabilirler; dokulara mekanik olarak gömülmüş bir şekilde bağlanan inert biyomateryallere göre özel avantajlar gösterirler (Guaadaoui vd., 2014).

Son yıllarda hayvanlardan, bitkilerden, deniz canlılarından ve mikroplardan kaynaklanan doğal biyoaktif bileşikler, yenilenebilir olmaları, çevre dostu olmaları ve biyolojik olarak parçalanabilir olmaları nedeniyle giderek artan bir ilgi görmektedir. Bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşiklerin bazı örnekleri polisakkaritler, terpenoidler, flavonoidler, tanenler, steroller, amino asit ve lignindir. Bu iyi bilinen doğal biyoaktif bileşikler arasında lignin, bitkilerde önemli miktarda bulunması, olumlu yenilenebilirliği ve Şekil 1.6'da özetlendiği gibi bazı önemli biyolojik aktiviteleri nedeniyle oldukça dikkat çekmektedir (Shu vd., 2021).



Şekil 1. 6: Ligninin biyolojik aktiviteleri ve etkin kullanımları (Shu vd., 2021)

Son zamanlarda, doğal antioksidanlar, bol miktarda bulunmaları, biyolojik uyumlulukları ve serbest radikalleri yok ederek neden oldukları hasarı azaltma, yağ ve yağların oksidasyonunu önleme ve gıdalardaki besin değerinin kaybını önleme yetenekleri nedeniyle önemli ölçüde dikkat çekmektedir (Li vd., 2018). Teknik ligninler, fenolik hidroksil, karbonil, karboksil ve metoksil grupları da dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonel gruplar içerir. Lignin yapısında bulunan fenolik hidroksil ve metoksil gruplarının biyolojik olarak etkin olduğu bildirilmiştir. Antioksidan aktivite (yani serbest radikalleri yok etme verimliliği), kozmetiklerde, polimerik ürünlerde ve ilaçlarda sentetik veya yarı sentetik antioksidanların yerine doğal antioksidan olarak kullanılabilmesi amacıyla ligninlerde en çok incelenen özelliklerden biridir (Espinoza-Acosta vd., 2016). Ligninin antioksidan aktivite etkinliği daha önce bir çok çalışma ile onaylanmıştır (Alzagameem vd., 2018 ; Guo vd., 2018; Iwasaki vd., 2011; Liu vd., 2015). Bu da onu kozmetiklerde, polimer karışımlarında ve ilaçlarda oksidasyonu ve foto veya biyodegradasyonu önlemek için bir katkı maddesi olarak uygun kılar (García vd., 2017).

Derin ötektik çözücü kullanarak elde edilen ligninin antioksidan aktivitesinin belirlendiği bazı çalışmalar aşağıda açıklanmıştır.

Wang vd., (2022) yaptığı çalışmada, ham ve hidrotermal muameleli tütün sapının farklı lignin fraksiyonları elde etmek için asidik ve alkali sistemleri içeren kolin klorür (ChCl), gliserol (Gly) ve $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, laktik asit (LA) ve monoetanolamin (MEA) ile sırasıyla 1:2:0,1, 1:5, 1:6 mol oran) üç farklı DÖÇ kullanılmıştır. Ham ve hidrotermal tütün sapının DÖÇ uygulaması yağ banyosunda, biyokütle/DÖÇ karışım oranları 1:10 (a/a), ham saplar 120 °C de 4 saat, hidrotermal muameleli tütün saplarının ise 2 saat boyunca muamele edilmiştir. Asidik ve alkali DÖÇ delignifikasyonu sırasında geri kazanılan lignin makromoleküllerinin yapısı NMR spektrumları, GPC, FTIR ve TGA teknikleri kullanılarak öğütülmüş odunu lignini (MWL) ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir ve DPPH radikal temizleme aktivitesi test edilmiştir. Hidrotermal muamelenin, geri kazanılan DÖÇ lignininin verimini (%45,3'den %55,3'e; %35,6'dan %43,1'e; %46'dan %58,5'e) artırmıştır. Asidik DÖÇ lignini, alkalın DÖÇ lignininden daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. DÖÇ ligninindeki fenolik hidroksil gruplarının artışıyla yakından bağlantılı olarak DÖÇ lignininin antioksidan aktivitesinin, öğütülmüş odun lignini ve ayrıca sentetik antioksidan olan bütillendirilmiş hidroksitoluene kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür.

Ma vd., (2022a) alkali DÖÇ, ChCl ve MEA 1:6 mol oranında karıştırılarak sentezlemiştir. DÖÇ, 10:1 sıvı-katı oranında endüstriyel ksiloz kalıntısı ile karıştırılmış mikrodalga reaktöründe reaksiyona sokulmuştur. Muamele sıcaklığı, oda sıcaklığından belirli sıcaklıklara (40–120 °C) 1 dakika boyunca yükseltilmiş ve 10 dakika tutulmuştur. Bu çalışmada, elde edilen lignin fraksiyonlarının DPPH antioksidan özellikleri, bu lignin fraksiyonlarının yapısal karakterizasyonu ile özellikleri arasındaki ilişkiyi aydınlatmak için belirlenmiştir. DÖÇ lignininin antioksidan aktivitesi (serbest radikal süpürücü indeks RSI), artan muamele sıcaklığıyla birlikte istikrarlı bir şekilde artmıştır. Ek olarak, bu DÖÇ lignin fraksiyonlarının RSI değerleri (10,06-15,58), kontrol çift enzimatik lignin (DEL)'den (6,57) ve endüstriyel antioksidan bütillenmiş hidroksitolüenden (BHT 2,8) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, DÖÇ lignin fraksiyonlarının ticari antioksidan BHT ile karşılaştırıldığında üstün antioksidan performans sergilediği göstermiştir.

Biyokütle direncinin azaltılması ve aynı zamanda rekonstrüksiyon ve dönüşümün verimliliğinin artırılması biyorafineri prosesinde hayati önem taşımaktadır. Ma vd., (2021a) kontrol ve transgenik kavakların yapısını bozmak ve ligninin ekstrakte edilebilirliğini ve değerlendirilmesini geliştirmek için mikrodalga destekli derin ötektik çözücü (DÖÇ) muamelesi geliştirilmiştir. DÖÇ, kolin klorür (ChCl), etilen glikol (EG) ve gliserol (Gly), alüminyum

klorür heksahidrat ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) karışımlarının 1:2:0,1 molar oranında ısıtılmasıyla sentezlenmiştir. Numunelerin DÖÇ muameleleri, 1:10'luk bir katı:sıvı oranı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Muamele sıcaklığı, 400 W mikrodalga radyasyonu altında bir mikrodalga hızlandırılmalı reaksiyon sistemi kullanılarak 1 dakika boyunca oda sıcaklığından 110 °C'ye yükseltip ve 10 dakika tutulmuştur. DÖÇ lignininin verimi, kontrol kavak ağacıyla (%37,25 ve 38,86) karşılaştırıldığında transgenik kavak ağaçlarında %45,38-53,09 ve %46,38-54,30'a açıkça artmıştır. Transgenik kavak ağaçlarının delignifikasyon oranlarının (%92,98 - %95,13) kontrol kavak ağaçlarından (%90,66 - %92,55) biraz daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, DÖÇ lignin fraksiyonlarındaki moleküler ağırlık ve farklı bağların (β -O-4, β - β , β -5, vb.) bulunurluğu önemli ölçüde azaldığı, bu da mikrodalga destekli DÖÇ muamelesinin güçlü bir yapı bozma yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, DÖÇ lignininin antioksidan aktiviteleri yaygın endüstriyel antioksidan BHT ile karşılaştırılarak araştırılmıştır. Radikal oluşturunca olarak DPPH kullanılmış ve inhibisyon oranı hesaplanmıştır. ChCl-Gly DÖÇ muamelesinden elde edilen ligninlerin antioksidan aktivitesinin, farklı test süreleri altında (16 ve 30 dakika) ChCl-EG DÖÇ muamelesinden elde edilenlerden daha iyi olduğu bulunmuştur. Gly tabanlı DES ligninlerinde antioksidan aktivitesinin zamanla artış oranı, EG tabanlı DES ligninlerinden daha fazla olduğu; bu sonucunun muhtemelen ChCl-Gly muamelesinden elde edilen ligninde S tipi fenolik OH gruplarının (^{31}P -NMR spektrumları) daha fazla olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca, BHT (16 dakika RSI=1,78; 30 dakika RSI =2,23) ile karşılaştırıldığında, DÖÇ lignin fraksiyonları (16 dakika RSI =23,53-13,93; 30 dakika RSI =33,56-15,85) yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir (Ma vd., 2021a).

Ma vd., (2021b) EG, ChCl ve AlCl_3 'ü sırasıyla 2:1:0,1 mol oranında karıştırarak elde ettikleri DÖÇ'ü Abaka'nın delignifikasyonunda kullanmışlardır. Mikrodalga cihazında gerçekleştirilen DÖÇ muamelelerinde süre 30, 60 ve 90 dakika, sıcaklık ise 100, 110 ve 130 °C olarak alınmıştır. Muamele sıcaklığının 100 °C'den 130 °C'ye artmasıyla delignifikasyon oranının %67,38'den %94,61'e, antioksidan aktivitenin 16 dakikada 6,51'den 18,32'ye, 30 dakikada 8,24'den 23,92'e yükseldiği tespit edilmiştir. Ancak geri dönüşüm döngülerinin artmasıyla birlikte antioksidan değerleri 16 dakika 13,95'den 11,60'a, 30 dakika 18,80'den 17,06'ya azalmıştır. ^{31}P NMR verilerine dayanarak, antioksidan aktivitenin fenolik hidroksil gruplarının miktarı ile pozitif bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, tüm DÖÇ lignini, ticari antioksidan olan BHT (antioksidan aktivite değeri 16 dakika 1,95; 30 dakika 2,34) ile karşılaştırıldığında mükemmel antioksidan aktiviteler sergilemiştir.

Triploid *Populus tomentosa*, ChCl , EG ve AlCl_3 (1:2:0,1, mol oranı) ile elde edilen DÖÇ 10:1 sıvı-katı oranı (a:a) kullanılarak 150 ml'lik yuvarlak dipli bir şişede uygulanmıştır. Karıştırma çözeltisi, farklı sıcaklıklarda (90–130 °C) 10 dakika boyunca mikrodalga hızlandırmalı reaksiyon sistemi ile ısıtılarak gerçekleştirilmiştir. Muamele sonrasında kalan DÖÇler geri dönüştürülmüş, hammaddenin optimum muamele koşulu altında (110 °C, 10 dakika) muameleye tabi tutulması için iki kez yeniden kullanılmıştır. Ligninlerin antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Önceki çalışmada olduğu gibi sıcaklık arttıkça DÖÇ ligninlerinin antioksidan aktivitesi artmış (RSI= 4,42-6,17-15,95-17,39-18,05), geri dönüşüm döngülerinin artmasıyla birlikte azalmıştır (RSI=14,26-12,77). Tüm DÖÇ ligninlerin antioksidan aktivitesi BHT antioksidan değerinden (RSI=2,40) yüksek olduğu tespit edilmiştir (Ma vd. 2022b).

Argenziano vd., (2022) yaptıkları bir çalışmada kestane, fındık, yer fıstığı, ceviz ve antep fıstığı kabuklarını bilyalı öğütücü kullanarak küçük parçalara ayırıp 120 °C'de 24 saat boyunca % 20 su içeren, 1:2 (mol/mol) oranında hazırlanmış ChCl :LA DÖÇ ile muamele etmişlerdir. Kapsamlı spektroskopik ve kromatografik analiz, kestane kabuklarında, kabuk ekstraktlarında mevcut ana fenolik bileşenlerin ligninler olduğunun ve buna küçük miktarlarda (%0,9 a/a) ellagik asitin eşlik ettiğini tespit etmişlerdir. Elde edilen ligninlerin, özellikle DPPH testinde (0,03 ila 0,19 mg/ml arasında değişen EC_{50} değerleri) referans antioksidan Trolox'unkilerle karşılaştırılabilir ve hatta ondan daha yüksek umut verici antioksidan özellikler sergilediği belirlenmiştir.

Guo vd., (2020) yaptıkları çalışmada *Miscanthus x giganteus*'tan nötr DÖÇ (ChCl :Gly) ile elde edilen ligninlerin fraksiyonlama verimliliğini arttırmak için, DÖÇ muamelesi esnasında katalizör olarak çevresel kökenli ve ekonomik yaşayabilirliğe sahip üç heteropoli asit (fosfotungstik (PTA), fosfomolibdik (PMA) ve silikotungstik (STA) asitler) kullanmışlardır. Geri kazanılan ligninin yüksek saflığa (%92,7), düşük moleküler ağırlığa (M_w 1520–2470 g/mol), düşük polidispersiteye ($\text{PDI} < 1,7$) ve yüksek lignin verimine (%78,2) sahip olduğunu tespit etmişlerdir. İzole edilen lignin akışlarının potansiyel uygulamasını da değerlendirmek için antioksidan aktivite, in vitro DPPH radikal temizleme yeteneği ile gerçekleştirilmiştir. Antioksidan performansı ($\text{IC}_{50} = 0,042$ mg/ml), ticari antioksidan bütillenmiş hidroksitoluenden ($\text{IC}_{50} = 0,056$ mg/ml) daha iyi olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, heteropoli asitler-nötr DÖÇ sisteminin lignin izolasyonu için önemli ölçüde etkili

olduğunu ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip yeni bir lignin kaynağı sağlandığını göstermiştir.

Bambu işleme kalıntısından hemiselüloz ve ligninin uzaklaştırılması için önce hidrotermal, sonra DÖÇ ile delignifikasyon stratejisi uygulanmıştır. 50 g kuru hammaddenin (Ham) 500 ml suya karıştırılıp, 1 L'lik paslanmaz çelik otoklavda 180 °C'de 30 dakika tutularak otohizoliz gerçekleştirilmiştir. Ortaya çıkan katı kalıntı (R-HT), ChCl:MA, ChCl:EM, ChCl:Gly ile sırasıyla 1:1, 1:6, 1:2 oranlarında elde edilen üç tip DÖÇ ile muamele edilmiştir. Mikrodalgada 120 °C ve 130 °C'de 10 dakika muamele edilmiştir. Elde edilen 6 adet DÖÇ-lignin örneğinin verimi %52,64-53,67 aralığında ve delignifikasyon oranını %77,7-83,75 aralığında olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca en yüksek lignin verimi %53,67 ve en yüksek delignifikasyon oranını %83,75 ChCl: EM ile hidrotermal muameleye tabi tutulmuş örneklerinde olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen ligninin yapısal farkını karşılaştırmak için, çift enzimatik lignin (DEL) örnekleri (DEL-Ham, DEL-HT) kontrol lignini olarak kullanılmıştır. Elde edilen lignin örneklerinin (DEL-Ham, DEL-HT, L-DL-120, L-DL-130, L-EM-120, L-EM-130, L-GLY-120, L-GLY-130) antioksidan aktivitesi DPPH radikal temizleme deneyi ile değerlendirilmiştir. Asidik DÖÇ (ChCl:MA) koşulları altında elde edilen lignin fraksiyonları diğer lignin örnekleriyle karşılaştırıldığında mükemmel antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. DEL-Ham antioksidan aktivitesi (4,22) DEL-HT den (14,28) daha düşük olduğu, hidrotermal muamelenin antioksidan aktiviteyi arttırdığı görülmüştür. Genel olarak ligninin depolimerizasyonu, moleküler ağırlığın azalmasına ve eter bağlantılarının bölünmesine yol açtığı ve ayrıca lignin içinde ArOH'nin hızlı oluşumunu teşvik ettiği vurgulanmıştır (Guo vd., 2022).

Li vd., (2021) ChCl ve oksalik asit (OA) ile 1:1 mol oranında hazırladıkları DÖÇ ile Bamboo *Dendrocalamus yunnanicus*'u konsantrasyon ağırlıkça %10 olacak şekilde basınçlı reaktörde muamele gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karışımlar sürekli karıştırılarak hedef sıcaklıkta (80 °C, 90 °C, 100 °C, 110 °C ve 120 °C) 4 saat ısıtılmıştır. Yüksek muamele sıcaklığıyla hem lignin verimi (%12,1-30,5) hem de delignifikasyon oranı (%57,9-78,1) artmıştır. Elde edilen lignin örneklerinin antioksidan aktivite özelliklerini enzimatik asidoliz lignin (EMAL) ve iki tipik ticari antioksidan olan BHA ve BHT ile karşılaştırmalı olarak DPPH radikal süpürme testi ile tahmin edilmiştir. Tüm lignin örneklerinin DPPH'ye karşı etkileri, lignin konsantrasyonunun ve DÖÇ delignifikasyon sıcaklığının artmasıyla birlikte

gelişmiş antioksidan aktiviteler sergilemiştir. Ayrıca alifatik OH içeriğindeki azalmanın, ligninin antioksidan aktivitesinde artışa neden olabileceği vurgulanmıştır.

Wang vd., (2019) yaptıkları çalışmada, yüksek saflıkta ve antioksidatif lignin üretmek amacıyla hibrit *Pennisetum* verimli muamele için Lewis asitlerini (AlCl_3 , FeCl_3 , FeCl_2 , ZnCl_2 ve CuCl_2) CHCl_3 /gliserole dahil etmeye yönelik bir strateji geliştirmişlerdir. Muamele sıcaklığı ve süresinin ekstraksiyon verimliliği, kimyasal yapılar ve özelliklerin (ilişkili polisakkaritler, moleküler ağırlıklar, lignindeki bağlantı bağları) yanı sıra hidroksil grupları (lignin ve fenolik hidroksilin yan zincirindeki karboksil grupları ve alifatik hidroksil grupları) üzerindeki etkileri de kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Ayrıca, ligninlerin antioksidan kapasitesi DPPH radikal temizleme testi ile değerlendirilmiştir. Üçlü karışımlar (CHCl_3 :Gliserol:Lewis asit ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , CuCl_2) 62:124:1 mol oranı olacak şekilde hazırlanmıştır. DÖÇ muameleleri hibrit *Pennisetum* (2.0 g) ve DÖÇ (20.0 g), 120 °C ve 6 saat muamele edilmiştir. CHCl_3 -Gliserol DÖÇ'e bir Lewis asidi eklenmeden belirgin bir delignifikasyon gözlenmezken, bir Lewis asidi özellikle AlCl_3 , FeCl_3 ve CuCl_2 'nin kullanımı, DÖÇ muamelesinden sonra elde edilen hibrit *Pennisetum*'un delignifikasyonunu önemli ölçüde iyileştirerek %85 verime ulaşmıştır. FeCl_3 içeren DÖÇ kullanıldığında lignin verimi ağırlıkça %49'a kadar çıkmıştır. Bu, AlCl_3 , FeCl_3 ve CuCl_2 'nin dahil edilmesinden sonra elde edilen CHCl_3 -Gliserol DÖÇ'in artan H-bağı kabul etme yeteneği ve asidik kuvvetinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu sonuçlardan yola çıkarak, FeCl_3 bazlı DÖÇ kullanılarak 60 °C, 80 °C, 100 °C, 120 °C ve 140 °C'de sırasıyla 1, 2, 4 6 ve 9 saat süreyle muamele edilmiştir. Muamele süresinin uzamasıyla ve sıcaklıklarıyla hem lignin verimi hem de delignifikasyon oranı arttırmıştır. Bununla birlikte, çok yüksek sıcaklık ligninin izolasyonunu sınırladı çünkü lignin yoğunlaşması ligninin DÖÇ içindeki çözünürlüğünün azalmasına yol açmıştır. Fenolik hidroksil gruplarının içeriği ile antioksidan aktivite arasındaki korelasyonu değerlendirmek için çift enzimatik ligninin (DEL) antioksidan aktiviteleri ve DÖÇ lignin örnekleri araştırılmış ve ticari BHA antioksidanınıninkine karşılaştırılmıştır. DEL ($\text{IC}_{50}=0,279$ mg/ml) ile karşılaştırıldığında, ligninlerin IC_{50} değerleri daha düşüktü (IC_{50} değerleri $\text{L}_{\text{CuCl}_2}=0,105$; $\text{L}_{\text{AlCl}_3}=0,092$; $\text{L}_{120-6}=0,085$; $\text{L}_{140-6}=0,055$; $\text{L}_{120-2}=0,115$; $\text{L}_{120-4}=0,098$; $\text{L}_{120-9}=0,062$ mg/ml) bu da DÖÇ muameleinden sonra elde edilen ligninin DEL'den daha iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ligninin antioksidan aktivitesi, DÖÇ ön muamele koşullarının şiddetinin artmasıyla birlikte kademeli olarak artmıştır. Ayrıca L_{140-6} ve L_{120-9} 'un antioksidan aktiviteleri BHA'ninkinden ($\text{IC}_{50}=0,074$ mg/ml) daha iyi olduğu bulunmuştur. DEL ve

ligninlerin fenolik hidroksil grup içeriği ve antioksidan aktivitesine ilişkin sonuçlara dayanarak, daha önce bildirilen çalışmalarla uyumlu olarak antioksidan aktivitenin lignindeki fenolik hidroksil gruplarının miktarıyla yakından ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Ligninin yapısını oluşturan çok sayıda polifenolik bileşik nedeniyle ligninin yüksek derecede antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Bu polifenoller hücre zarlarını tahrip ederek hem gram pozitif hem de negatif bakterilerin parçalanmasına neden olabilir. Hücre çözünmesinin kesin mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte, lignindeki fenolik bileşiklerin, hücre zarının iyon geçirgenliğini arttırarak hücre ölümüne neden olduğu bilinen iyonoforlar gibi davranabileceği düşünülmektedir (Kalinowski ve Shi, 2019). Literatürde ligninin antimikrobiyal özelliklerini etkileyen, lignin konsantrasyonu, kullanılan lignin monomerlerinin/polimerlerinin kimyasal yapısı, ekstrakte edilen ligninin kökeni ve test edilen mikroorganizmaların türü gibi çeşitli faktörler bulunmuştur (Flores vd., 2015; Cazacu vd., 2012).

Alzagameem vd., (2019) endüstriyel Kraft siyah çözültiden lignin ekstraksiyonu için, değişen pH, sıcaklık ve karıştırma süresiyle HCl ve H₂SO₄ kullanılarak kademeli asidik çöktürülmesi gerçekleştirilmiştir. L1, oda sıcaklığında H₂SO₄ ile 90-180 dakika boyunca pH 2 olana kadar karıştırılarak; L2, L1'in dietil eter ile ısıtılması yoluyla hazırlanmıştır. Sırasıyla aseton ve etanol ile seçici ekstraksiyonu ile L3 ve L4'ü üretilmiştir. Tüm örnekleri çöktürmek için dietil eter kullanılmıştır. Organosolv ligninler, ladin/çam odunundan (L5), kayın odunundan (L6) ve Miscanthus'tan (L7) elde edilmiştir. Lignin örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi, gram pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* ile gram negatif bakteri olan *Escherichia coli*'ye karşı disk difüzyon yöntemiyle inhibisyon bölgeleri ölçülerek belirlenmiştir. Gram pozitif bakteriler, gram negatiflere göre daha fazla inhibe edilmiştir. *E. coli* ile ilgili olarak incelenen ligninlerin tümü hiçbir aktivite göstermemiştir. *L. monocytogenes* üzerinde L1, L2, L5 ve L6 ligninlerinin inhibisyon bölgelerinin olduğu, *S. aureus*'ta ise L1, L5 ve L6'da inhibisyon bölgelerinin olduğu görülmüştür. İğne yapraklı ağaçtan elde edilen organosolv ligninin (L5) belirli aktiviteleri bulunurken, L7 otsu bitkiden elde edilen ligninin hiçbir aktivitesi bulunmamıştır. Kayın bazlı (L6) numune, özellikle ladin/çam bazlı numunelerden (L5) daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan L1, bir kraft lignini olarak L5'ten daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Kaur vd., (2017) yaptıkları bir çalışmada NaOH çözeltisi kullanılarak şeker kamışı küspesinden lignin ekstrakte etmişlerdir. Bu çalışma, elde ettikleri lignini asetilasyon, epoksidasyon ve hidrosimetilasyon reaksiyonları ile modifiye ederek *Bacillus aryabhattai* ve *Klebsiella* sp. bakterileri üzerine etkileri bakteriyel duyarlılık filtre kağıdı disk yöntemiyle değerlendirilmiştir. Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda değişen inhibisyon gösteren şeker kamışı küspesi lignini ve modifiye edilmiş ligninler, *Bacillus aryabhattai* ve *Klebsiella* sp. için minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Lignin ve modifiye edilmiş ligninlerin antibakteriyel aktivitelerinin konsantrasyona bağlı olduğu, konsantrasyon arttıkça etkinliğin arttığı bulunmuştur. Ligninlerin antibakteriyel etkinliği *Bacillus* sp.'nin *Klebsiella* sp.'ye göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Epoksi ligninin test edilen tüm konsantrasyonlarda en yüksek büyüme inhibisyon bölgelerini oluşturduğu gözlemlenmiştir. Lignin ve modifiye ligninlerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri *Bacillus* sp. için daha düşük, *Klebsiella* sp. için daha yüksek bulunmuştur. Epoksi ligninin MİK değerleri, test edilen bakterilere karşı modifiye ligninler arasında en düşük olanıdır (*Bacillus* sp ve *Klebsiella* sp. için sırasıyla 90 ve 200 µg/disk). *Bacillus* sp. ve *Klebsiella* sp. için en yüksek MİK değerleri (sırasıyla 240 ve 425 µg/disk) asetillenmiş ligninde bulunmuştur. Tüm ligninler için MİK değerleri, *Klebsiella* sp.'ye karşı en yüksek ve *Bacillus* sp.'nin büyümesine karşı en düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, test edilen bakteriler arasında tüm materyallerin *Bacillus* sp.'nin kontrolü için daha etkili ve *Klebsiella* sp.'ye karşı daha az etkili olduğunu ortaya koymuştur. Modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş ligninlerin antibakteriyel aktivitelerinin standart tetrasiklinden daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu nedenle fenolik polimerlerin benzen halkasındaki substitüsyonların varlığının, bunların farklı mikroorganizmalara karşı antibakteriyel potansiyelini etkilediği ve antibakteriyel aktiviteden metoksil ve epoksi gruplarının sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

Dong vd., (2011) etanol üretimine yönelik mısır atığı lignin kalıntısı kullanılmıştır. Kalıntı, seyreltik asit buharıyla muameleden geçirildikten, enzimatik hidrolizden ve fermantasyondan sonra üretilmiştir. 4 farklı lignin ekstraktları, Ekstrakt 1, 95 °C, 120 dakika, kalıntı/çözücü oranı 1:4 (h/a), Ekstrakt 2, 95 °C, 120 dakika, kalıntı/çözücü oranı 1:2 (h/a), Ekstrakt 3, 22 °C, 20 dakika, kalıntı/çözücü oranı 1:4 (h/a), Ekstrakt 4, 22 °C, 20 dakika, kalıntı/çözücü oranı 1:2 (h/a) alkali ekstraksiyon yöntemi (%4 sodyum hidroksit çözeltisi) kullanılarak hazırlanmıştır. Mikrobiyal inhibisyon, sıvı inkübasyon yöntemi kullanılarak lignin ekstraktı 1, orijinal lignin kalıntısı ve ticari lignin test edilmiştir. Antibakteriyel tarama çalışmasında test organizması olarak *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*,

Salmonella enterica serovar *enteritidis*, *E. coli* suşları kullanılmıştır. Lignin örneklerinin Gram-negatif bakteriler (*E. coli* ve *S. Enteritidis*) üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olmadığı, Gram pozitif bakteriler (*L. monocytogenes* ve *S. aureus*) üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Lignin ekstraktı 1 güçlü bir inhibitör etki gösterdiği, ancak ticari ligninden daha düşük etkiye sahip olduğu görülmüştür. Tarama çalışmasının ardından, lignin ekstraktlarının Gram-pozitif bakterilere *L. monocytogenes* ve *S. aureus* karşı antimikrobiyal aktiviteleri, mikrodilüsyon testi kullanılarak test edilmiştir. Lignin örnekleri TSB’de (Triptik Soy Agar) %5 DMSO’da hazırlanmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri, bakteriler için 37 °C’de 24 saatlik inkübasyon sonrasında organizmanın büyümesini inhibe eden ekstrelerin en düşük konsantrasyonu, minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri, bakteriler için 37 °C’de 48 saatlik inkübasyonun ardından organizmaların %99,9’undan fazlasını öldüren en düşük ekstre konsantrasyonu olarak alınmıştır. Olağanüstü antimikrobiyal etkiye sahip olan ticari lignin, yüksek pH’ı (10,5) ve TSB’deki iyi çözünürlüğü nedeniyle olabilirken, lignin ekstraktı 1 yaklaşık olarak nötr pH’a sahip ve TSB’de çözünmediği belirtilmiştir. Lignin ekstraktları, *L. monocytogenes* üzerinde en büyük MİK ve MBK’ye sahipti, bunların tümü 10 mg/ml’den yüksek olduğu görülmüştür (test edilen en yüksek konsantrasyon). Lignin ekstraktları *S. aureus* üzerinde en küçük MİK ve MBK’ye sahip olduğu; MİK 1,25 mg/ml ve 5,625 mg/ml aralığında ve MBK 1,25 mg/ml ile 10 mg/ml’nin üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak, ekstrakt 1, diğer üç ekstraktla karşılaştırıldığında en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve antimikrobiyal tarama çalışmasının sonuçlarından farklı olarak ticari ligninle karşılaştırıldığında daha da yüksek olduğu belirlenmiştir. Farklılık, mikrodilüsyon yönteminde daha düşük lignin konsantrasyonu kullanıldığından pH’ın düşmesinden, ayrıca ligninin TSB’deki çözünürlük problemi, lignin ekstraktlarının %5 DMSO içeren TSB içerisinde çözülmesinden kaynaklanıyor olabileceği vurgulanmıştır (Dong vd., 2011).

Yun vd., (2021) yaptıkları çalışmada, bambu kraft lignininden susuz aseton, %50 aseton ve %37,5 heksan ile sıralı organosolv fraksiyonlaması yoluyla hazırlanmıştır. Kraft lignin, aseton ile 24 saat karıştırılmıştır. Karıştırdıktan sonra çözelti, süpernatantı elde etmek için süzölmüştür. Daha sonra elde edilen süpernatant ile distile su eklenerek 5 saat karıştırılmıştır. Çökelti (L1) filtrasyon yoluyla elde edilmiştir. Nihai süpernatant, 600 ml heksanla 5 saat karıştırılmıştır. Karıştırdıktan sonra çözelti süzülerek çökelti (L2) ve süpernatant elde edilmiştir. Daha sonra, katının (L3) elde edilmesi için süpernatanttaki solventin uzaklaştırılması amacıyla döner buharlaştırma gerçekleştirilmiştir. Elde edilen

katılar vakumlu kurutma fırınında kurutulmuştur. L1 Lignin fraksiyonlarının antimikrobiyal aktivitesi, mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak Gram-negatif bakteriler *E. coli* ve *Salmonella* ile Gram-pozitif *Streptococcus* ve *S. aureus* bakterilerine karşı test edilmiştir. Hem orijinal ligninin (LO) hem de fraksiyonlanmış ligninlerin (L1, L2 ve L3), büyümelerini önemli ölçüde inhibe ederek tüm bakteriler üzerinde mükemmel önleyici etkiler sergilediği; L3 örneğinin en güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir. Bu sonucun örnekteki yüksek fenolik hidroksil grubu içeriğine ve düşük molekül ağırlığı olabileceği belirtilmiştir. Elde edilen bu sonuç doğrultusunda lignin L3'ün antimikrobiyal aktivitesinin analizi, test edilen her bakteriye karşı LB agar ortamında farklı konsantrasyonlarda (0,4–1,6 mg/ml) gerçekleştirilmiştir. L3 lignini, tüm bakterilere özellikle *E. coli*'ye karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Örneğin, 1,6 mg/ml L3 ile muamele edilen *E. coli* için %95,61'lik bir inhibisyon oranı tespit edilmiştir; bu oran *Salmonella* için %89,60, *Streptococcus* için %66,62 ve *S. aureus* için ise %64,68 olarak tespit edilmiştir.

Zourif vd., (2024) organosolv prosesi kullanarak *Reseda luteola* L.'nin boya ekstraksiyonundan atık olarak kalan biyokütlesinden ligninin ekstrakte edilmesi, elde edilen lignin karakterize edilmesi, antimikrobiyal, antioksidan ve anti-UV maddesi olarak potansiyel uygulamalarının araştırılmasını amaçlamışlardır. Reseda atık tozu, kütle konsantrasyonu %75 ila 99 olan (formik asit ve asetik asit arasında 70:30 h/h oranıyla) bir organik asitle, 1:10 ile 1:4 arasında katı/sıvı oranıyla muamele edilmiştir. FA/AA işleminden sonra filtre üzerinde kalan artık lifler, Peroksiformik asit/peroksiasetik asit (PFA/PAA) çözeltileri karışımı ile işlenmesi yoluyla delignifikasyona tabi tutulmuştur. FA/AA ve PFA/PAA işlemlerinden sonra elde edilen sıvılarda çözündürülmüş lignin, damıtılmış su ile çökeltilerek elde edilmiştir. *Reseda luteola* L.'den elde edilen ligninin antibakteriyel aktivitesi 4 bakteri suşuna *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* karşı değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak Klortetrasiklin ve negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır. Diğer bazı bitkilerden ekstrakte edilen ligninlerin antibakteriyel özellikler gösterdiği bildirilen birçok çalışmanın aksine, *Reseda luteola* L. ligninin, en azından test edilen türlere karşı antibakteriyel etkilere sahip olmadığı görülmüştür. Antibakteriyel aktivitedeki bu belirgin fark, öncelikle bu ligninin kimyasal bileşimi ve yapısındaki farklılıklarla açıklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Hidrojeller, suyu tutabilen ve biyoaktif bileşikleri serbest bırakabilen üç boyutlu ağ yapısına sahip çok yönlü malzemelerdir. Tarım, biyomateryal sentezi ve farmasötikler dahil olmak

üzere çeşitli alanlarda uygulama bulmuşlardır. Doğal antimikrobiyal bileşiklerin hidrojellere dahil edilmesi, özellikle yara iyileştirici pansumanlar için toksik olmayan biyomedikal malzemelerin geliştirilmesinde umut verici bir yaklaşımdır. Hidrojel bazlı bir bandaj üretmek için iyileştirici, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı kaju elma küspesi lignininin (CAB-Lig) ekstraksiyonu ve kullanımı değerlendirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, asit ve alkali işlemlerini ve ardından çöktürülerek gerçekleştirilmiştir. CAB-Lig'in, formüle edilmiş hidrojellerin ve hidrojel içeren lignin ile formüle edilmiş bandajların antimikrobiyal aktiviteleri, dilüsyon yöntemiyle gram negatif bakteriler *Escherichia coli* ve gram pozitif *Staphylococcus aureus*'a karşı değerlendirilmiştir. CAB-Lig'in her iki bakteriye karşı önemli antimikrobiyal aktivitesini ortaya çıkarmış ve sırasıyla %10 ve %5 konsantrasyonlarda *E. coli* ve *S. aureus*'un %100 yok edilmesini sağlamıştır. %3'ü aşan lignin konsantrasyonları yine de *E. coli* sayısını önemli ölçüde azalttığı ve %1'in üzerindeki konsantrasyonlar *S. aureus* büyümesini %94'e kadar inhibe ettiği; bu da CAB lignininin antimikrobiyal bir madde olarak önemli potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur. %3 ve %5 lignin içeren hidrojeller, her iki mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal özellikler göstermiştir. %3 CAB-Lig konsantrasyonunda, *E. coli* ve *S. aureus* için sırasıyla 7 mm ve 21 mm çapında inhibisyon zonları oluşmuştur. %5'de bu çaplar mikroorganizmalar için sırasıyla %85,7 ve %38,1 artmıştır. Bununla birlikte, %7,5 ve %10 CAB-Lig konsantrasyonlarında, ortamdaki aşırı lignin difüzyonu, potansiyel inhibisyon bölgelerinin gözlemlenmesini engellemiştir. CAB-Lig içeren hidrojel bandajların, %3 ve %5 CAB-Lig'de sırasıyla 44,8 mm ve 46,3 mm inhibisyon zon çaplarıyla *S. aureus*'un büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir. Hidrojel bandajların ayrıca %3 ve %5'da sırasıyla 34,7 mm ve 38,2 mm inhibisyon bölgesi çaplarıyla *E. coli* bakterilerinin büyümesini etkili bir şekilde engellediği görülmüştür (Albuquerque vd., 2024).

Zhang vd., (2022) yaptıkları çalışmada, kitosan-sitrik asit/kitosan-adipik asit (CA) ve kitosan-malik asit/kitosan-adipik asit (MA) çözeltilerinden yeni bir kitosan filmi hazırlanmış ve doğal betain bazlı (BE:LA 1:2) derin ötektik solvent (ağırlıkça %0-30) ve lignin (ağırlıkça %1) ilavesiyle plastikleştirilmiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*, temsili gram pozitif ve gram negatif bakteriler olarak seçilmiştir. Tüm filmler *S. aureus*'a karşı *E. coli*'ye göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak, lignin içeren ve içermeyen numunelerde DÖÇ miktarı ağırlıkça %10'dan %30'a yükseldikçe, özellikle CA bazlı filmler için *S. aureus*'a yönelik inhibisyon bölgesinin çapında bir artış olmuştur. Bunun tersine, *E. coli* için inhibisyon bölgesinde gözle görülür bir fark gözlenmemiştir.

1.2. Derin Ötektik Çözücü (DÖÇ)

Ötektik karışım, iki veya daha fazla bileşenin belirli bileşim oranlarında oluşturduğu, bileşenlerinin erime noktalarından daha düşük bir sıcaklıkta eriyen ve donan homojen bir karışımı ifade eder. Abbott ve arkadaşları, 2003 yılında ChCl (kolin klorür) ve üre ile 1:2 mol oranında oluşturulan bir DÖÇ kavramını ilk kez tanımladılar. ChCl bir kuaterner amonyum tuzu (hidrojen bağı alıcısı) ve üre hidrojen bağı vericisi olarak işlev göstermekte olup, erime noktaları sırasıyla 302°C ve 133°C 'dir. Bu karışımda, donma noktası düşüşü 178°C , ötektik nokta ise 12°C idi. Karışımın donma noktasının bileşenlerin erime noktalarına göre büyük ölçüde azalmasının nedeni, hidrojen bağları aracılığıyla oluşan yük dağılımıdır. Bunları iyonik sıvılardan ayırmak için bu çözücü sınıfına derin ötektik çözücü (DÖÇ) adı verilmektedir (Abbott vd., 2003; Abbott vd., 2004).

DÖÇ'ün sentezi Smith vd., (2014) tarafından geliştirilen genel bir eşitlikle açıklanabilir (Eşitlik 1).



Cat^+ : amonyum, fosfonyum veya sülfonyum katyonu

X: Lewis bazı (halid anyonu)

Y: Lewis yada Brønsted asidi

z: Anyonla etkileşen Y molekülü sayısı.

DÖÇ'in oluşumu hidrojen bağı üzerine kurulduğundan, proton veya elektronları bağışlayabilen veya kabul edebilen çok çeşitli bileşenler DÖÇ sentezi için uygundur. Bugüne kadar bildirilen DÖÇ'lerin çoğunluğu, Tablo 1.4'de gösterildiği gibi, kompleks oluşturucu maddenin doğasına bağlı olarak beş ana kategoride sınıflandırılmıştır (Kalhor ve Ghandi, 2019; Zhou vd., 2022; Odegova vd., 2024). Tip I DÖÇ'ler, kuaterner amonyum tuzu (örneğin, kolin klorür, ChCl) ve metal halojenürden (örn. AlCl_3) oluşur. Tip II DÖÇ'ler temel olarak bir kuaterner amonyum tuzu ve bir hidratlanmış metal halojenür (örn. $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) içerir. Bu kimyasallar, doğaları gereği havaya ve neme karşı duyarsız olduklarından endüstriyel işlemler için daha uygundur. Tip III DÖÇ'ler esas olarak kuaterner amonyum tuzu ve çeşitli HBD'lerden (örn. karboksilik asitler) oluşur. Bu tür DÖÇ, düşük maliyetli başlangıç malzemeleri ve kolay hazırlanabilmeleri nedeniyle biyokütle işlemede

en yaygın şekilde kullanılır. Tip IV DÖÇ'ler, metal tuzu normal olarak sulu olmayan ortamda iyonize olmasa da inorganik geçiş metallerini ve HBD'leri (örn., üre) içerir. Tip V DÖÇ'ler ise yalnızca iyonik olmayan moleküler maddelerden oluşur ve hidrofobiktir (Abranches vd., 2019; Zhou vd., 2022).

Tablo 1. 4: DÖÇlerin sınıflandırılması

DÖÇ tipi	Bileşen I	Bileşen II	Örnek
Tip I	Kuaterner amonyum tuzu	Metal halojenürler	Kolin klorür+ZnBr ₂
Tip II	Kuaterner amonyum tuzu	Hidratlanmış metal halojenürler	Kolin klorür + CaCl ₂ .6H ₂ O
Tip III	Kuaterner amonyum tuzu	Hidrojen bağı donörü	Kolin klorür+ laktik asit
Tip IV	Metal tuzu	Hidrojen bağı donörü	ZnCl ₂ +Üre
Tip V	Fenolik grup	Alifatik hidroksil grup	Timol+Mentol

DÖÇ sistemlerinin kolayca bulunabilen, düşük maliyetli ham bileşenlerden hazırlanabilme kolaylığı, onun en çekici özelliklerinden biridir (Zhu vd., 2021). DÖÇ'in ötektik bileşimi, iki veya daha fazla katı hal bileşeninin ısıtılması ve karıştırılmasıyla şeffaf ve viskoz homojen bir sıvı elde edilmesiyle oluşturulur (Nahar ve Thickett, 2021). DÖÇ, literatürde belgelenen çeşitli teknikler kullanılarak hazırlanmaktadır (Şekil 1.7) (Elhamarnah vd., 2024).



Şekil 1. 7: DÖÇ hazırlama teknikleri (Elhamarnah vd., 2024)

1.2.1. Derin Ötektik Çözücülerin Avantajları

Başlangıç malzemelerinin düşük maliyeti ve yüksek saflığı nedeniyle DÖÇ'ler düşük maliyetle yüksek saflıkta kolaylıkla sentezlenebilmektedir. Sentez prosedürleri çok basit ve anlaşılır olup yalnızca kuaterner amonyum, fosfonyum veya sülfonyum tuzları ve HBD'ler mekanik olarak uygun mol oranında elde edilir ve bu reaksiyon sırasında herhangi bir atık ürün oluşmaz. Bu nedenle, yeşil kimyanın on iki ilkesine göre, DÖÇ'lerin sentezi yeşildir ve çevreye zararsızdır çünkü reaksiyonları sıfır emisyonu, sıfır E-faktörü değerine ve %100 kütle verimliliğine sahiptir (Deetlefs ve Seddon, 2010). Ekonomik açıdan bakıldığında DÖÇ'ler, IL'lerin bileşenlerinden yaklaşık on kat daha ucuzdur (Gorke vd., 2010).

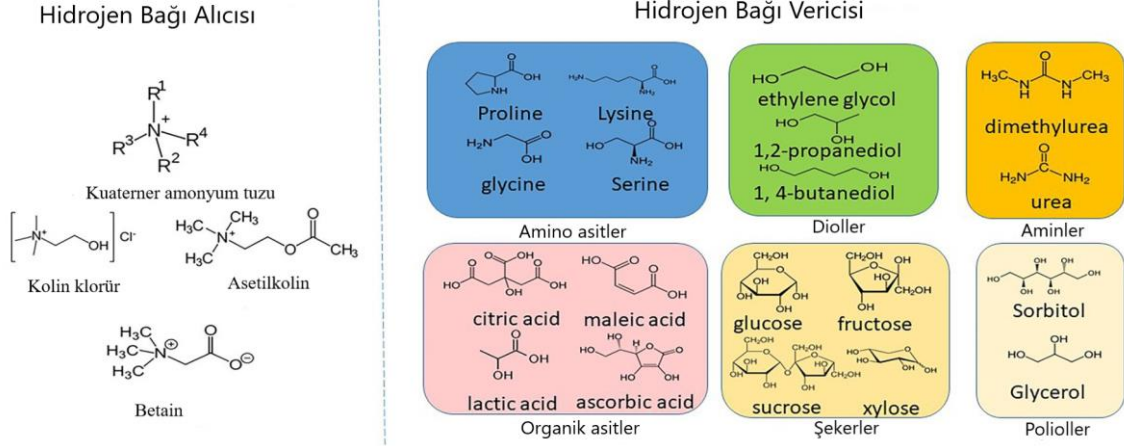
DÖÇ'lerin en büyük avantajı, pH, yoğunluk, kırılma indisi, viskozite, yüzey gerilimi, oktanol-su bölümü okyanus verimliliği, iletkenlik, donma sıcaklığı, cam geçiş sıcaklığı, erime sıcaklığı, ayrışma sıcaklığı, karışabilirlik ve polarite, bileşenler ve oranları değiştirilerek kolayca ayarlanabilir gibi fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri nedeniyle tasarımcı solventler olarak potansiyelleridir (Zhang vd., 2012; Smith vd., 2014). Ayrıca, farklı kuaterner amonyum, fosfonyum veya sülfonyum tuzları ve çeşitli molar oranlarda HBD'ler açısından geleneksel IL'lere göre daha geniş bir DÖÇ dizisi elde edilebilir, bu da bu yeni tip tasarımcı solventleri daha da tasarlanabilir hale getirir. DÖÇ'ler, uçuculuk ve geri dönüştürülebilirlik gibi IL'lerle ortak bazı faydalı özelliklere sahiptir (Abbott vd., 2003). DÖÇ'lerin başlangıç malzemeleri, oluşumları sırasında herhangi bir kimyasal reaksiyon meydana gelmediğinden, matrislerindeki karmaşık yapıları bozarak IL'lere göre daha kolay geri kazanılabilir. Ek olarak, DÖÇ'ler aynı zamanda geleneksel IL'lere göre, insanlara ve çevreye maruz kalma riskini azaltan toksik olmama ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi çeşitli avantajlara da sahiptir. Üstelik bu yeşil solventlerin işlenmesi çoğu IL'den daha kolaydır çünkü hava ve suyla toksik maddeler oluşturmazlar (Chen vd., 2010; Shamsuri vd., 2010). Şekil 1.8 IL'lerin, DÖÇ'ün ve DDÖÇ'ün rapor edilen gelişmeleri ve özelliklerinin zaman çizelgesi gösterilmiştir (Li vd., 2023).



Şekil 1. 8: İL'lerin, DÖÇ'ün ve DDÖÇ'ün rapor edilen gelişmeleri ve özelliklerinin zaman çizelgesi (Li vd., 2023)

1.2.2. Doğal Derin Ötektik Çözücü (DDÖÇ)

“Doğal derin ötektik çözücü” terimi, DDÖÇ, Şekil 1.9’da gösterildiği gibi alkoller, amino asitler, organik asitler ve şekerler gibi hücrel metabolitlerin oluşturduğu karışımları temsil etmek üzere önerilmiştir (Kalhor ve Ghandi, 2019). DDÖÇ, yalnızca olumlu fizikokimyasal nitelikleri (örn. geniş sıcaklık aralığında sıvı hal, önemsiz uçuculuk, kimyasal ve termal stabilite, alev almazlık, bileşenleri oluşturan bileşenlerin toksik olmaması) nedeniyle değil, aynı zamanda sürdürülebilir ‘yeşil’ özellikleri nedeniyle de bilim camiasının büyük ilgisini çekmektedir. DDÖÇ bileşenleri doğada bol miktarda bulunur, kolayca elde edilebilir ve biyolojik olarak yenilenebilir ve DDÖÇ’ler genellikle gıdalarda doğal olarak bulunan toksik olmayan maddelerden oluştuğundan, ek saflaştırma adımları olmadan doğrudan gıda formülasyonlarına dahil edilebilirler, bu da geleneksel solventlere göre daha avantajlı kılmaktadır (Savi vd., 2019). Ayrıca DDÖÇ’in bu özelliklerinden dolayı yeşil kimyanın 12 ilkesini karşılamaktadır (Anastas ve Eghbali, 2010).



Şekil 1. 9: Doğal derin ötektik çözücü sentezi için kullanılan doğal bileşenler (Li, 2022)

DDÖÇ'in ekstraksiyon verimlerinin, geleneksel organik çözücülerle elde edilenlerden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ekstraksiyon kabiliyetlerinin yanı sıra, doğal bileşiklerin (fenolik bileşikler, b-karoten ve-tokoferol gibi) ekstraksiyon ve depolama sırasında artan stabilitesi, DDÖÇ kullanmanın geleneksel solventlere göre bir başka avantajıdır. Ayrıca DDÖÇ'in protein (örn. lizozim, amilaz, fotosentetik enzimler) ve DNA stabilizasyonu için çözücüler olarak da önerilmiştir. Sonuç olarak, zayıf çözünen biyoaktif bileşikler için ilaç dağıtım sistemleri olarak potansiyel uygulamalarına ilişkin çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu nedenle, son yıllarda karbondioksit yakalama solventleri, biyodizel üretimi ve lignoselülozun işlenmesi için solventler, elektrolit olarak, biyokatalizde ve fenoliklerin elektrokimyasal tespitinde, biyobozunur reaksiyon olarak. seçici yağ giderme ve toprak yıkama maddeleri için süper emici ortam olarak kimyasal proseslerde ve uygulamalarda geleneksel uçucu organik solventlere alternatif olarak önerilmiştir (Mişan vd., 2020).

1.3. Biyolojik Aktivite Tayin Yöntemleri

Biyolojik aktivite yöntemleri, doğal ürünlerin veya sentezlenen bileşiklerin çeşitli biyolojik sistemler üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılan analitik testlerdir. Bu yöntemler, maddelerin antioksidan, antimikrobiyal ve enzim inhibisyonu gibi biyolojik özelliklerini ölçmek amacıyla yaygın olarak kullanılır.

1.3.1. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan kelimesi, sağlık alanındaki faydalarıyla popülerlik kazanarak modern toplumda giderek daha fazla dikkat çekmektedir. Geleneksel bir tanım olarak, oksidasyona karşı gelen veya oksijen veya peroksitler tarafından teşvik edilen reaksiyonları inhibe eden bir maddedir, bu maddelerden birçoğu yağlar, gıda ürünleri ve sabunlarda ekşime gelişimini, benzin ve diğer petrol ürünlerinde zamk oluşumunu, ve diğer istenmeyen değışiklikleri geciktirme ve kauçukta yaşlanmayı geciktirmek gibi çeşitli ürünlerde koruyucu olarak kullanılmaktadır (Huang vd., 2005). Daha biyolojik olarak uygun bir antioksidan tanımı, ürünlerin hava içindeki oksijenin etkisiyle bozulmasını önlemek veya geciktirmek için ürünlere eklenen sentetik veya doğal maddelerdir (Gupta, 2015).

Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir elementtir. Hücreler enerji üretmek için oksijeni kullandığında, mitokondriler tarafından serbest radikaller üretilir. Bu yan ürünler genellikle hücresel redoks sürecinden kaynaklanan reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) içerir. ROS, hem oksijen radikallerini hem de oksidatif ajanları veya kolayca radikallere dönüşebilen belirli radikalleri içerir. ROS tarafından indüklenen oksidasyon, hücre membranının parçalanmasına, membran protein hasarına ve DNA mutasyonlarına neden olur, bu da yaşlanmayı tetikler ve arteriyoskleroz, kanser, diyabet, karaciğer hasarı, iltihap, cilt hasarı, koroner kalp hastalıkları ve artrit gibi birçok hastalığın gelişimini başlatır veya yaygınlaştırır (Khemani vd., 2012).

Antioksidanın işleyiş mekanizmaları arasında şunlar bulunur:

- ROS oluşumunu veya ROS'un önemli biyolojik bölgelere erişimini engelleyen fiziksel bariyerler olarak hizmet etmek, örneğin UV filtreleri, hücre zarları;
- ROS'u soğuran, enerjiyi ve elektronları "emen" kimyasal tuzaklar/sıralar olarak hizmet etmek, örneğin karotenoidler, antosiyanidinler;
- ROS'u nötralize eden veya yönlendiren katalitik sistemler olarak hizmet etmek, örneğin antioksidan enzimler SOD (süperoksit dismutaz), katalaz ve glutatyon peroksidaz,

- ROS oluşumunu önlemek için metal iyonlarını bağlama/inaktive etme, örneğin ferritin, seruloplazmin, kateşinler,
- ROS'ları temizleyen ve yok eden zincir-koparma antioksidanlar olarak hizmet etmek, örneğin askorbik asit (C vitamini), tokoferoller (E vitamini), ürik asit, glutatyon, flavonoidler (Rice-Evans vd., 1997; Chaudière ve Ferrari-Iliou, 1999; Benzie, 2000).

Antioksidanlar genellikle iki türlü sınıflandırılır: sentetik antioksidanlar ve doğal antioksidanlar. Sentetik antioksidanlar, doğada bulunmadığından kimyasal olarak sentezlenen bileşiklerdir ve lipid oksidasyonunu önlemeye yardımcı olmak için gıdalara koruyucu olarak eklenirler (Atta vd., 2017). Piyasada bulunan ve şu anda en yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidanlar butilhidroksianisol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT) ve tert-butil hidrokinon (TBHQ) dur (Gupta, 2015). Sentetik antioksidanlar ucuz, stabil ve etkilidir. Ancak, sentetik antioksidanlar toksiktir, kanserojendir, biyolojik olarak parçalanamaz ve çevresel sorunlar yaratır. Doğal antioksidanlar, sentetik kökenlerine kıyasla daha güvenli ve daha sağlıklı olarak kabul edilir. Doğal antioksidanlar sebzeler, meyveler, baharatlar, otlar, kuruyemişler, yağlı tohumlar, tahıllar, baklagiller, hayvanlar ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilebilir (Saibaba, 2023).

Doğal antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan olarak iki türe ayrılabilir:

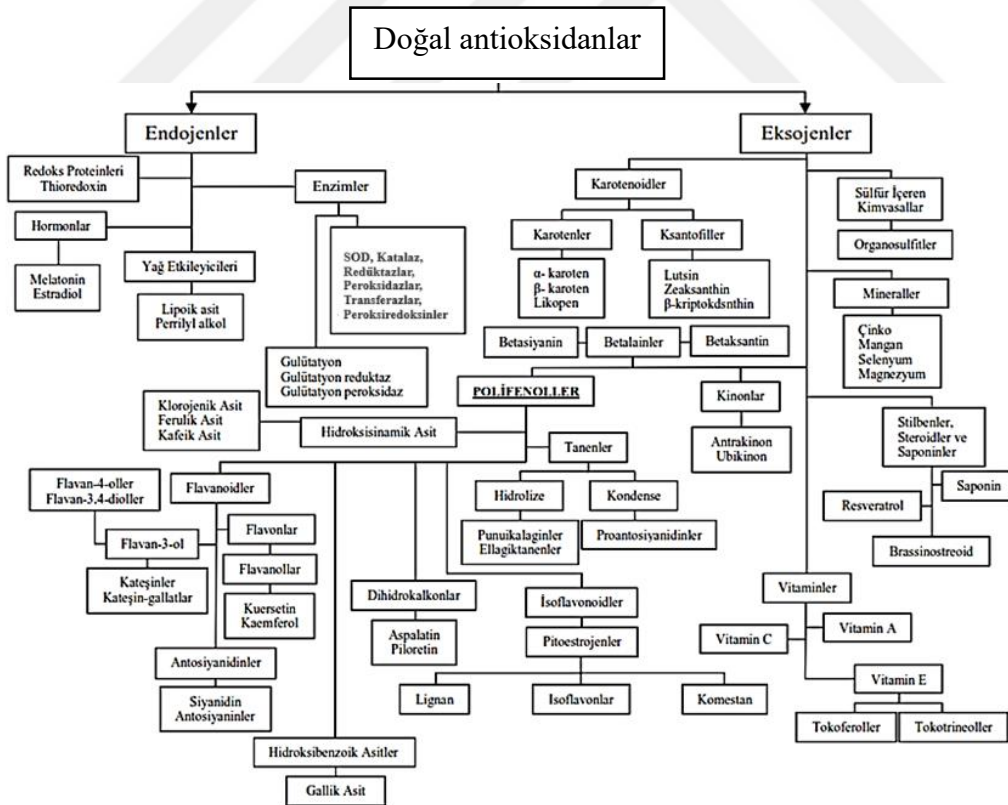
Enzimatik antioksidanlar serbest radikalleri parçalayıp ortadan kaldırarak çalışırlar. Genel olarak bu antioksidan enzimler, tehlikeli oksidatif ürünleri, bir dizi iz metal kofaktör (bakır, çinko, manganez ve demir) gerektiren çok adımlı bir işlemle önce hidrojen peroksit, ardından suya dönüştürerek temizler. Bu enzimatik antioksidanlar ağızdan alınamaz ancak vücudumuzda üretilmeleri gerekir.

Enzimatik olmayan antioksidanlar, serbest radikal zincir reaksiyonlarını keserek çalışırlar. Örneğin, E vitamini, sadece beş reaksiyon sonrasında bir serbest radikal etkinliği zincirini keserek çalışabilir. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında C vitamini, E vitamini, bitki polifenoller, karotenoidler, Se ve glutatyon (GSH) bulunur. Glutatyon (cistein içeren doğal bir antioksidan), her vücut hücresinde bulunur ve diğer tüm antioksidanların etkinliğini maksimize eder (Gupta, 2015).

Antioksidanların başka bir sınıflandırması, su içinde çözünebilen (hidrofilik) veya lipitlerde çözünebilen (hidrofobik) olup olmadığına dayanmaktadır. Hücrelerimizin iç kısımları ve aralarındaki sıvı çoğunlukla sudan oluşur, ancak hücre zarları büyük ölçüde lipitlerden yapılmıştır (Chew vd., 2011).

Lipitte çözünebilen antioksidanlar (örneğin E ve A vitaminleri, karotenoidler ve lipoik asit gibi) öncelikle hücre zarlarında bulunurken, suda çözünebilen antioksidanlar (örneğin C vitamini, polifenoller ve GSH gibi) kana ve hücrelerin içinde ve etrafındaki sıvılarda (sitoplazma matrisi olarak da bilinen çitosol) bulunur. Serbest radikaller su içeren hücre içeriğine veya yağlı hücre zarına saldırabilir, bu nedenle hücrenin her ikisi için de savunmaya ihtiyacı vardır. Lipitte çözünebilen antioksidanlar, hücre zarlarını lipid peroksidasyondan (LPO) koruyanlardır (Dontha, 2016).

Antioksidan terimi ayrıca, endojen ve eksojen antioksidanlar olarak ikiye ayrılan çok çeşitli maddeleri kapsar (Şekil 1.10) (Wootton-Beard ve Ryan, 2011).



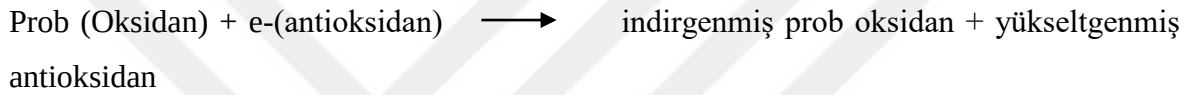
Şekil 1. 10: Doğal antioksidanların sınıflandırılması (Wootton-Beard ve Ryan, 2011)

Antioksidan bileşikler ile serbest radikaller arasındaki kimyasal reaksiyona dayalı olarak, antioksidan kapasite testleri geniş bir şekilde iki türe ayrılır:

- Elektron transferi (ET) reaksiyonuna dayalı testler
- Hidrojen atomu transferi (HAT) reaksiyonuna dayalı testler

1.3.1.1. Elektron transferi (ET) reaksiyonuna dayalı testler

Bu yöntemler, reaksiyon karışımında antioksidanlar ve oksidan (ayrıca prob) olmak üzere iki bileşeni içerir. Bu yöntemler aşağıdaki elektron transferi reaksiyonuna dayanmaktadır:



Prob kendisi bir oksidan olup antioksidandan bir elektron çalarak probun renginde değişikliklere neden olur. Renk değişikliğinin derecesi antioksidan konsantrasyonlarıyla orantılıdır. Renk değişikliği durduğunda reaksiyonun son noktasına ulaşılır. Absorbans değişimi (ΔA), antioksidan konsantrasyonuna karşı çizilerek lineer bir eğri elde edilir. Eğrinin eğimi, antioksidanın indirgeyici kapasitesini yansıtır ve genellikle Trolox eşdeğeri (TE) veya galik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilir. Korelasyon yapmak için, antioksidan kapasitesinin indirgeme kapasitesine eşit olduğu varsayılır (Huang vd., 2005).

1.3.1.2. Hidrojen atomu transferi (HAT) reaksiyonuna dayalı testler

HAT mekanizmasına dayalı yöntemler, genellikle rekabetçi reaksiyon kinetiğine uygun olarak çalışır ve kinetik eğrilerden elde edilen nicel analize dayanır. Genellikle, bu yöntemler sentetik bir radikal üreticisi, redoks-aktif bir moleküler prob ve bir antioksidan bileşiği içerir. ORAC ve TRAP gibi HAT tabanlı yöntemlerde, radikal bir başlatıcı peroksil radikalleri ($\text{ROO}\bullet$) üretmek için kullanılır. Eklenen antioksidan, ortamdaki substrat molekülleriyle rekabet eder. $\text{ROO}\bullet$ tercihen antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuç olarak, $\text{ROO}\bullet$ ve hedef molekül arasındaki reaksiyon yavaşlar veya engellenir (Büyüktünel, 2013).



Literatürde birçok yöntem geliştirilmiş ve test edilmiştir, ancak bu yöntemlerin avantajları ve sınırlamaları hala tartışılmaktadır. Toplam antioksidan kapasitesini iddia etmek için en uygun yöntemi bir standart yöntem olarak sonuçlandırmak için bir uzlaşma olmadığı görülmektedir. Örneğin, hidrofilik antioksidanların belirlenmesinin sınırlamaları, tepki son noktasının belirlenmesinde ortaya çıkan problemler, başlatıcıların veya problemlerin ışığa duyarlılığına ilişkin endişeler, fizyolojik anlamsız pH'de analiz yapma, belirli gıda bileşenlerinden olası girişim, sonuçları ifade etmek için farklı standartların kullanılması karşılaştırmada zorluklara neden olur. Tablo 1.5-1.6, en yaygın olarak kullanılan in vitro antioksidan kapasite testlerinin prensipleri, bunların avantaj ve dezavantajları özetlenmiştir.

Tablo 1. 5: Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT)

Yöntem	Radikal Üreticisi/ Kromofor Ölçümün Dalga Boyu	Avantajları	Dezavantajları
ORAC (Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi)	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH)/β-fikoeritrin (B-PE) Floresein (FL) λuyarma= 485 nm λemiyon= 538 nm	• hidrofilik ve hidrofobik örneklerin kapasitesini belirlemek için uygundur	• Sıcaklığa ve ışığa karşı hassastır • analiz süresi uzundur • Polifenollerin, B-PE'ye nonspesifik olarak bağlanmaktadır
TRAP (Toplam Radikal Tutucu Antioksidan Parametre) Yöntemi	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH)/R-fikoeritrini (R-PE) Luminol λuyarma= 495 nm λemiyon= 575 nm	• Serum veya plazma gibi biyolojik materyaller için de uygundur	• plazmanın yüksek oranda seyreltilmesinden dolayı yağ asitleri arasındaki reaksiyonun ilerlemesini zorlaştırır • analiz süresi uzundur
Karotenoid (Krosin) ağartma yöntemi	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH)/Krosin 443 nm	• Doğrudan ve hızlı analiz yapılır • Doğal ve biyolojik olarak uyumludur- krosin doğal bir bileşiktir	• Krosin ticari olarak bulunmamaktadır, safrandan elde edilmektedir • Tekrarlanabilirlik ve konsistans konusunda zorluklar bulunmaktadır
Toplam Oksiradikal Söndürme Kapasite (TOSC) Yöntemi	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH)/α-keto-γ-(methilthio) butirik asit sodyum tuzu (KMBA) Gaz kromatografisi (GC)	• hidroksil radikallerine, peroksil radikallerine ve peroksinitrite karşı antioksidan kapasitenin ölçülmesine izin verir	• GC enjeksiyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır ve test çözeltileri kısa ömürlüdür • analiz süresi uzundur
Fikoeritrin (FE) Esaslı Yöntemler	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH), Bakır (II)-askorbat/Fikoeritrin 500-550 nm		• Plazma veya serum olduğu zaman gecikme zamanını belirlemek genellikle zordur

Tablo 1. 6: Tek elektron transferi reaksiyonlarına dayananlar (ET)

Yöntem	Radikal Üreticisi/ Kromofor Ölçümün Dalga Boyu	Avantajları	Dezavantajları
Folin-Ciocalteu yöntemi (FC)	Mo6+(sarı) Mo5+(mavi) 765 nm	- güvenilir, basit ve tekrarlanabilir - FC testi ile diğer ET bazlı testler (örneğin TEAC ve DPPH•) arasında mükemmel doğrusal korelasyonlar belirlenmiştir	- FCR reaktifi fenolik bileşiklere spesifik değildir çünkü birçok fenolik olmayan bileşik tarafından da indirgenebilir - Zaman alıcıdır (2 saat), rutin analiz için uygulanmasını zorlaştırır - Sulu fazda gerçekleştirildiğinden lipofilik bileşikler/matrisler için uygulanamaz
Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP)	Fe ³⁺ Fe ²⁺ 595 nm	- Basit, hızlı ve ucuzdur - Özel bir ekipman gerektirmez - Reaksiyon spesifik değildir, Hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini için uygundur	- glutasyon gibi tiyol antioksidanlar ölçülemezler - sonuçlar analiz süresine bağlı olarak değişebilir
Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi (TEAC)	ABTS.+ 734 nm	- basit, tekrarlanabilir - hem hidrofilik hem de lipofilik örneklerin kapasitesini belirlemek için uygundur - Geniş pH aralığında kullanılabilir - gıda ekstraktifleri ve fizyolojik sıvılar da kullanılabilir	reaksiyon süresinin uzundur
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi	DPPH. 517 nm	- Basit ve hızlıdır - Sonuçlar güvenilir ve tekrarlanabilir - Yalnızca UV-Görünür spektrofotometresi gerektirir - DPPH-radikal ticari olarak mevcuttur; insitu üretime gerek yoktur	- Işığa, oksijene ve kirliliğe hassastır - yalnızca organik ortamda çözülebilir, sulu ortamda çözünmez - radikal peroksit ile hızlı bir şekilde reaksiyon gösteren birçok antioksidanın DPPH'ye karşı inerttir
Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC)	Cu ²⁺ Cu ⁺ 450 nm	- basit, hızlı, ucuz, sağlam, özel ekipman gerektirmez - tiyoller dahil tüm antioksidan sınıfları tespit edilir - hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilir	- kesin tepki süresi yok - farklı numuneler için reaktivite büyük ölçüde değişmektedir

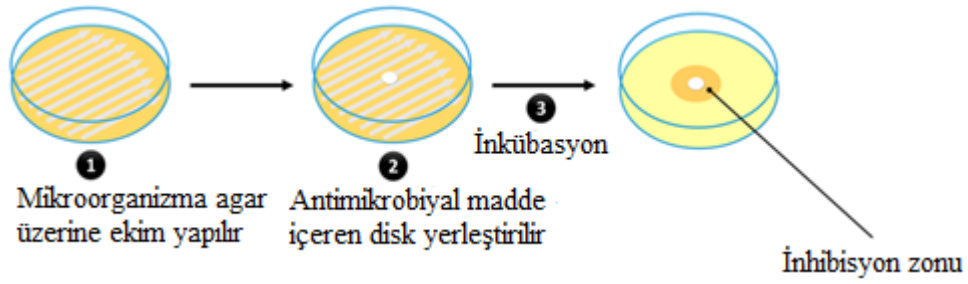
1.3.2. Antibakteriyel Test Yöntemleri

Bulaşıcı hastalıkların tedavisi zorlaştıkça, antimikrobiyal direnç ciddi bir küresel sorun haline gelmektedir (Ali, vd., 2021). Çoklu dirençli bakteriler artmakta ve yeni antimikrobiyallerin gelişimi sınırlı olması bu da durumu daha da zorlaştırmaktadır. Bu konuyu ele almak için araştırmacılar hem doğal hem de sentetik antimikrobiyal bileşiklerini potansiyel çözümler olarak araştırmaktadırlar (Lima vd., 2021). Bitkilerden, hayvanlardan

ve mikroorganizmalardan elde edilen doğal ürünler, enfeksiyonlarla mücadelede umut vaat eden biyolojik olarak aktif bileşikler açısından zengin bir kaynak sunar. Ek olarak, laboratuvarlarda tasarlanan sentetik antimikrobiyal bileşikler de mikrobiyal enfeksiyonlarla mücadelede dikkate değer bir potansiyel göstermiştir. Bu bileşiklerin potansiyelini ortaya çıkarmak için uygun antimikrobiyal tarama ve değerlendirme yöntemleri gereklidir. İn vitro yöntemler, yeni antimikrobiyal ajanların keşfedilmesinde ve geliştirilmesinde önemli bir rol oynamakta ve bunların etkinlikleri ve etki mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Doğal ve sentetik bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesini karakterize etmek için kullanılan en yaygın in vitro yöntemler arasında disk difüzyon yöntemi, agar kuyucuk difüzyon yöntemi, antimikrobiyal gradyan yöntemi (Etest), zamana bağlı öldürme testi, agar ve sıvı besiyeri seyreltme yöntemi bulunmaktadır (Hossain, 2024).

1.3.2.1. Disk difüzyon yöntemi

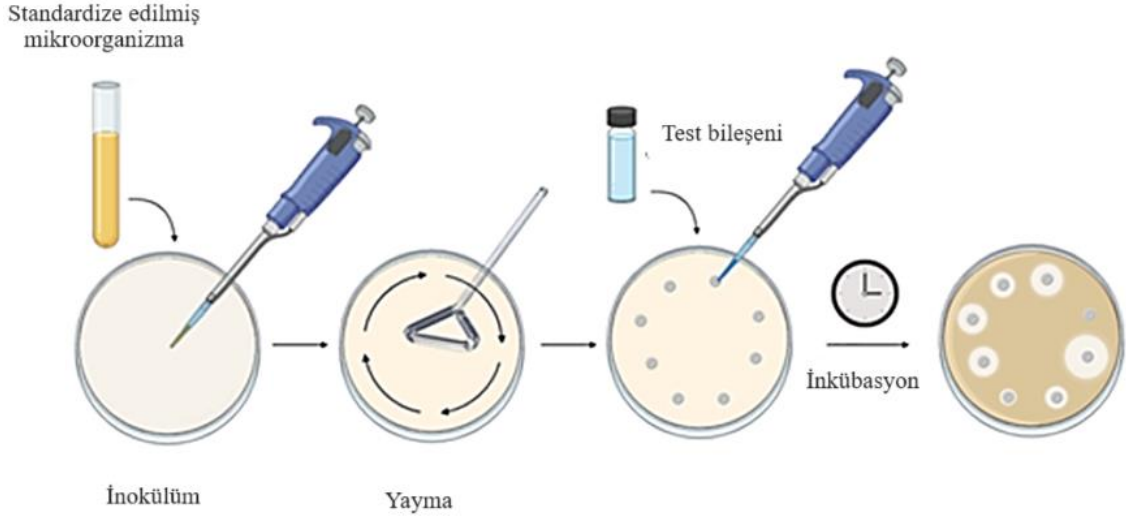
Disk difüzyon yöntemi, çok sayıda antimikrobiyalın nispeten kolay ve esnek bir şekilde eş zamanlı test edilmesine olanak tanır. Bu yöntemde, bakteriyel inokülüm belirli bir konsantrasyona ayarlanarak, Mueller-Hinton agar (MHA) plakasının tüm yüzeyine steril pamuk uçlu bir çubukla eşit bir şekilde inoküle edilir. Seyreltilmiş antibiyotik solüsyonu emdirilmiş kağıt diskler, steril bir forseps çifti kullanılarak her MHA plakasının yüzeyine yerleştirildi. Daha sonra plakalar aerobik olarak inkübe edilir ve zon inhibisyonunun çapı bir cetvel veya kumpas ile ölçülür (Şekil 1.11). İnhibisyon bölgesinin çapına ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) yorumlama kriterlerine bağlı olarak sonuçlar daha sonra duyarlı, orta veya dirençli olmak üzere üç kategoriye atanır. İnhibisyon bölgesinin çapı ne kadar büyük olursa, mikroorganizma antimikrobiyale karşı o kadar duyarlı olur. Bu yöntemin en büyük dezavantajları MİK değerinin oluşturulamaması (yani niceliksel olmaması) ve zor üreyen ve yavaş büyüyen bakterilerin duyarlılığının incelenmesinin zor olmasıdır (Wilkins ve Thiel, 1973; Dickert vd., 1981; Balouiri vd., 2016). Ayrıca, klinik ortamlarda kullanılan antimikrobiyal ajanlardan farklı olarak, doğal antimikrobiyal duyarlılık testini destekleyecek disk difüzyon sonuçlarına ilişkin standart CLSI yorumlayıcı kriterleri mevcut değildir; bu nedenle doğal antimikrobiyaller için disk difüzyonunun oluşturduğu zon çapını açıklayamamaktadır. Ayrıca diğer agar bazlı yöntemlere benzer şekilde disk difüzyonu da emek ve zaman alıcıdır (Klančnik vd., 2010).



Şekil 1. 11: Disk difüzyon metodu (Hossain, 2024)

1.3.2.2. Agar Kuyucuk Difüzyon Metodu

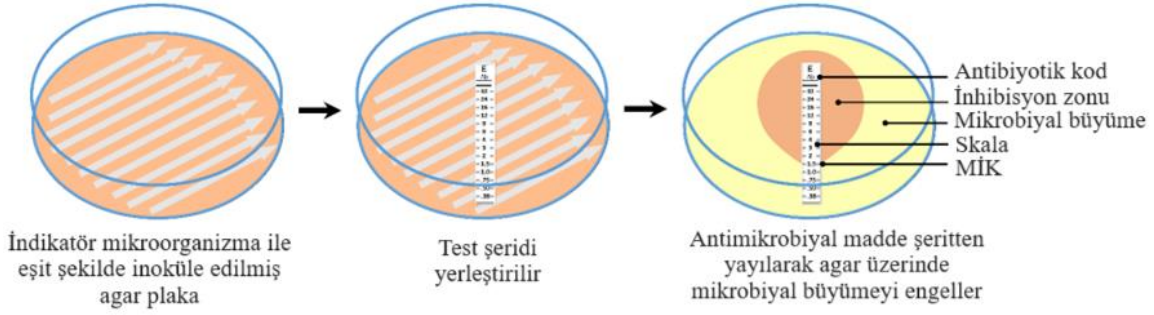
Agar kuyucuk difüzyon metodu, bitkisel veya mikrobiyal ekstraktların, kimyasal bileşiklerin ve antibiyotiklerin antimikrobiyal aktivitesini test etmek için yaygın olarak kullanılır. Disk difüzyon yöntemine benzer şekilde, test edilecek mikroorganizma, homojen bir şekilde agar plak yüzeyine yayılır. Bu, steril bir pamuklu çubuk veya yayma yöntemi ile yapılır. Steril bir mantar matkabı veya pipet ucu kullanılarak agar plak yüzeyinde 6-8 mm çapında kuyucuklar açılır. azırlanan kuyucuklara, belirli konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajan veya ekstrakt çözeltisinin 20-100 μ L'lik bir hacmi eklenir. Hazırlanan plaklar, test edilen mikroorganizmaya bağlı olarak uygun sıcaklık ve süre boyunca inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda, kuyucukların etrafındaki inhibisyon zonları (bakteri üremesinin olmadığı alan) ölçülür. Zon çapları milimetre cinsinden ölçülerek antimikrobiyal etkinlik değerlendirilir. Yöntem basit ve laboratuvar ortamında kolayca uygulanabilir. İnhibisyon zonları görsel olarak kolayca tespit edilebilir. Aynı plak üzerinde birden fazla ajanın test edilmesine olanak tanır. Çeşitli avantajların yanı sıra, bazı sınırlamalar da vardır; bu yöntem genellikle kantitatif bilgi vermez, sadece zon çaplarına dayanır. Ayrıca antimikrobiyal ajanların agar içerisindeki difüzyon yeteneği sonuçları etkileyebilir (Perez vd., 1990; Magaldi vd., 2004). Şekil 1. 12'de agar disk difüzyon yönteminin şematik olarak gösterilmiştir (Correa vd., 2020).



Şekil 1. 12: Agar disk difüzyon yönteminin şematik gösterimi (Correa vd., 2020)

1.3.2.3. Antimikrobiyal Gradyan Yöntemi (Etest)

E-test, antimikrobiyal duyarlılığı belirlemek için kullanılan bir in vitro yöntemdir. Bu yöntem, hem kalitatif hem de kantitatif bilgi sağlar ve antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) belirlemede kullanılır. E-test, bir uçtan diğer uca değişen bir antibiyotik gradyanı içeren plastik bir şerit kullanır. Bu şerit, inoküle edilmiş agar plakları üzerine yerleştirilir ve antibiyotik, agar içine difüze olarak bir inhibisyon zonu oluşturur. İnhibisyon zonunun en dar noktasında antibiyotik konsantrasyonu şerit üzerindeki skala ile eşleşir ve MİK belirlenir (Şekil 1.13) (Hossain, 2024). E-test, özellikle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılır. Kullanımı kolay ve pratik bir yöntemdir. MİK değeri doğrudan okunabilir. Disk difüzyon yöntemine göre daha hassastır ve daha kesin MİK değerleri sağlar. E-test şeritleri diğer yöntemlere göre daha pahalı olması, şeritlerin yerleştirilmesi ve sonuçların okunmasında manuel hatalar oluşturmabilmesi gibi dezavantajlara sahiptir (Brown ve Brown, 1991; Doddangoudar vd., 2010).



Şekil 1. 13: E testi inhibisyon bölgesinin şematik gösterimi (Hossain, 2024)

1.3.2.4. Zamana bağlı öldürme testi

Zamana bağlı öldürme testi, testin amacına bağlı olarak farklı konfigürasyonlara sahip olabilir. Bu yöntemde mikroorganizmalar antimikrobiyal bileşiğin varlığında farklı inkübasyon sürelerinde (0, 2, 4, 8, 10, 12 ve 24 saat) inkübe edilir. Antimikrobiyal madde içermeyen bir kontrol örneğine göre hayatta kalan bakterilerin yüzdesi belirlenir. Antimikrobiyal ajanın kinetiğini görselleştirmek ve belirlenmiş belirli kriterler altında bakterisidal veya bakteriyostatik etki gösterip göstermediğini belirlemek için toplanan verilerle bir öldürme eğrisi belirlenebilir (Pfaller vd., 2004). Ayrıca bu yöntem, kombinasyon halindeki ilaçlar (iki veya daha fazla) arasındaki sinerji veya antagonizmayı belirlemek için de kullanılabilir (White vd., 1996).

1.3.2.5. Agar seyreltme ve sıvı besiyeri seyreltme yöntemleri

Agar seyreltme ve sıvı besiyeri seyreltme yöntemleri, antimikrobiyal maddelerin minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) belirlemek için kullanılan oldukça benzer iki tekniktir. MİK, belirli bir bakterinin görünür büyümesini engelleyen bir antimikrobiyal maddenin en düşük konsantrasyonudur. Agar seyreltme ve sıvı besiyeri seyreltme yöntemleri arasındaki temel fark, kullanılan ortamda yatmaktadır: agar seyreltmesinde agar plakaları kullanılırken sıvı besiyeri seyreltmesinde sıvı besiyeri tüpleri veya mikropaklar kullanılır. Her iki yöntem de ortama antimikrobiyal maddenin farklı konsantrasyonlarının dahil edilmesini ve ardından ortama standart sayıda mikrobiyal hücrenin uygulanmasını içerir. MİK, mikroorganizmanın büyümesinin veya büyümesinin yokluğunun gözlemlenmesiyle belirlenir. Agar seyreltme ve sıvı besiyeri seyreltme yöntemlerinin her ikisi de, uygun antimikrobiyal muamelenin seçimine rehberlik etmek ve zaman içinde antimikrobiyal duyarlılıktaki değişiklikleri

izlemek açısından önemlidir (Hossain, 2024).

1.3.3. Alzheimer Hastalığı ve Antikolinesterazlar

Alzheimer Hastalığı, Alois Alzheimer tarafından 1907 yılında tanımlanan, beyindeki bilişsel ve nöropsikiyatrik belirtilerin bir dizi olduğu ilerleyici nörodejeneratif bir bozukluktur. Bu belirtiler, bellek, dil, görsel-uzaysal performans ve yürütme fonksiyonlarında bozuklukları içerir. Davranışsal belirtiler arasında ilgisizlik, ajitasyon, anksiyete, tahrik, düzensizlik, yanılsamalar ve halüsinasyonlar bulunmaktadır. Dünya genelinde 20 milyonu aşkın bireyi etkiler ve bu sayı gelecekte yaşlı nüfusun artışıyla birlikte önemli ölçüde artacaktır. AH'nın yaygınlığı yaşla birlikte artmakta olup, 65 yaşında %10'dan 85 yaşında neredeyse %50'ye kadar çıkmaktadır (Bachurin 2003; Colombres vd., 2004).

Alzheimer hastalığının patogenezinin henüz tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, iki temel nöropatolojik belirgin özellik tanımlanmıştır: amiloid beta (A β) peptitlerinin birikimi ve hiperfosforile nöronal tau protein içeren nörofibriller yumaklar, sonucunda Alzheimer hastalarının beyinlerinde nörotoksisiteye neden olur (Kepp, 2012). Ayrıca, Alzheimer hastalığı düşük düzeyde asetilkolin (ACh) nörotransmitterine ve kolinerjik nöron kaybına, eksitotoksisiteye, diğer nörotransmitter sistemlerinin bozulmasına, yaygın oksidatif stres, kronik nöroenflamasyon, mitokondriyal disfonksiyon, kalsiyum, metal dengesizliği gibi özelliklere sahiptir (Querfurth ve LaFerla, 2010). Bu nedenle, yıllar boyunca Alzheimer hastalığı patogenezi ile ilgili birçok hipotez ortaya konmuş ve potansiyel tedavi müdahaleleri için stratejiler bulmaya çalışılmıştır. Bu hipotezler arasında kolinerjik hipotez, amiloid hipotezi, tau yayılma hipotezi, metal iyon hipotezi, mitokondriyal kaskat hipotezi, kalsiyum homeostaz hipotezi, enflamatuvar hipotez gibi çeşitli hipotezler bulunmaktadır.

Kolinerjik hipoteze göre, özellikle öğrenme, bellek, davranış ve duygusal tepkilerle ilgili olan neokorteks ve hipokampus gibi beyin bölgelerinde kolinerjik fonksiyonlarda bozulma, alzheimer hastalığında kritik bir öneme sahiptir. Beyin atrofisi, alzheimer hastalığında en belirgin klinik bulgu olup, asetilkolin (ACh) seviyeleri (sinir hücresinden diğerine elektriksel uyarıların iletiminden sorumlu bir nörotransmitter) hızlı hidroliz nedeniyle asetilkolinesteraz (AChE) enzimi tarafından azalmıştır (Ladner ve Lee, 1998).

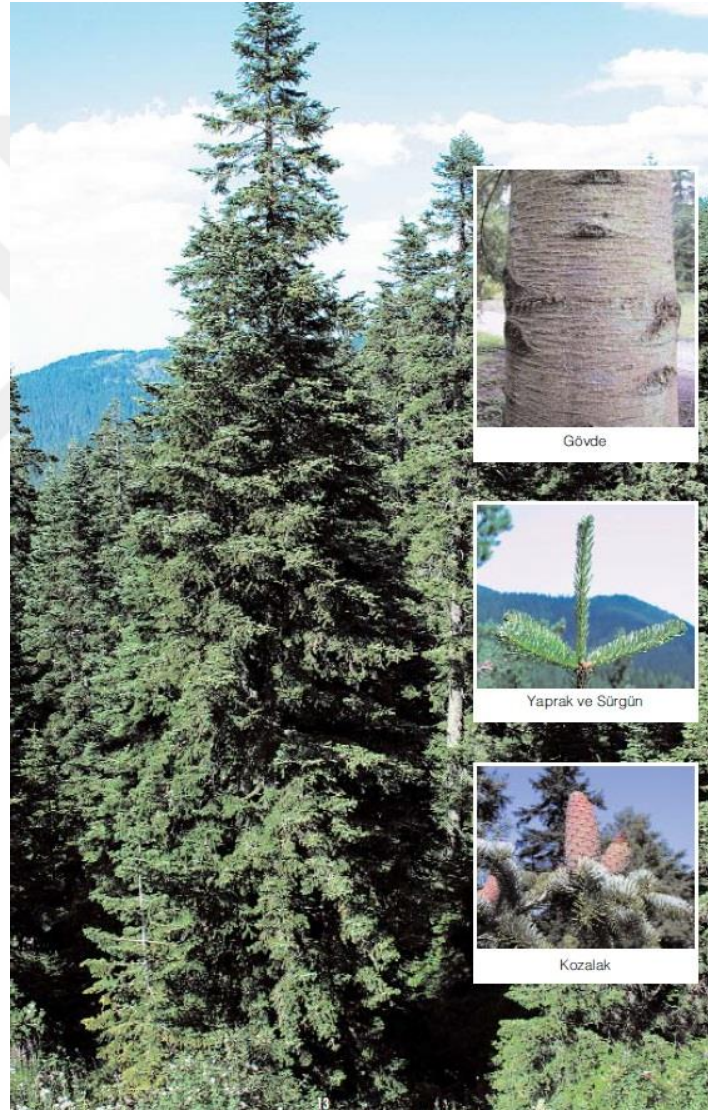
Amyloid hipotezine göre, AChE, alzheimer hastalıklı bireylerin beyinlerinde senil

plaklar/nörofibriler kümeler şeklinde amiloid beta (A β) birikimini teşvik eden sekonder non-kolinerjik fonksiyonları üretir (Castro ve Martinez 2001; Selkoe, 2002; Bartolini vd., 2003; Rees vd., 2003). Ab birikimi, alzheimer hastalığının başlangıcında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamıştır (Rees vd., 2003). Butirilkolinesteraz (BuChE), AChE'ye sıkı bir şekilde bağlı bir enzimdir ve ACh'yi hidroliz ederek kolinerjik nörotransmisyonun bir ortak düzenleyicisi olarak hizmet eder (Mesulam vd., 2002). Çalışmalar, alzheimer hastalığının gelişimi sırasında temporal korteks ve hipokampus gibi en çok etkilenen beyin bölgelerinde (%40-90) artmış BuChE aktivitesini göstermiştir. Artmış BuChE aktivitesi, senil plak oluşumunun erken aşamalarında Ab agregasyonunda önemli bir rol oynar (Geula ve Darvesh, 2004). Bu nedenle, AChE ve BuChE inhibisyonu, beyin bölgelerinde ACh'nin artışı ve A β birikiminin azalması yoluyla alzheimer hastalığının etkili yönetimi için kritik hedefler olarak belgelenmiştir (De Ferrari vd., 2001). Bununla birlikte, BuChE genellikle plazma gibi periferik dokularda lokalize olup, beyin bölgesinde çok az miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle, AChE'yi BuChE'ye göre seçici olarak inhibe etmenin potansiyel avantajı, kolineresteraz enziminin periferik inhibisyonuna bağlı daha az yan etki içerebilir (Anand ve Singh, 2012). Tacrine, donepezil, rivastigmine ve galantamine, alzheimer hastalığının yönetimi için klinik olarak kullanılan AChE inhibitörleridir. Bununla birlikte, bu ilaçların sınırlı etkinliği vardır ve alzheimer hastalığının belirtilerini belirli bir ölçüde kontrol etmede etkilidir. Bu nedenle, alzheimer hastalığının yönetimi için mevcut AChE inhibitörlerinin ana şablon bileşenlerini değiştirerek daha etkili ve yüksek etkililikte kolineresteraz inhibitörleri senteziyle ilgili sürekli bir araştırma yapılmaktadır (Anand ve Singh, 2013).

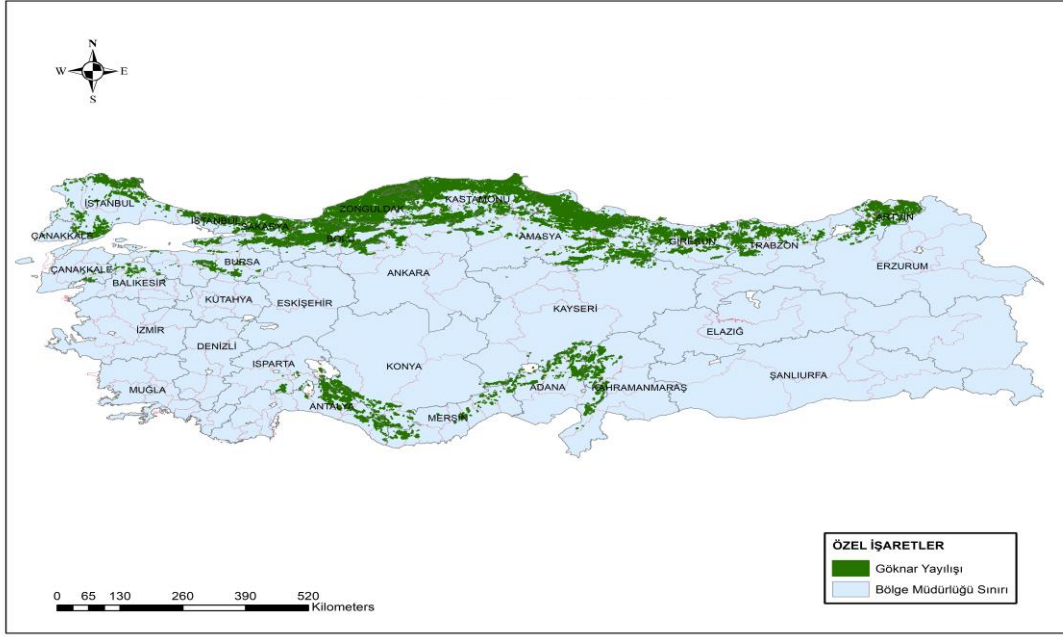
1.4. Kozalaklar

Pinacea familyası, açık tohumlu bitkiler sınıfının tür çeşitliliği ve dünya üzerinde oluşturdıkları orman alanlarının genişliği bakımından en önemli familyasıdır. Pinacea familyası çoğunlukla kuzey yarım kürenin ılıman bölgelerde yayılım gösteren 11 cinse bağlı 231 tür barındırmaktadır (Wang ve Ran, 2014). Ülkemizde Pinaceae familyası Abies (Gökmar), Cedrus (Sedir), Picea (Ladin) ve Pinus (Çam) olmak üzere 4 cins doğal yayılım göstermektedir. 2020 yılı itibarıyla yapılan tespitlere göre ülkemizde 22,9 milyon hektar ormanlık alan mevcuttur. Gökmar ormanı 515652 ha, Sedir ormanı 405424 ha, Ladin ormanı 368669 ha ve Fıstık çamı ormanı 176732 ha bulunmaktadır. 2021 yılında Fıstık çamı kozalağı 1308 ton elde edilmiştir (OGM, 2021).

Abies cinsine ait *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach. subsp. *nordmanniana* (Doğu Karadeniz göknarı) ülkemizde Yeşilırmak Vadisi ile Gürcistan sınırı arasındaki Doğu Karadeniz Bölgesinde yayılış gösterir (Anşin, 1994). Kozalak 15-20 cm, uzunlukta, 5 cm genişlikte uca doğru daralan silindir, olgun halde kırmızı-kahverengi, brahte dışarıdan görülür. Kozalağın üzeri bol reçinelidir (Yener, 2012). Döllenme haziran ortası - temmuz başı döneminde gerçekleşir. Kozalak ve tohum, aynı yıl ekim-kasım döneminde olgunlaşır (Tayanç, vd. 2013). Şekil 1.14’de *Abies nordmanniana* subsp. *nordmanniana* genel görünüşü ve Şekil 1.15’de Türkiye’deki yayılışı gösterilmiştir (OGM, 2009).



Şekil 1. 14: *Abies nordmanniana* subsp. *nordmanniana* genel görünüşü (OGM, 2009)

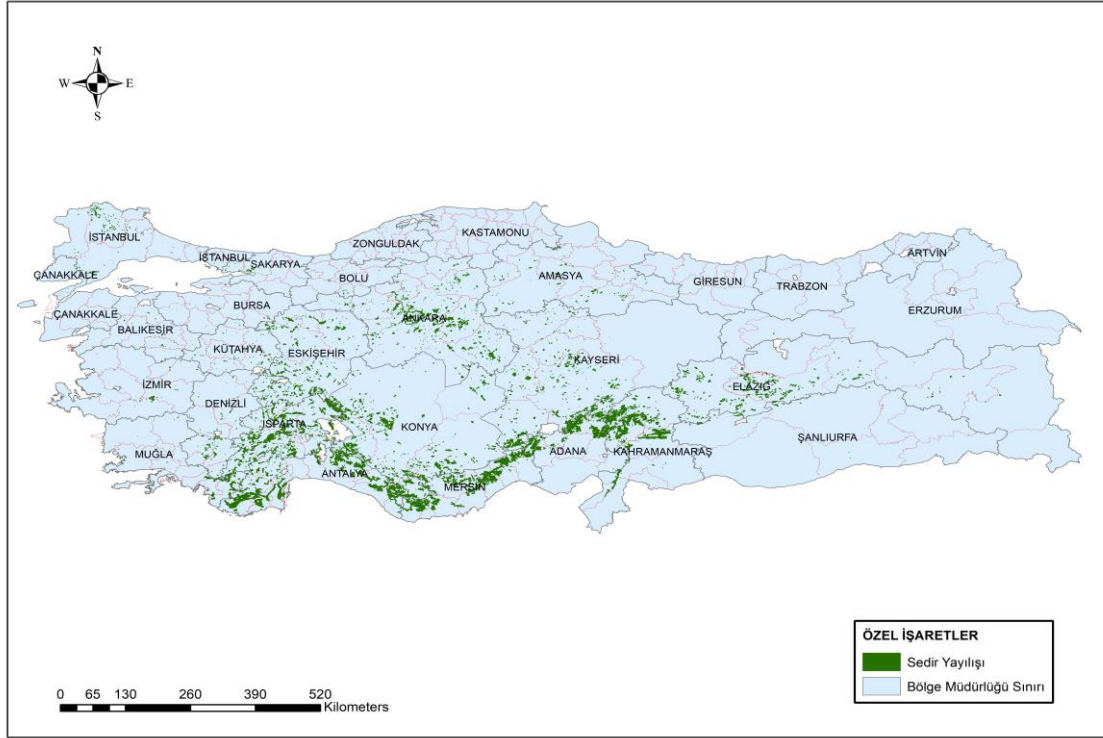


Şekil 1. 15: *Abies nordmanniana* subsp. *nordmanniana*'nın Türkiye'de yayılışı (OGM, 2009)

Cedrus libani A.Rich. (Toros sediri) Cedrus cinsinin ülkemizde doğal olarak yayılan tek türüdür. Ülkemizdeki yayılışı genel olarak batı sınırı Köyceğiz civarından başlamakta, optimal yayılışlarını Batı Toroslarda (Bucak, Çıglıkara, Katrandağı ve Susuzdağı ormanları gibi) yaparak Toroslar, Antitoroslar boyunca doğuya doğru uzanmakta, Göksun ve Kahramanmaraş yörelerinde, güneyde Amanoslara yönelmektedir (Aydın, 2016). Kozalaklar iki yılda olgunlaşır. Kozalaklar çoğunlukla fıçı ya da yumurta biçiminde, 8-20 cm boyundadır. Dallar üzerinde dik durumda, genel olarak tek tek, kimi zaman da çift olarak bulunurlar. Boz-kahverengindeki olgun kozalakların, genellikle üzeri bol reçinelidir. Tam kenarlı olan kozalak pulları, ortada hafif bir çıkıntı yapar. Dış yüzeyleri kısa pullarla örtülmüştür. Tohum dökümü karpellerin 2-3 ay içinde dağılması ile olur ve geriye dal üzerinde dik bir kozalak ekseni kalır (Keskin, 1992). Şekil 1. 16'de *Cedrus libani* genel görünüşü, Şekil 1. 17'de Türkiye'deki yayılışı gösterilmiştir (OGM, 2009).

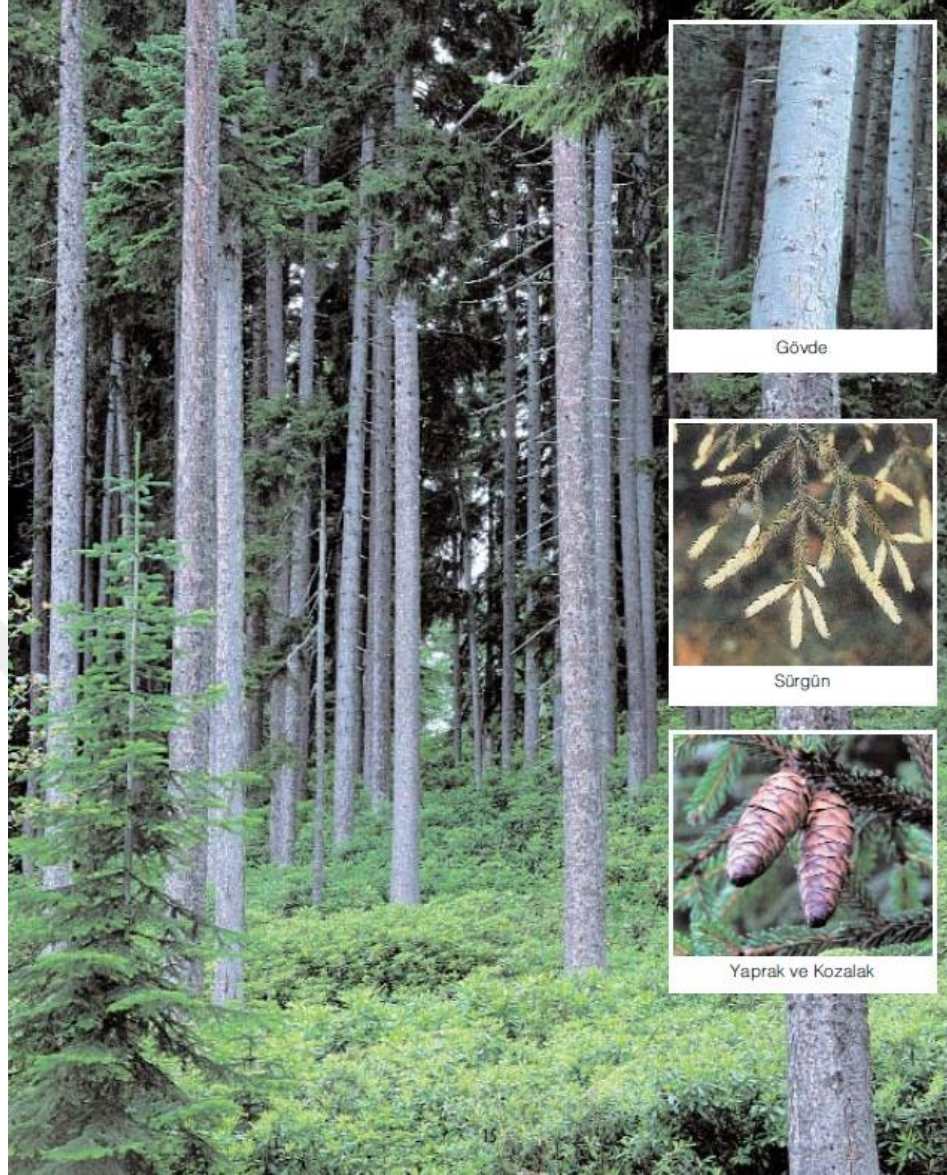


Şekil 1. 16: *Cedrus libani* genel görünüşü (OGM, 2009)

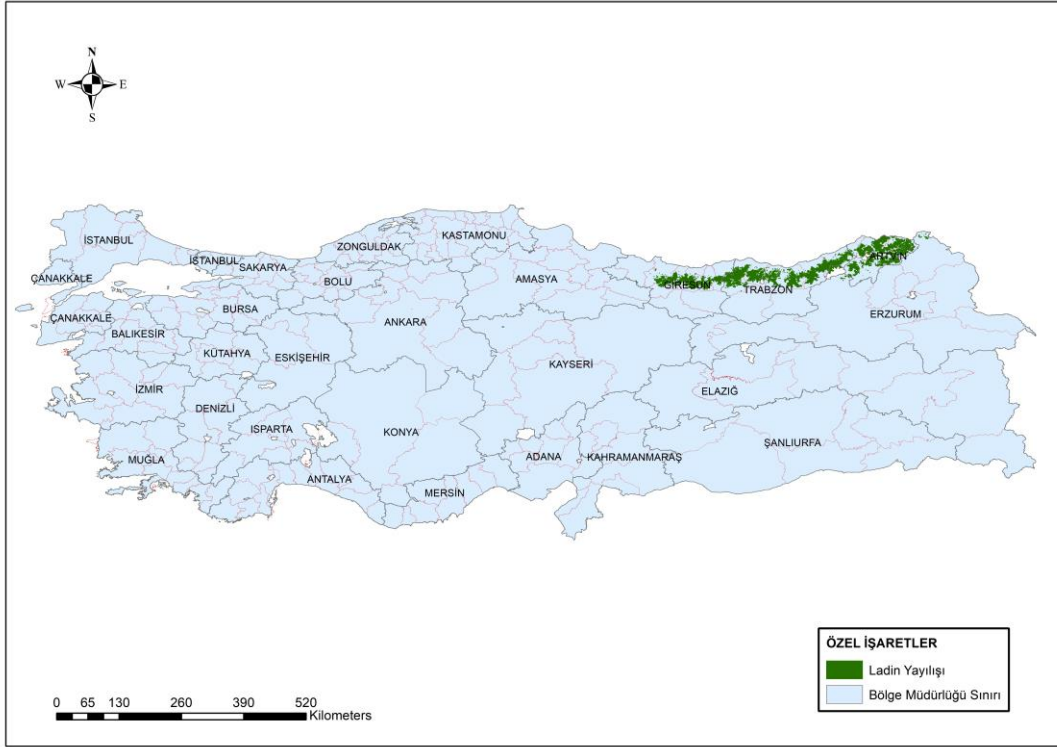


Şekil 1. 17: *Cedrus libani*'nin Türkiye'de yayılışı (OGM, 2009)

Picea cinsine ait *Picea orientalis* (L.) Link. (Doğu ladini), Ordu İlinin Doğusunda Melet Çayından başlayıp Doğu Karadeniz Dağlarının kuzey yamaçları boyunca Posof'a kadar uzanmaktadır (Konukçu, 2001). Mayıs aylarında döllenmiş dişi çiçekler gelişerek kozalakları oluştururlar ve aynı yılın sonbaharında olgunlaşırlar. Rutubetleri % 28 civarına düştüğünde karpelleri açılarak tohumlarını dökerler. Kozalak 6-9 cm uzunluğunda, ilk oluştuklarında bazı ağaçlarda yeşil, bazılarında koyu kırmızı renktedir. Olgun kozalak açık kiremit renginde, oval ya da silindirik yapıda, pulların kenarları düzdür (Yerli, 2012). Şekil 1.18'de *Picea orientalis* genel görünüşü, Şekil 1.19'da Türkiye'deki yayılışı gösterilmiştir (OGM, 2009).



Şekil 1. 18: *Picea orientalis* genel görünüşü (OGM, 2009)



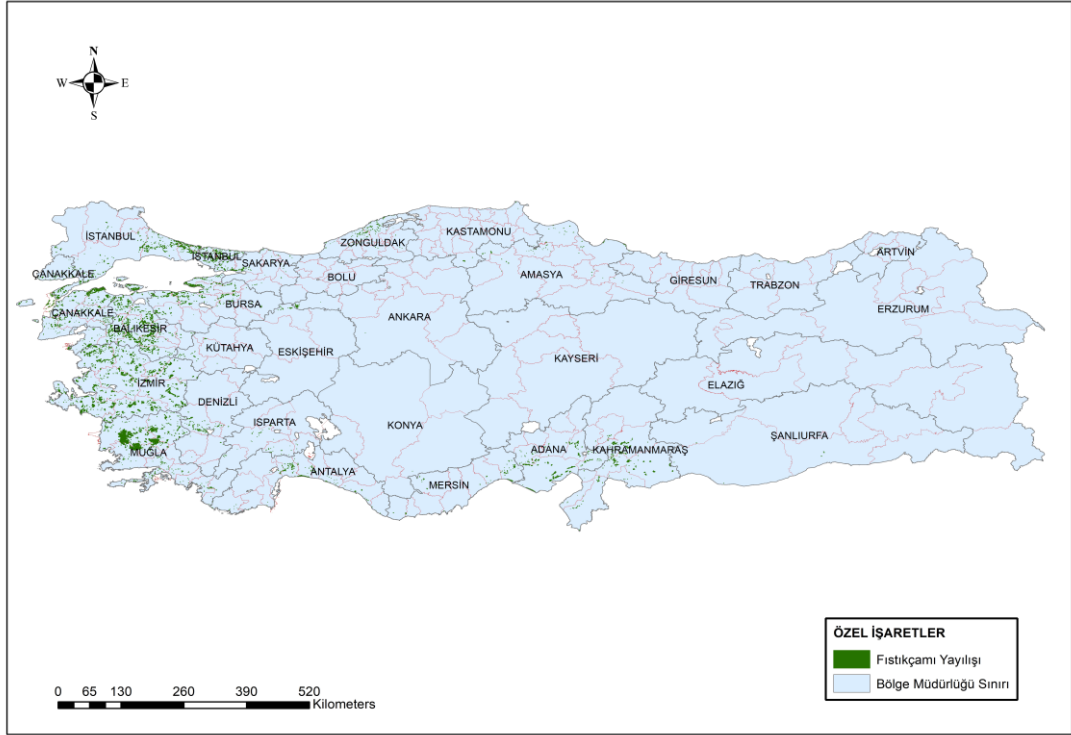
Şekil 1. 19: *Picea orientalis*'in Türkiye'de yayılışı (OGM, 2009)

Pinus cinsine ait *Pinus pinea* L. (Fıstık çamı), Batı Anadolu'da Bergama/Kozak, Aydın/Koçarlı ve Muğla dolaylarında en geniş yayılışını yapmaktadır. Ayrıca Antalya Manavgat sahillerinde, Gemlik körfezi kıyılarında, Artvin/Fıstıklı Köyü, Trabzon/Kalenema Deresi, Kahramanmaraş/Hacıağalar ve Önsan Köyü ve Bartın/Çakraz'da lokal yayılışlar göstermektedir (Güleç, 2015). Kozalaklar çok kısa saplı, sürgüne hemen hemen oturmuş gibidir. Olgunlaşmasını üç yılda tamamlamakta, rengi parlak, kırmızımsı kestane rengindedir. Oval ve simetrik bir biçimde olan kozalağın pulları parlak kahverengidir. Odunsu ve kalın olan apofizin 5-6 adet radyal pervazı bulunur. Kozalağın dip tarafında bulunan pullar 6 köşeli olup, uçlarına doğru olanlar ise eşkenar dörtgen biçimindedir. Gri beyaz renkteki göbek büyük, basık ve hemen hemen dört köşelidir (Gönültaş, 2008). Yenilenebilir bir kaynak olan kozalaklar, iğne yapraklı türlerde bitki üremesi için gereklidir. Gelişme sırasında tohumları korurlar ve olgunlaştıklarında tohum pulları yardımıyla okrealar açılır ve tohumlar geniş bir alana yayılır. Dünya çapında her yıl büyük miktarlarda çam kozalağı üretilmekte ve sınırlı bir kısmı kullanılmaktadır (Kilic vd., 2011; Gülsoy vd., 2017). Çam fıstığı adı verilen çekirdeklerin çıkarılmasından sonra kalan kozalaklar yakacak olarak veya geleneksel sanat ve el sanatları yapımında kullanılıyor. Çam fıstığı, ihracat değeri taşıması nedeniyle en önemli odun dışı orman ürünlerinden biridir. *Pinus pinea* ayrıca özel ormancılık için önemli bir odun üreten tür olarak Türkiye'nin birçok bölgesinde yaygın

olarak dikilmektedir (Gonultas ve Ucar, 2013). Şekil 1.20’da *Pinus pinea* genel görünüşü, Şekil 1.21’de Türkiye’deki yayılışı gösterilmiştir (OGM, 2009).



Şekil 1. 20: *Pinus pinea* genel görünüşü (OGM, 2009)



Şekil 1. 21: *Pinus pinea*'nın Türkiye'de yayılışı (OGM, 2009)

Abies nordmanniana subsp. nordmanniana (Doğu Karadeniz göknarı), *Cedrus libani* (Toros sediri), *Picea orientalis* (Doğu ladini), *Pinus pinea* (Fıstık çamı) kozalak ligninlerinin biyoaktivite etkinliği konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasıyla ülkemizde doğal yayılış gösteren bu türlerden;

- Orman varlığımıza zarar vermeden sadece yenilenebilir ve sürdürülebilir atık olan kozalakların değerlendirilerek katma değeri yüksek olan ligninin elde edilmesi,
- Biyobozunur, toksik olmayan ve geri kazanılabilen kimyasal olan DDÖÇ kullanılması,
- Aynı familyanın farklı cinslerine ait kozalaklardan farklı yöntemlerle lignin elde edilip birbirleriyle karşılaştırılması,
- Ligninlerin antioksidan, antibakteriyel ve antiasetilkolinesteraz aktivitelerinin belirlenerek farklı alanlarda kullanıma imkan sağlanması,

- Mikrodalga cihazı kullanarak muamele süresinin kısaltılması, kimyasalın etkinliğinin artırılması böylece zaman, enerji ve kimyasal tasarrufunun sağlanması,
- Literatüre katkı sağlayarak sonraki çalışmalara öncülük etmesi amaçlanılmıştır.



2. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde; kullanılan materyaller, tez çalışmasının deneysel bölümleri ve gerçekleştirilen analizler sunulmaktadır.

2.1. Materyal

Tez kapsamında, Doğu Karadeniz Gökmarı (*Abies nordmanniana* subsp. *nordmanniana*), Toros Sediri (*Cedrus libani*), Doğu Ladini (*Picea orientalis*), Fıstık Çamı (*Pinus pinea*) kozalakları kullanılmıştır (Şekil 2.1). Doğu Karadeniz Gökmarı Gümüşhane, Toros Sediri Adana, Doğu Ladini Trabzon, Fıstık Çamı İzmir illerinden temin edilmiştir. Deneyler öncesinde kozalakların iç kısmında yer alan tohumları çıkarılmış, sadece eksen ve pulları kullanılmıştır.



Şekil 2. 1: Doğu Karadeniz Gökmar kozalağı (a), Toros Sediri kozalağı (b), Doğu Ladini kozalağı (c), Fıstık Çamı kozalağı (d)

Çalışmada Aromel 67481 marka Kolin klorür (ChCl), Merck 100366 Laktik Asit, ISOLAB 128370 marka Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) , Sigma-Aldrich 258105 marka sülfürik

asit (H_2SO_4), Sigma-Aldrich D9132 marka 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), Sigma-Aldrich D8418 marka dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma-Aldrich 370959 marka kraft lignin, Sigma-Aldrich D8130 marka 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), asetilkolinesteraz (AChE), asetiltiyokolin iyodür (AcI), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür (Tris HCl) Sigma-Aldrich'ten, Merck 100983 marka etil alkol kimyasalları kullanılmıştır.

2.2. Metot

Çalışma kapsamında örneklerin gravimetrik ve fizikokimyasal analizleri ile bazı biyolojik aktivite özellikleri (antioksidan, antibakteriyel ve antiasetilkolinesteraz) incelenmiştir.

2.2.1. Kozalak Örneklerinin Hazırlanması

TAPPI T 257 om-85'e standardına göre hazırlanan örnekler Wiley değirmeninde öğütülmüş ve sarsıntılı elekten elenerek 60 meshin üzerinde kalan kısmı analizler gerçekleştirinceye kadar kavanozlarda saklanmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2: DK Gökna, Toros Sedir, Doğu Ladini ve Fıstık Çamı kozalağı unu

2.2.2. Kozalak Örneklerine Ait Gravimetrik Analizler

Bu bölümde odunun ana bileşenlerinin tespitinde uygulanan gravimetrik yöntemlerden ekstraktif madde miktarları (TAPPI T-204) ve Klason lignin tayin yöntemi (TAPPI T-222

om-02) kullanılmıştır. Ayrıca, lignin verimi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 2.1) (Cassoni vd., 2022).

$$\text{Lignin verimi (\%)} = \left(\frac{\text{çökeltmiş lignin miktarı (g)}}{\text{Kontrol örneğindeki lignin miktarı (g)}} \right) \times 100 \quad (2)$$

DDÖÇ muamelelerinde ön bir ekstraksiyon işlemi uygulanmadığı için kullanılacak kozalak örneklerinin ekstraktif madde miktarları soxhlet cihazında etil alkol ile yapılan ekstraksiyonuyla tespit edilmiştir. Klason lignin tayini ise kontrol ve LZK örneklerine uygulanmıştır. LZK'ya uygulanan klason lignin tayini ligninin safsızlık hesaplamalarında kullanılmıştır.

2.2.3. DDÖÇ hazırlanması

Bu çalışmada, hidrojen bağı alıcısı (HBA) olarak kolin klorür (ChCl) ve hidrojen bağı donörü (HBD) olarak laktik asit (LA) kullanılmıştır. Mol oranları 1:10 olacak şekilde ayarlanmıştır. DDÖÇ hazırlanırken ChCl (1 mol ChCl'nin ağırlığı 139,62 g), LA (1 mol LA'nın ağırlığı 90,08 g), molekül ağırlıklarına göre hesaplanmıştır. Elde edilen katı-sıvı karışım 80 °C'deki ısıtıcı plaka üzerinde homojen, şeffaf bir DDÖÇ elde edilinceye kadar karıştırılarak ısıtılmış, cam şişelerde saklanmıştır.

2.2.4. Kozalaklardan Lignin Eldesi

Bu bölümde DDÖÇ kullanarak mikrodalgada lignin eldesi ve geleneksel kağıt hamuru pişirme yöntemi olan Kraft lignin eldesi ele alınmıştır.

2.2.4.1. Mikrodalga Ekstraksiyonu ile DDÖÇ Lignin Eldesi

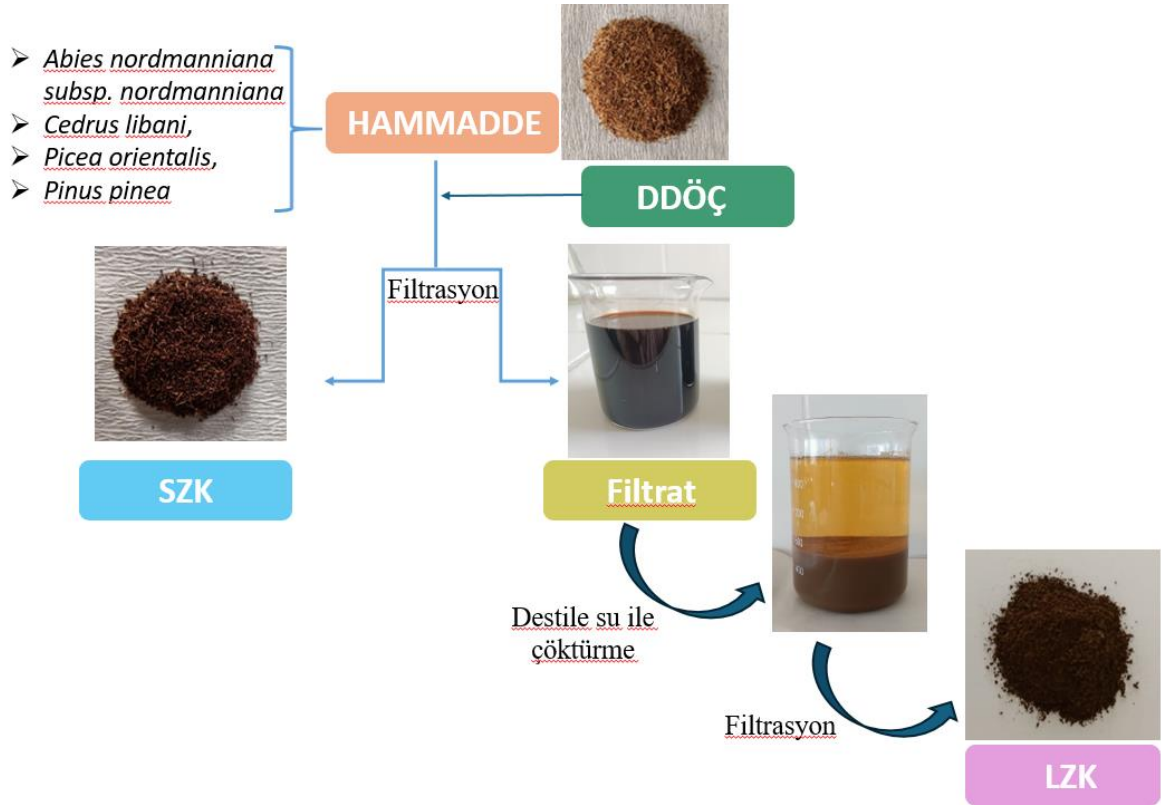
Yeni nesil çözücüler kullanılarak elde edilen lignin, kimyasal lignin sınıfında yer almaktadır. DDÖÇ lignini, bu çalışmanın ana materyalidir. DDÖÇ lignini eldesinde literatürde farklı

yöntemler kullanılmıştır (Soto-Salcido vd., 2020; Chen ve Wan, 2018; Škulcová, 2016). Tez kapsamında DDÖÇ lignini mikrodalga ekstraksiyonu ile elde edilmiştir.

Herhangi bir ön muamele uygulanmamış kozalak örnekleri (kontrol), ChCl:LA mol oranı 1:10, katı:sıvı oranı 1:20 (a:a), sıcaklık 150 °C, 1 saat olacak şekilde mikrodalga reaktöründe (Milestone Start D) DDÖÇ ile reaksiyona sokulmuştur (Tablo 2.1). Estrakt muamele sonrası teflon kaplardan 500 ml etil alkol ilave edilerek behere aktarılmıştır. Katı kısım (selülozca zengin kısım-SZK) ve sıvı kısım 2 numaralı kroze kullanılarak vakum yardımıyla birbirinden ayrılmıştır. Kroze içerisinde kalan SZK, 500 ml etil alkol ile yıkanmıştır. Filtratlar beher içerisinde birleştirilmiştir. SZK ise destile su ile yıkanıp, etüvde 103±2 °C’de kurutulmuştur. Filtratlardaki etil alkol, döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan çözeltiliye 4 litre destile su konularak lignince zengin kısmın (LZK) çökmesi için 1 gece bekletilmiştir. Çökelen LZK, Whatman 42 nolu mavi bant filtre kağıdı kullanılarak Buhner hunisi ve vakum yardımıyla süzölmüştür. Elde edilen LZK örneklerinin saflığını artırmak ve DDÖÇ’ü tamamen uzaklaştırmak için filtre kağıdı üzerinde kalan LZK örnekleri önce 100 ml 1:9 (h:h) oranında etil alkol:su ve ardından 100 ml destile su ile yıkanmış ve 48 saat boyunca freeze dryerda kurutulmuştur. Şekil 2.3’de DDÖÇ muamelesinin iş akışı kısaca özetlenmiştir.

Tablo 2. 1: Kozalak örneklerinin DDÖÇ muamele koşulları

Muamele sıcaklığı (°C)	150
Muamele süresi (saat)	1
Katı:sıvı oranı	1:20
DDÖÇ mol oranları (ChCl:LA)	1:10



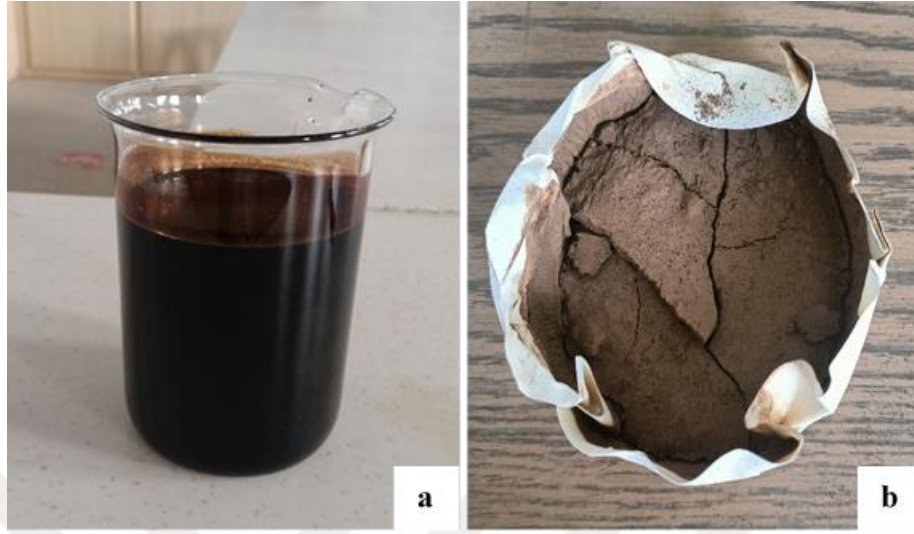
Şekil 2. 3: DDÖÇ muamele iş akışı

2.2.4.2. Kraft Yöntemi ile Lignin Eldesi

DDÖÇ ve mikrodalga uygulamaları ile elde edilen ligninin proses sırasında ne tür bir kırılma/kopmaya maruz kaldığını görebilmek ve durumun biyolojik aktivite özelliklerine etkisini açıklayabilmek adına, Doğu Ladini kozalağından dünya genelinde en fazla uygulanan kraft lignin elde edilerek karşılaştırma yapılmıştır.

Kozalaklar pişirme öncesi küçük parçalara ayrılmıştır. Kraft pişirmesinde, aktif alkali oranı %22, sülfidite oranı %26, maksimum sıcaklığa ulaşma süresi 90 dakika, maksimum sıcaklıkta pişirme süresi 60 dakika, pişirme sıcaklığı 170 °C ve çözelti/yonga oranı 5/1 olarak belirlenmiştir. Pişirme 15 lt kapasiteli, elektrikle ısıtılan, 25 kg/cm² basınca dayanıklı, dakikada 2 devir yapabilen ve otomatik kontrol tablosuyla sıcaklığı termostatlı olarak kontrol edilebilen laboratuvar tipi döner pişirme kazanında yapılmıştır. Pişirme sonrasında kazan 150 meshlik elekten süzülüp, katı kısım ve siyah çözelti ayrılmıştır. Siyah çözeltinin pH'ı 2 olana kadar magnetik karıştırıcı ile sürekli karıştırarak sülfürik asit (H₂SO₄) ile titre edilmiştir. pH 2 olan çözelti Whatman 42 nolu mavi bant filtre kağıdı ile süzülmüştür. Filtre

kağıdı üzerinde kalan katı kısım (LZK) 12 saat derin dondurucuda bekletildikten sonra 48 saat boyunca freeze dryerda kurutulmuştur.



Şekil 2. 4: Siyah çözelti (a) ve Kraft lignin (b)

2.2.5. Fizikokimyasal Karakterizasyon Yöntemleri

Gerek DDÖÇ uygulamaları sonrası elde edilen SZK ve LZK örneklerinin gerekse Kraft ligninin morfolojik ve kimyasal yapılarının karakterize etmek ve kontrol örnekleriyle karşılaştırarak meydana gelen değişimleri ortaya koymak amacıyla farklı enstrümental analizler uygulanmıştır. Tablo 2.2’ de kullanılan enstrümental analizler gösterilmiştir.

Tablo 2. 2: Uygulanan enstrümental analizler

Örnekler	XRD	SEM	TGA	FTIR	GPC	³¹ P NMR
Kontrol	+	+	+	-	-	-
SZK	+	+	+	-	-	-
LZK	-	+	-	+	+	+

XRD, SEM, FTIR, TGA Bartın Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında, GPC ve ³¹P NMR analizleri Ca' Foscari Üniversitesi Moleküler Bilimler ve Nanosistemler Bölüm Laboratuvarında yaptırılmıştır.

2.2.5.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Lignin örneklerinin FTIR-ATR analizleri, Shimadzu IRAffinity-1 marka spektrometre cihazı ile 4 cm^{-1} çözünürlükte, $600\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında 20 tarama yapılarak belirlenmiştir.

2.2.5.2. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC)

Örneklere ait moleküler dağılımları Perkin Elmer Flexar marka yüksek performanslı sıvı kromatografili jel geçirgenlik kromatografi cihazı ile yapılmıştır. Waters Styragel HR 4E kolonu takılı cihazda 280 nm 'de ölçüm yapan UV detektörü kullanılmıştır. Tetrahidrofuran (THF) $0,6\text{ mL/dk}$ akış hızında mobil faz olarak kullanılmıştır. Standart eğri kalibrasyonu için polistiren (M_w ; 820, 2330, 3680, 18 700, 31 600, 44 000, 212 400, 382 100, 570 000, 994 000 ve $1\,860\,000\text{ g mol}^{-1}$) kullanılmıştır. GPC analizinden önce ligninler tetrahidrofuran (THF) iyi çözebilmeleri için asetobrominlenmiştir (Lange vd., 2016).

Lignin numunesi (10 mg), önceden kurutulmuş bir reaksiyon kabına tartılmıştır ve $2,3\text{ mL}$ buzlu (susuz) asetik asit ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı 30 dakika karıştırılmış ve ardından $0,25\text{ mL}$ ($3,38\text{ mmol}$) asetil bromür ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımı son olarak oda sıcaklığında 4 saat karıştırılmıştır. Asetik asit ve fazla asetil bromür, etkili bir döner buharlaştırıcıyla buharlaştırılmıştır, ardından $25\text{-}30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30-45 dakika yüksek vakumlu kurutma yapılmıştır. Asetobrominlenmiş lignin ürünleri GPC mobil fazında (THF) tamamen çözünür hale gelmiştir (Crestini vd., 2017).

2.2.5.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Numunelerin morfolojisi, 5 kV ve 10 kV hızlanma voltajında taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Tescan MAIA3 XMU-SEM) ile görüntülenmiştir. Tüm numunelerin yüzeyleri, iletkenliğin artırılması için altın ve paladyum karışımı püskürtülerek kaplanmıştır.

2.2.5.4. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Tablo 2.2'deki belirtilen örneklerle beraber ticari olarak satın alınan Kraft lignini ve laboratuvar ölçeğinde Doğu Ladin kozalağından üretilen Kraft ligninin termal bozunma davranışlarını incelemek üzere Hitachi STA 7300 marka TGA/DTA Cihazı kullanılmıştır.

Analiz şartları, 20°C'den 10 °C/dak bir ısıtma hızıyla 900 °C'ye çıkan bir sıcaklık, 20 mL/dak azot akışı şeklinde belirlenmiştir.

2.2.5.5. X-Işını Difraktometresi (XRD)

Numunede bulunan selülozun kristal yapısını değerlendirmek için, 40 kV ve 30 mA'da çok işlevli bir X-ışını difraktometresi (Rigaku Smartlab) kullanılarak kontrol ve SZK örnekleri üzerinde XRD gerçekleştirilmiştir. XRD verilerine göre kristallik indeksleri (Kİ) aşağıdaki Eşitlik 3 kullanılarak hesaplanmıştır (Segal vd., 1959).

$$Kİ (\%) = [(I_{002} - I_{am}) / I_{002}] * 100 \quad (3)$$

I_{002} : kristal alan kırılma yoğunluğu

I_{am} : amorf bölgenin kırılma yoğunluğu

2.2.5.6. ³¹P Nükleer Magnetik Rezonans (³¹P NMR) Spektroskopisi

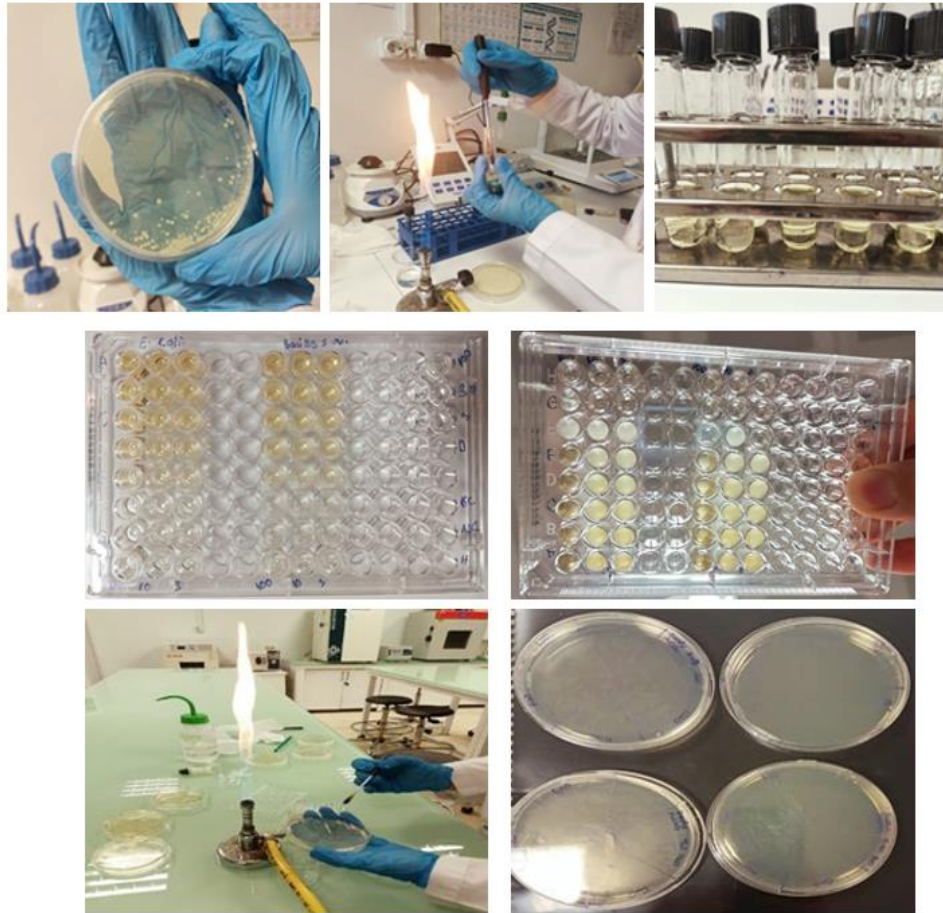
LZK, laboratuvar ölçeğinde elde edilen ladin kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerine ³¹P NMR analizi gerçekleştirilmiştir. 30 mg örnek 0,5 ml döteryumlu kloroform ve döteryumlu piridin (1:1.6, v/v) içerisinde tamamen çözülmüştür. 0,1 M'lik bir krom (III) asetilasetonat solüsyonu (10 mg) ve iç standart (35,8 mg N-hidroksi-5-norbornen-2,3-dikarboksimid (NHND)) ile hazırlanmış 100 µl ilave edilmiştir. Çözelti, 10 dakika boyunca 0,1 mL fosfatlama reaktifi (2-kloro-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioksafosfolan, TMDP) ile reaksiyona sokulmuş ve 5 mm'lik bir NMR tüpüne aktarılmıştır. 400 MHz Bruker AVANCE III 400 spektrometre (Bruker, Karlsruhe, Almanya) üzerinde ³¹P NMR analizi için 5 mm'lik bir NMR tüpüne aktarılmıştır. NMR veri toplama ve işleme için Bruker Avance III HD 500 MHz ve Topspin 3.5 kullanılmıştır.

2.2.6. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Tez kapsamında LZK, ticari ve laboratuvar ölçeğinde elde edilen ladin kraft ligninlerine antibakteriyel, antioksidan ve asetilkolinesteraz enzim inhibisyon deneyleri uygulanmıştır. Her bir yöntem detaylı olarak ilgili bölümde ele alınmıştır.

2.2.6.1. Antibakteriyel aktivite tayini

Örneklere ait antibakteriyel aktivitelerinin tespiti amacıyla Gram (-) (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve Gram (+) (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) suşları analiz edilmiştir. Şekil 2.6'da deney aşamaları gösterilmiştir. Tüm suşların bulanıklığı 0,5 McFarland standardına ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) sabitlenmiştir. Sıvı besiyeri mikrodilüsyon deneyi, 96 kuyucuklu plakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan lignin örnekleri, LB (Luria Broth) ortamını içeren steril, düz tabanlı bir mikropalakaya pipetlenmiştir. Daha sonra kuyucuklara bakteri hücreleri (O.D = 0.5) yüklenmiş ve 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kuyucuklarından alınan örnekler, LB agar petrileri üzerinde alt kültürlendi ve gece boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Daha sonra gözlemlenen üreme koşullarına göre MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonu) değerleri belirlenmiştir.



Şekil 2. 5: Antibakteriyel deney aşamaları

2.2.6.2. Antioksidan Aktivite Tayini

Lignin örneklerinin antioksidan aktiviteleri 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal giderim yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DPPH radikal giderme aktivitesine yönelik olarak 96 kuyucuklu plakalara etil alkol ile çözündürülmüş farklı konsantrasyonlarda lignin örneği, 160 µL 0,1 mM DPPH eklenerek son hacim 200 µL'ye tamamlanmıştır. Oda koşullarında 30 dakika inkübasyonun ardından 517 nm dalga boyunda çözeltilerin absorpsiyonları köre (etil alkol) karşı okunmuştur. Ölçüm sonunda elde edilen absorpsiyon değerleri üzerinden aşağıdaki Eşitlik 4 kullanılarak % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır (Blois, 1958). Üç tekrarlı yürütülen çalışma BHT standart olarak kullanılarak yapılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = ((A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}) * 100 \quad (4)$$

2.2.6.3. Asetilkolinesteraz (AChE) Enzim İnhibisyonu Tayini

Ellman yöntemi, substrat olarak asetiltiyokolin iyodür (AChI) kullanılarak inhibitör potansiyeli değerlendirmek için yaygın olarak uygulanan bir spektrofotometrik testtir. Testin temel prensibi, asetiltiyokolin iyodürün karşılık gelen enzimler tarafından hidrolizi, bunun sonucunda 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun oluşmasıdır. Bu anyon, 412 nm'de absorpsiyon gösteren 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile sarı renkli bir kompleks oluşturma yeteneğine sahiptir. Renk yoğunluğu, serbest tiyol gruplarının konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Ellman vd., 1961).

Asetilkolinesteraz aktivitesinin tayin edilmesi için 96-kuyucuklu plakalarda; 14 µL örnek, 16 µL AChE, 130 µL tampon çözeltisi (5mM EDTA içeren 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) ile 37°C'da 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon kuyularına 20 µL 2.5 mM DTNB ve 20 µL substrat çözeltisi (asetiltiyokolin iyodür) eklenerek başlatılmış ve 412 nm dalga boyunda, 3 dakika boyunca 20 saniye aralıklar ile absorpsiyon ölçümü yapılmıştır.

2.2.7. İstatistiksel Analizler

IC₅₀ verilerine göre Graphpad prism 10 programı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ve % 95 güven düzeyinde Tukey testi yapılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde gerçekleştirilen analizlerin sonuçlarında elde edilen bulgular irdelenmiştir.

3.1. Gravimetrik Analizlere Ait Bulgular

Bu bölümde kontrol, SZK ve LZK örneklerine ait gravimetrik analiz sonuçları verilmiştir.

3.1.1. Kontrol örneklerinin gravimetrik analiz sonuçları

Örneklere ait rutubet, ekstraktif madde miktarı ve Klason lignin değerleri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Elde edilen değerler incelendiğinde ekstraktif madde miktarlarının %2,91 ile %24,74 arasında değiştiği, Klason lignin miktarının ise %34,69 ile %46,32 arasında olduğu görülmektedir. Bu değerler Dönmez vd. (2012)’nin yaptığı çalışmayla bazı farklılıkların olduğunu göstermiştir. Bu farklılıkların kozalakların toplanma zamanı, ağacın yaşı, bulunduğu rakım ve yetiştiği ortam gibi faktörlerden kaynaklandığı düşünülmüştür.

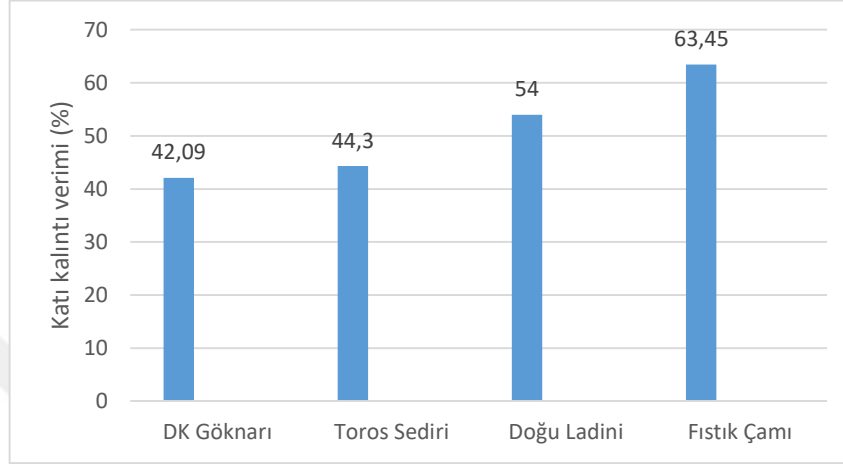
Tablo 3. 1: Kontrol örneklerinin gravimetrik analiz sonuçları (%)

Hammaddeler	Rutubet	Tespit		Dönmez vd., 2012	
		Ekstraktif madde	Klason Lignin	Ekstraktif madde	Klason Lignin
DK Göknarı	7,99	21,10± 0,51	46,21±0,65	14,42	40.41
Toros Sediri	5,88	24,74±0,2	34,69±0,58	13,42	30.79
Doğu Ladini	10,284	13,33±0,12	46,32±0,42	8,11	48.34
Fıstık Çamı	8,75	2,91±0,05	36,13±0,16	7	43.08

3.1.2. SZK Örneklerinin Verimine Ait Bulgular

DDÖÇ muamelelerin etkinliği SZK verimi değerlerinin belirlenmesi ile ortaya konulmaktadır. DDÖÇ’lerin biyokütlenin yapısal bileşenlerini ayrıştırma yeteneği, SZK verimi üzerinde önemli etkilere sahiptir (Sharma vd., 2022). SZK verim değerinin yüksek olması DDÖÇ’ün etkinliğinin düşük, SZK verim değerinin düşük olması DDÖÇ etkinliğinin

yüksek olması anlamına gelmektedir (Özgürlük vd., 2024). BU çalışmaya ait SZK verimleri Şekil 3.1’de verilmiştir. Fıstık Çamı %63,45 ile en yüksek değeri verirken, Doğu Karadeniz Göknarı ise %42,09 ile en düşük SZK verimi değerini vermiştir. Bu durum, DDÖÇ muamelesinin Doğu Karadeniz Göknarı kozalağı üzerinde daha etkili olduğunu göstermektedir.



Şekil 3. 1: DDÖÇ muamelesinin katı kalıntı verimi üzerine etkisi

SZK verimi üzerine DÖÇ türü, muamele sıcaklığı ve süresinde etkili olduğu ifade edilmiştir (Kang vd., 2023). Su vd. (2021), DÖÇ’e ait molar oran ve reaksiyon sıcaklığı gibi parametrelerin kavak odun örneğinin kimyasal bileşimine etkilerini irdelemiş ve ChCl:LA molar oranının 110 °C’de 1:2’den 1:10’a çıkarıldığında SZK veriminin %91,7’den %78,5’e, 130 °C de ise %65,7’den %55,2’ye düştüğü ifade edilmiştir. Dalı darı, mısır atığı ve fil otuna ait ChCl:LA mikrodalga muamelesinde, SZK verimi sırasıyla %50,46; %36,64; %53,21 olarak bulunmuştur (Chen ve Wan, 2018).

3.1.3. Lignin Saflığı

DDÖÇ ile mikrodalga ekstraksiyonu sonrasında elde edilen LZK örneklerine ait saflık derecelerini belirlemek amacıyla Klason lignini deneyi yapılmıştır. Elde edilen veriler Tablo 3.2’de verilmiştir. En yüksek değer %82,81 ile *Pinus pinea*’da elde edilirken, diğer saflık değerleri de birbirine yakın bulunmuştur.

Tablo 3. 2: Lignince zengin kısımların (LZK) saflıkları ve verimleri (%)

Hammaddeler	Saflık	Verim
DK Göknarı LZK	80,31	59,26
Toros Sediri LZK	82,65	89,29
Doğu Ladini LZK	78,6	55,25
Fıstık Çamı LZK	82,81	41,41

Lignin verimi, biyokütle kaynağından elde edilebilen lignin miktarının yüzdesini ifade etmektedir. Yapılan bu çalışmada Toros Sediri LZK örneğinin lignin verimi %89,29 olup diğer LZK örneklerine göre oldukça yüksektir. Tablo 3.2’de görüldüğü gibi hem kontrolde bulunan ligninin yüksek miktarda elde edilmesi hem de saflığının yüksek olması dikkate değer bir veri olduğunu göstermektedir.

Cassoni vd., (2022) üzüm saplarından lignini iki yöntem kullanarak elde edilmişlerdir: alkali (NaOH) ve DÖÇ (laktik asit:kolin klorür). Alkali ekstraksiyon için tanımlanan parametreler, düşük saflıkta ligninin ~%48’inin geri kazanılmasına izin vermiştir ve bu yöntemi geliştirmek için bir otohizoliz muamele uygulayarak ~%79 saflık; ~%32 verim elde etmişlerdir. DÖÇ yönteminde ise muameleye gerek kalmadan yüksek saflıkta lignin (~%90) ve alkali yöntemine göre daha iyi bir verim (%50,2) elde edilmesini sağlamıştır.

Chen ve Wan (2018), dallı darı, mısır atığı ve fil otuna DÖÇ (ChCl: LA) ile 150 °C, 45 saniye mikrodalga muamele sonrası lignin verimi sırasıyla %48,39; %70,84; %42,67 lignin saflığı ise sırasıyla %87,42; %84,96; %86,01 olarak bulmuşlardır. Kısa süre de yüksek lignin verimi (~%71) ve saflıkta lignin üretmişlerdir.

Li vd., (2019) *Pinus bungeana* odununun ChCl:LA ile muamelesinde cam reaktör ile 120°C 2 saat, mikrodalga reaktöründe 120 °C 10 dakika muamele etmiştir. Lignin verim oranlarını sırasıyla %66,59 ve %42,81 olarak tespit etmişlerdir. Cam reaktörde %100 verim için 360,41 dakika muamele gerekirken, mikrodalga reaktöründe 23,36 dakika yeterli olabileceği aşıkardır.

Mankar vd., (2022) yaptıkları çalışmada ısıtma modunun hindistancevizi lifinden lignin ekstraksiyonunun verimliliği üzerindeki etkisi de karşılaştırmışlardır. Deney, geleneksel

ısıtma altında lignin ekstraksiyonu için ChCl:LA (1:4) DÖÇ içeren bir yağ banyosunda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 150 °C’de 20 dakika sürdürüldüğünde sadece %13,5 lignin ekstrakte edilmiştir. Benzer reaksiyon koşulları altında, reaksiyon mikrodalga ısıtma altında gerçekleştirildiğinde, lignin ekstraksiyonu geleneksel ısıtmayla karşılaştırıldığında 6 kat daha yüksek (%82) olmuştur. Geleneksel ısıtma altında lignin ekstraksiyonunu daha da geliştirmek için reaksiyon süresi 8 saate uzatılmış ve bu da yalnızca %46 lignin ekstraksiyonu ile sonuçlanmıştır.

Kammoun vd., (2021) DÖÇ1 (ChCl-oksalik asit), DÖÇ2 (ChCl laktik asit) ve DÖÇ3 (ChCl-üre) ile alfa yaprağı, badem çekirdeği kabuğu, halep çamı kozalağı, Posidonia yaprağı ve pirinayı mikrodalga reaktöründe 800 W, 1 dakika muamele etmişlerdir. Sonuçlar ChCl-oksalik asit karışımının en yüksek lignin saflığını ve en düşük verimi sağladığını göstermektedir. DÖÇ1 işlemiyle %90 üzerinde lignin saflığı (alfa yaprakları %94, badem kabukları %93, halep çam kozalakları %90, Posidonia yaprakları %92 ve pirina %91) elde edilmiştir. Çam kozalaklarından ve pirinadan elde edilen lignin verimleri DÖÇ1 uygulaması için sırasıyla %32,31 ve %26,04 ve DÖÇ3 uygulaması için %48,72 ve %43,76 ile daha yüksek bulunmuştur. Alfa yapraklarından elde edilen lignin verimi, DÖÇ2 ile ekstrakte edilen diğer tüm ligninlerin verimlerinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Söğüt odunun DÖÇ ile muamelesiyle ilgili farklı çalışmalar mevcuttur. Li vd. (2017), farklı DÖÇ (kolin klorür bazlı laktik asit, gliserol ve laktik asit), farklı süre ve sıcaklıklarda muamele etmişlerdir. ChCl-Gly ve ChCl-U işlemiyle ihmal edilebilir miktarda ligninin giderildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, ChCl-LA muamelesinin, muamele şiddeti arttıkça artan lignin izolasyonu üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu belirlemişler. ChCl-LA ile işlem süresi 12 saatte DÖÇ-Lignin verimi iken 42 saatte olduğunda, %94,2 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 12 saat ChCl-LA ile muamele edildiğinde lignin saflığı yaklaşık %95 tespit edilmiştir. Yaptıkları çalışmada muamele süresi uzadıkça katı kalıntı veriminin azalması, karbonhidrat bileşenlerinin belirgin şekilde çözündüğünü ve/veya bozunduğunu vurgulamışlardır. Kang vd., (2023)’te yaptıkları çalışmada kolin klorür laktik asitten oluşan DÖÇ ile mikrodalgada 160 °C’de 15 dakika muameleyle yaklaşık %80 ligninin uzaklaştığını ve elde edilen ligninin saflığının %81 olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalarla da görüldüğü gibi geleneksel ısıtma yöntemlerine göre mikrodalga ısıtma işlem süresini kısaltmakta böylece enerji tüketimini azaltmaktadır. Mikrodalgalar

polar moleküllerle etkileşime girer, bu da dipol rotasyonu ve iyonik iletim yoluyla daha düşük enerji kaybıyla hızlı, düzgün hacimsel ısınmaya yol açar. DÖÇ'ler elektrik dipolleri olduğundan, mikrodalga ışıınımı DÖÇ'lerin iyonik karakterini en üst düzeye çıkarabilir ve moleküler polaritelerini artırabilir. Böylelikle, DÖÇ'lerdeki polar moleküllerin hareketi, DÖÇ çözeltisinin biyokütle gözeneklerine nüfuzunu arttırabilir ve lignin çözülmesi için gereken lignin bağının kırılmasını aktive etmek için enerji sağlayabilir (Zhou vd., 2022).

3.2. Fizikokimyasal Analizlere Ait Bulgular

Kontrol ve SZK örneklerine XRD, SEM ve TGA analizleri uygulanırken, LZK örneklerine ise FTIR, SEM, GPC ve 31PNMR analizleri uygulanmış ve elde edilen bulgular ilgili bölümlerde ayrı ayrı ele alınmıştır.

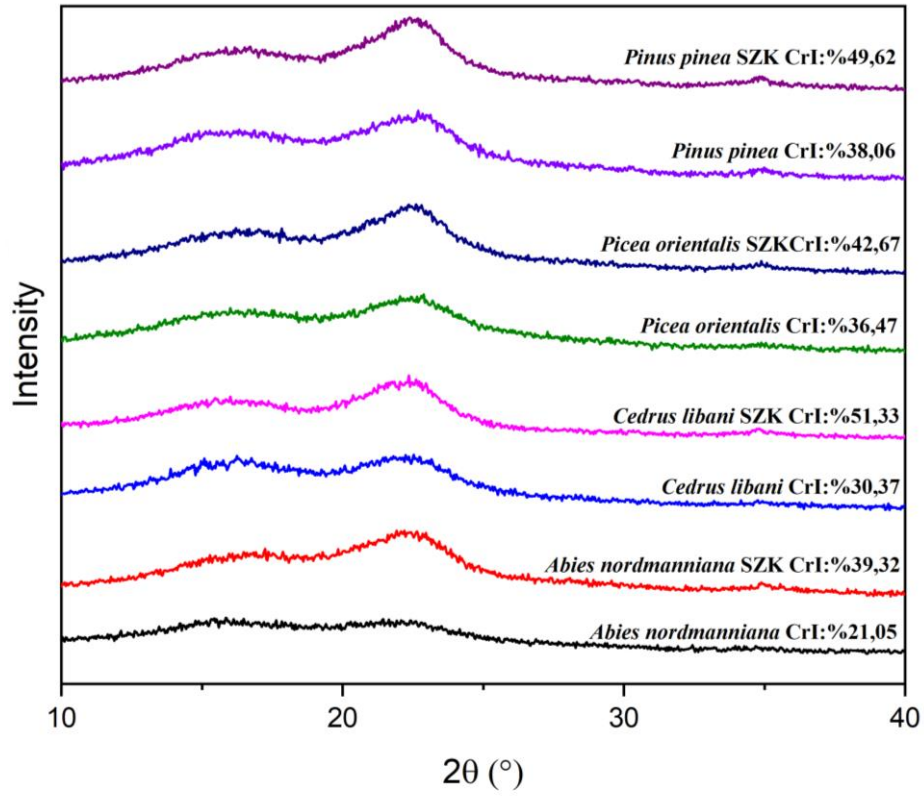
Lignindeki işlevselliği belirlemek için yapılan yapısal analiz, antioksidan kapasiteyi ve ilgili yapı-özellik ilişkilerini araştırmak için önemlidir. Ligninin çapraz bağlanan fenolik yapısı, hidroksil, karbonil, metoksi ve karboksilik gruplar gibi çok çeşitli ek fonksiyonel gruplarla kimyasal ve biyolojik etkileşimler için aktiviteler sağlar. Lignine bağlı çeşitli aktif grupların analizi, ligninin kimyasal ve biyofiziksel özelliklerini değiştirebildiğinden, ligninlerin fonksiyonel sınıflandırılmasında önemlidir (Al-Zagameem, 2020).

3.2.1. X-Işını Difraktometresi (XRD) Analiz Bulguları

Kristallik indeksini (Kİ) belirlemek amacıyla kontrol ve SZK örneklerine XRD analizi yapılmıştır (Tablo 3.3). DDÖÇ muamele öncesinde kristallik indeksi değerleri en yüksek %38,06 ile fıstık çamı kontrol örneğinde belirlenirken, en düşük değer %21,05 ile Doğu Karadeniz Gökmar'ında belirlenmiştir. DDÖÇ muamele sonrasında ise en yüksek %51,33 ile Toros Sediri SZK örneğinde tespit edilirken, en düşük değer %39,32 ile Doğu Karadeniz Gökmar SZK örneğinde tespit edilmiştir. I_{002} ve I_{am} için pikler sırasıyla $2\theta = 22,08^\circ$ - $22,88^\circ$ ve $18,44^\circ$ - $19,28^\circ$ 'de bulunmuştur. Burada I_{002} , $2\theta = 22$ civarında bir kırınım açısında konumlanan düzlem 002'deki maksimum yoğunluktur ve I_{am} , yaklaşık olarak $2\theta = 18$ civarında bir kırınım açısında ölçülen, numunenin amorf kısmından gelen minimum yoğunluğu temsil eder (García-García, vd., 2018). Bu çalışmada DDÖÇ ile muamele edilen numunelerin Kİ değerleri kontrol numunesine göre oldukça yüksek tespit edilmiştir (Şekil 3.2 Tablo 3.3).

Tablo 3. 3: Kontrol ve DDÖÇ ile işlenmiş kozalak numunelerinin 2 θ , yoğunluk ve Kİ değerleri

Örnek	I ₂₀₀		I _{am}		Kİ (%)
	2 θ (°)	Yoğunluk	2 θ (°)	Yoğunluk	
DK Göknarı kontrol	22,08	688,75	19,28	543,75	21,05
DK Göknarı SZK	22,20	1211,25	18,88	735,00	39,32
Toros Sediri kontrol	22,24	1041,25	19,08	725,00	30,37
Toros Sediri SZK	22,36	1081,25	18,88	526,25	51,33
Doğu Ladini kontrol	22,88	1141,25	18,44	725,00	36,47
Doğu Ladini SZK	22,80	1245,00	18,84	713,75	42,67
Fıstık Çamı kontrol	22,68	1330,00	18,56	823,75	38,06
Fıstık Çamı SZK	22,40	1302,50	18,44	656,25	49,62



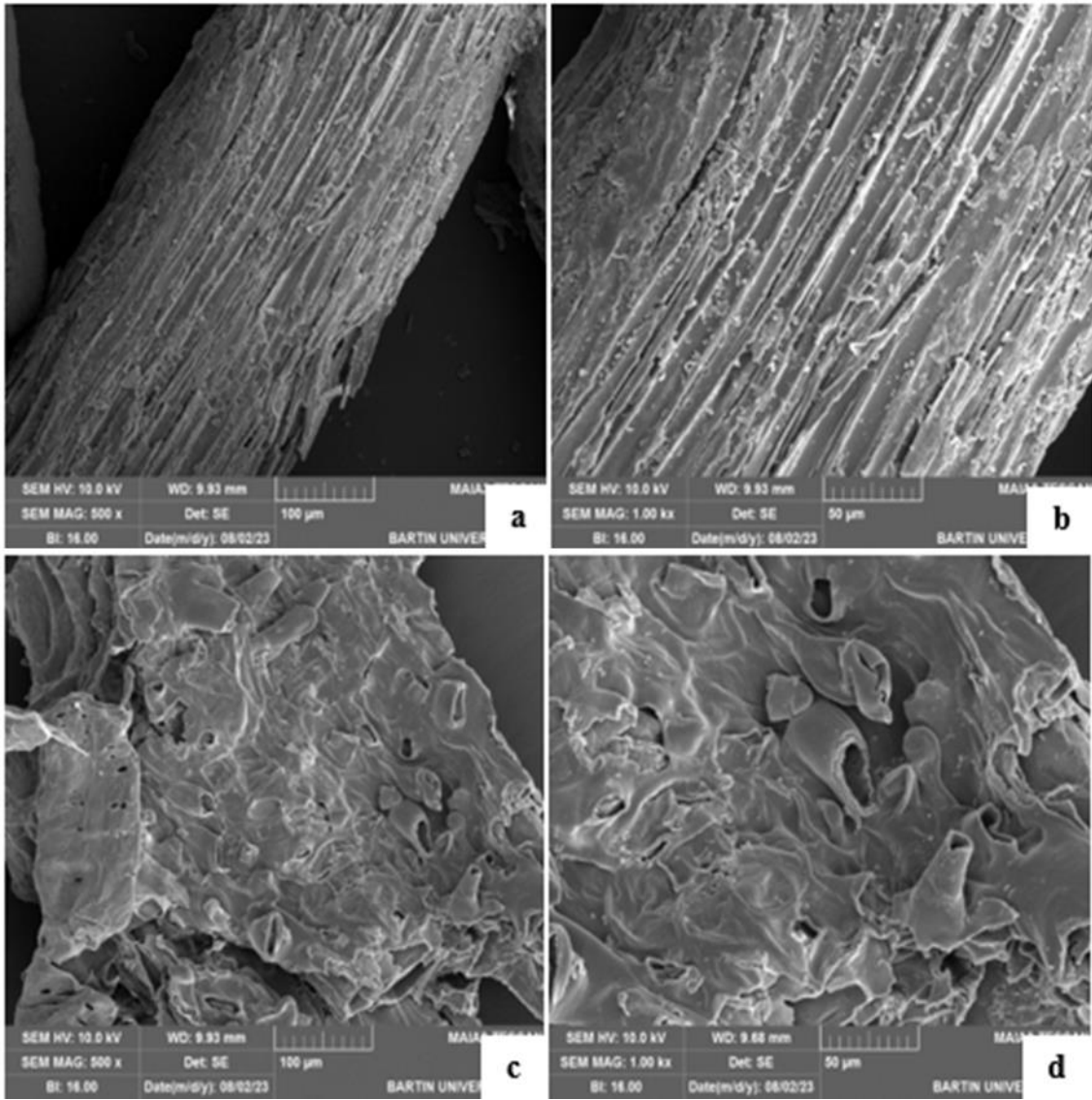
Şekil 3. 2: Kontrol ve DDÖÇ ile işlenmiş kozalak numunelerinin XRD spektrumları

DDÖÇ muamelesinden sonra artan Kİ'nin, hemiselülozlar ve lignin gibi amorf bileşenlerin uzaklaştırılmasından kaynaklandığı ve bunun da selüloz oranının artmasına neden olduğu rapor edilmiştir (He vd., 2015). Gülsoy ve Kılıç Pekgözlü (2024) sarıçam odununda

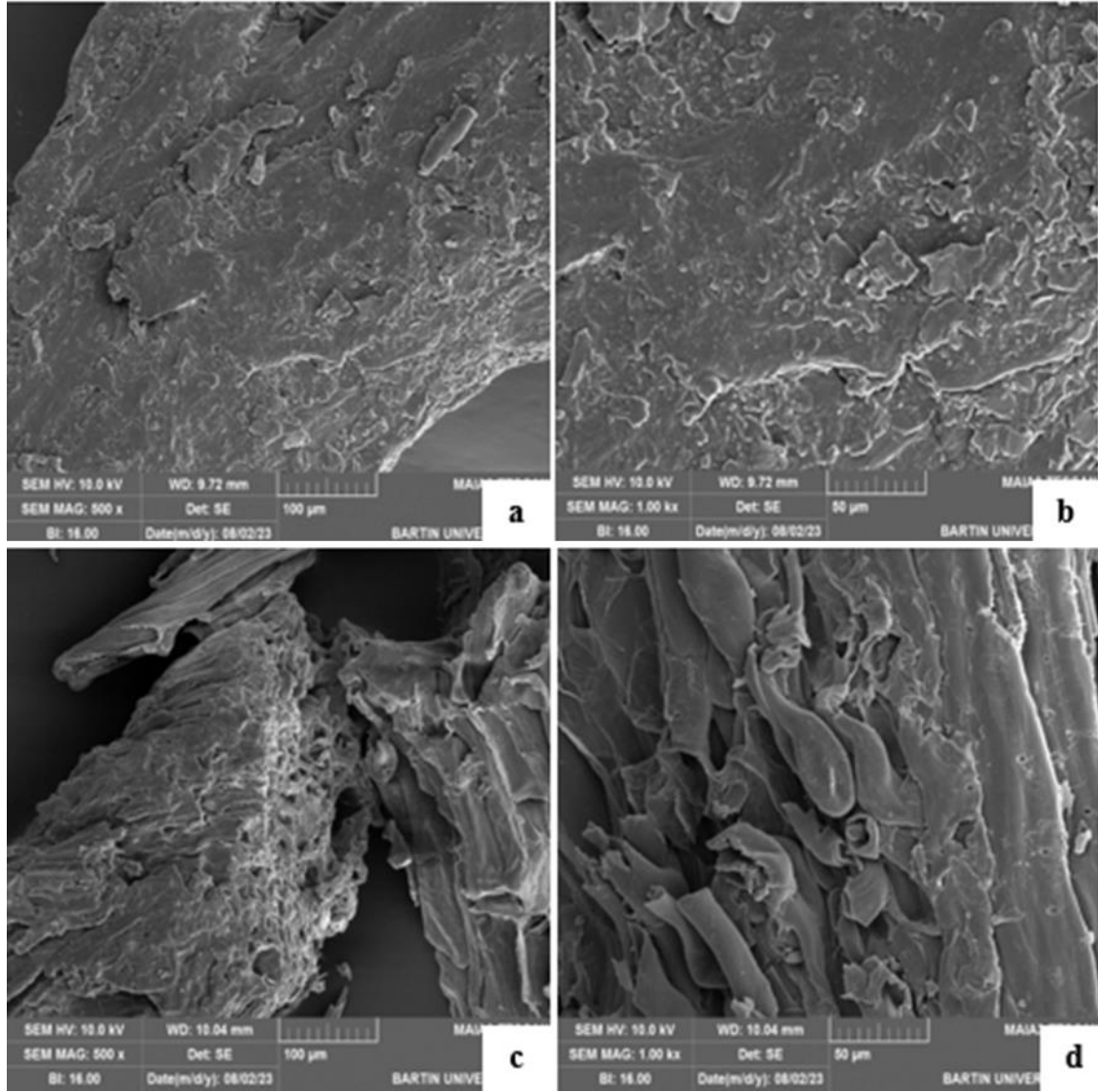
yaptıkları çalışmada ChCl ve LA'ten oluşan DÖÇ'ün farklı sürelerdeki etkisini incelemişlerdir. DÖÇ ile muamele edilen numunelerin KI değerlerinin kontrol örneğine göre yüksek olduğu ve örneklerin KI değerleri DÖÇ muamele süresi ile pozitif bir korelasyona sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada, Lim vd. (2019), DÖÇ ile pirinç samanından elde ettikleri kağıt hamurunun KI'nin pirinç samanı için %52,8'den, ağartılmamış DÖÇ ile işlenmiş hamur için %54,5'e yükseldiği ve ayrıca ağartılmış DÖÇ ile işlenmiş hamur için %60'a yükseldiği bulunmuştur. Xu vd. (2016), mısır atığını ticari iyonik sıvı ([Bmim][Cl]) ve DÖÇ (kolin klorür: formik asit) ile muamele etmiştir. XRD analizi yapılmış ve kristallik indeksleri işlem görmemiş %31,1; [Bmim][Cl] %41,1 ve kolin klorür: formik asit %57,2 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmayla amorf kısımların uzaklaştırılmasında DÖÇ'ün iyonik sıvıdan daha etkili olduğu vurgulanmıştır.

3.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

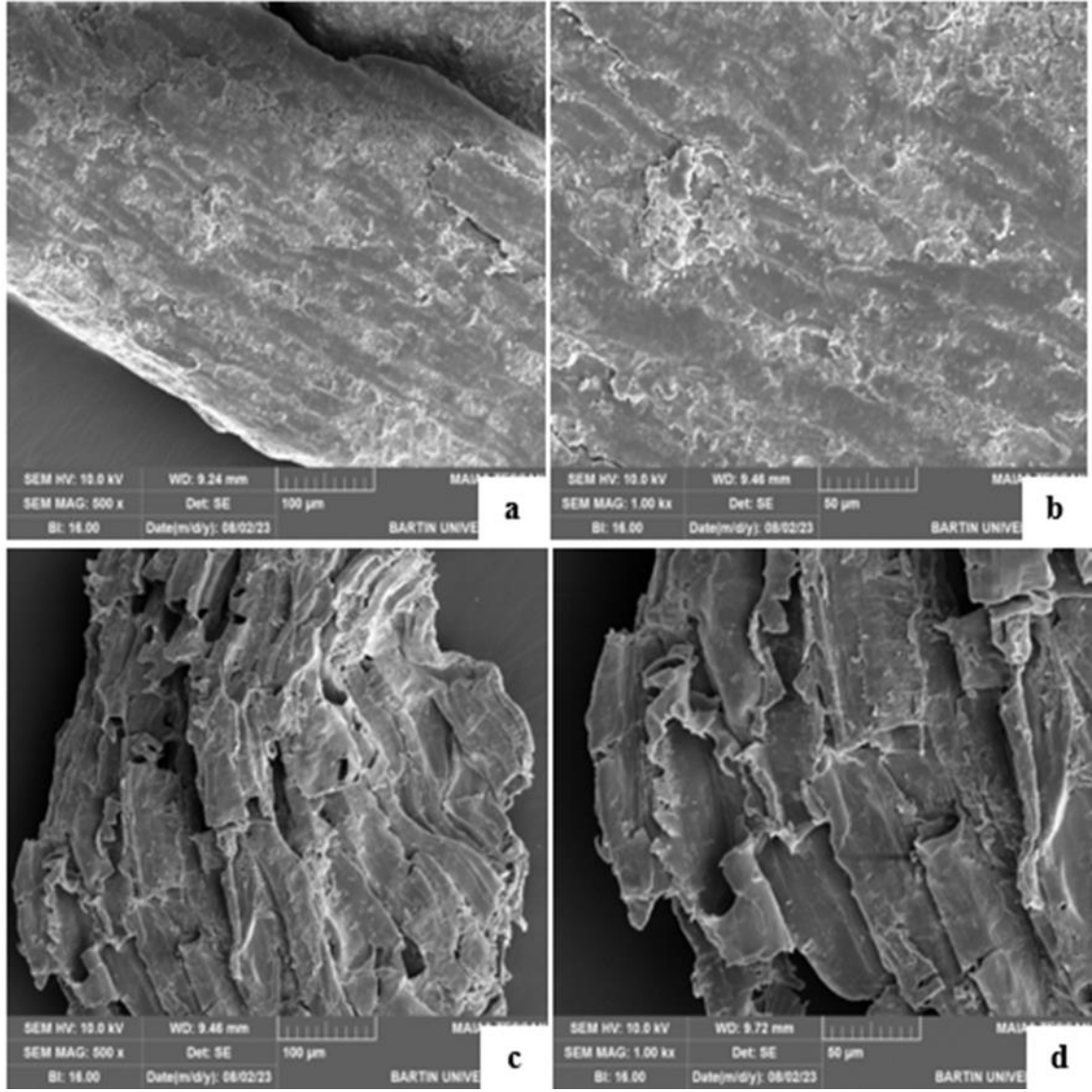
Kontrol ve SZK örneklerinin DDÖÇ muamele öncesi ve sonrası yüzey morfolojilerinin değişimleri görüntülemek için SEM analizleri yapılmıştır. SEM analizinden, kontrol örnekleri amorf bileşenler ile birbirine bağlanan yönlendirilmiş lif demetlerinden oluşmuştur (García-García, vd., 2018). Yüzeyleri nispeten pürüzsüz ve sağlam olduğu görülmüştür. DDÖÇ ile mikrodalgada ligninin uzaklaştırılması ile kozalak örneklerinin morfolojisinin bozulduğu, düzensiz, pürüzlü ve gözenekli bir yapı oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca lifler arası yapının bozulduğu, parçalanmalar olduğu ve hücre çeperinde boşluklar oluştuğu görülmüştür (Şekil 3.3-3.6).



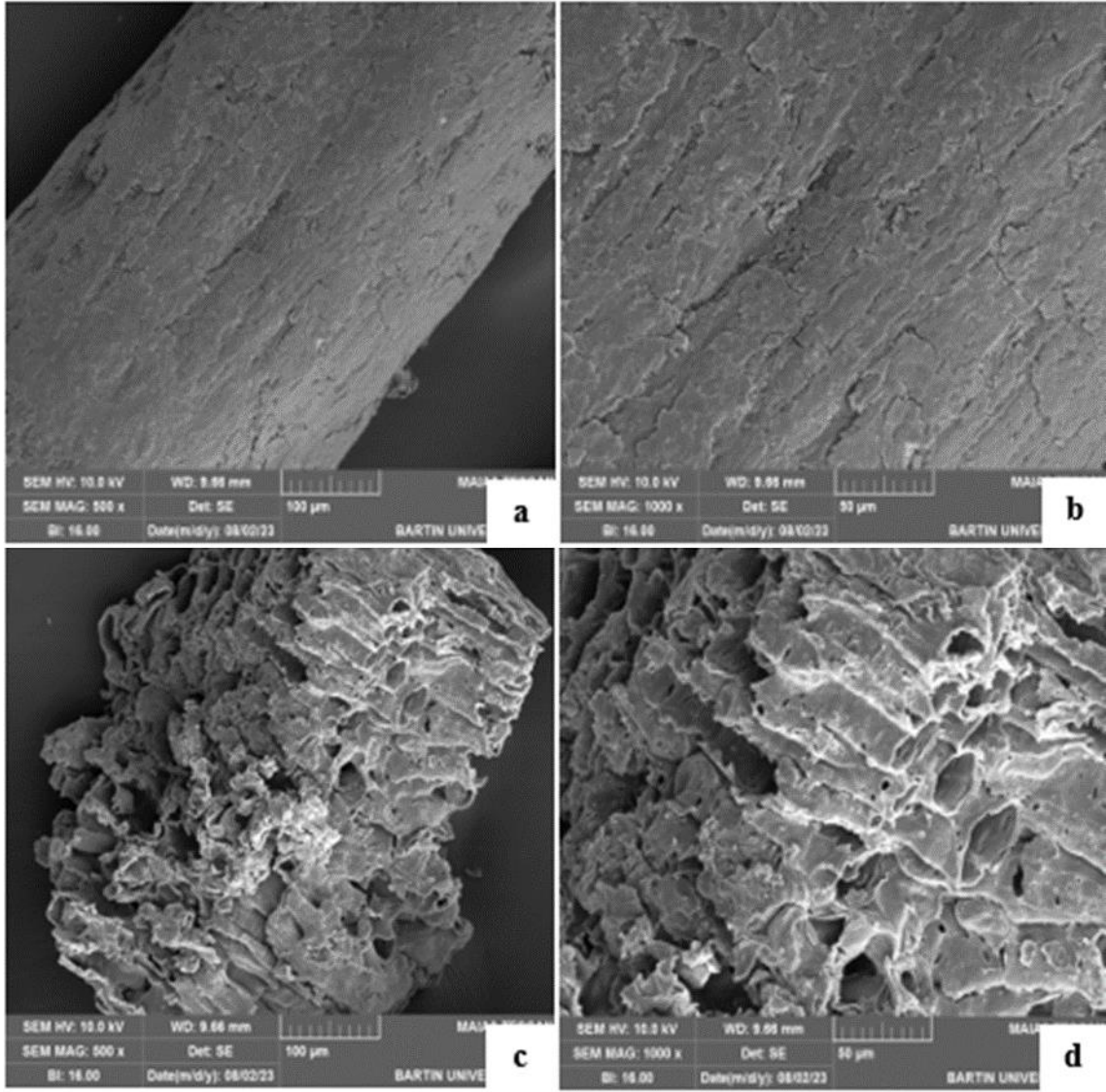
Şekil 3. 3: DK Göknarı kontrol (a) 500x (b) 1.00kx büyütme ve SZK örneklerinin (c) 500x (d) 1.00kx büyütme SEM görüntüleri



Şekil 3. 4: Toros Sediri kontrol (a) 500x (b) 1.00kx büyütme ve SZK örneklerinin (c) 500x (d) 1.00kx büyütme SEM görüntüleri



Şekil 3. 5: Doğu Ladini kontrol (a) 500x (b) 1.00kx büyütme ve SZK örneklerinin (c) 500x (d) 1.00kx büyütme SEM görüntüleri



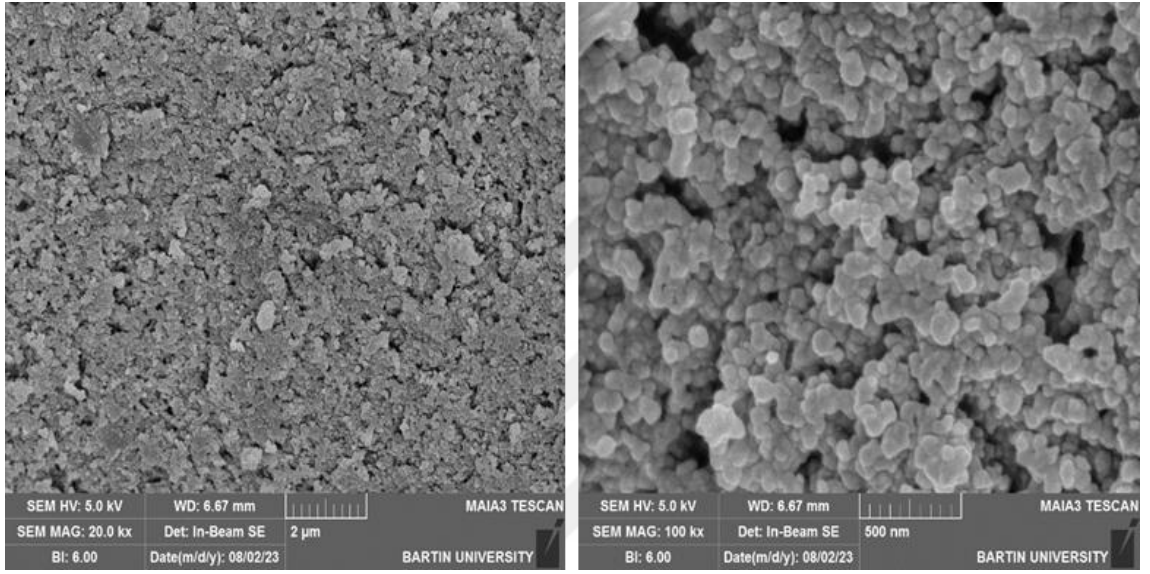
Şekil 3. 6: Fıstık Çamı kontrol (a) 500x (b) 1.00kx büyütme ve SZK örneklerinin (c) 500x (d) 1.00kx büyütme SEM görüntüleri

Loow vd. (2018), yaptıkları çalışmada palmye yapraklarını ChCl ve üre ile hazırlamış oldukları DÖÇ ile muamele etmişlerdir. Muamele edilmemiş palmye yaprakları, homojen ve sürekli fibril yapıları ile karakterize edilen, oldukça düzgün bir dış yüzey tabakası sergilemiştir. $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ve 4 saat süreyle ChCl :üre muamelesinden sonra, lignin tabakası soyulmuş ve geriye ciddi biçimde bozulmuş bir yapı kaldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, palmye yapraklarının temel fibril benzeri yüzeyinin gözle görülür şekilde çevrelenmiş ve sağlam olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, ChCl :üre'nin selüloz ve hemiselüloz üzerinde çok az etkisinin olduğu gerçeğinin altını çizmektedir. Mankar vd. (2022), ChCl :LA DÖÇ ile muameleden sonra hindistan cevizi lifinin yapısındaki morfolojik değişiklikleri SEM tekniği kullanılarak incelenmişlerdir. İşlem görmemiş ham hindistan cevizi lifi için farklı

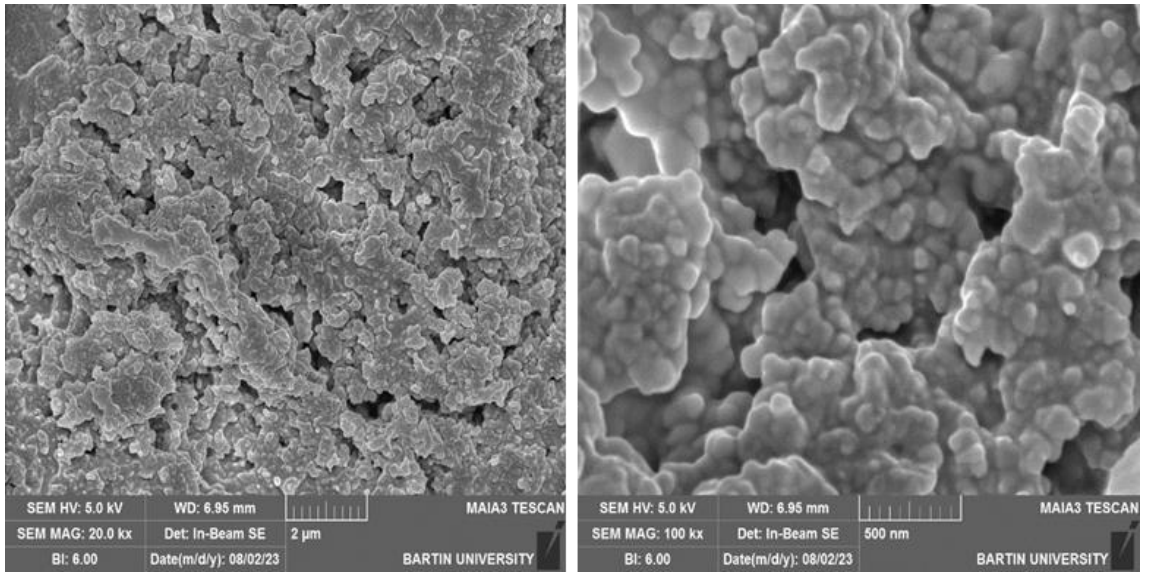
büyütmelerde görüntüleri alınmış ve ligninin uzaklaştırıldığını doğrulamak için ChCl: LA DÖÇ ile muameleden sonra geri kazanılan hindistan cevizi lifi ile karşılaştırılmıştır. İşlenmemiş hindistan cevizi lifi, liflerin sıkı bir şekilde paklendiğini ve düzenli bir yapıya sahip olduğunu gösteren pürüzsüz bir yüzey göstermiştir. Bununla birlikte, hindistan cevizi lifi ChCl: LA DÖÇ ile muameleye tabi tutulduğunda, hindistan cevizi lifinin yapısı çöktüğü ve yüzeyde çatlaklar olduğu, böylece lifli yapı gevşediği görülmüştür. Diğer bir çalışmada (Zhu vd., 2023) asma, farklı DÖÇlerle muameleye tabi tutulmuş katı kalıntının yüzey özellikleri ve morfolojisi SEM ile karakterize edilmiştir. İşlenmemiş asma yüzeyinin nispeten sağlam ve düzenli olduğunu, muameleye tabi tutulmuş asmaların yüzeyinin ise bozuk düzen ile pürüzlü ve gözenekli hale geldiğini gösterilmiştir. Bu, muamelenin lignin-hemiselüloz bağlantısını kırdığını ve lignini değişken derecelerde serbest bırakarak biyokütlenin yüzey yapısında bir miktar hasara neden olduğu belirlenmiştir. Özellikle ChCl-LA ve K₂CO₃-EG ile muameleye tabi tutulan katı kalıntının yüzeyinin ciddi şekilde kırıldığı ve ayrıca muameleye tabi tutulmanın yüzeyinde bazı görünür boşluklar olduğu bulunduğu görülmüştür. Bu durum muamele sırasında büyük miktarda lignin ve ksilanın uzaklaştırılmasından kaynaklandığı vurgulanmıştır. Özetle, SEM görüntülerinden, yedi farklı DÖÇ (kolin klorür/laktik asit (ChCl-LA), kolin klorür/gliserol (ChCl-GLY), kolin klorür/etilen glikol (ChCl-EG), kolin klorür/üre (ChCl-U), kolin klorür/malik asit (ChCl-MA), kolin klorür/trietanolamin (ChCl-TRA) ve potasyum karbonat/etilen glikol (K₂CO₃-EG)) muamelesinin hepsinin üzüm asması hücre çeperi yapısını değişen derecelerde parçaladığı açıkça görülmüştür. Li vd., 2021, kolin klorür bazlı üre (ChCl-U), etilen glikol (ChCl-EG), gliserol (ChCl-G), laktik asit (ChCl-LA) ve oksalik asit (ChCl-OA) ile elde edilmiş 5 farklı DÖÇ muamelesi altında küspe lifinin morfolojik değişiklikleri SEM ile gözlemlenmiştir. Küспенin yüzey görüntüsünde selüloz, lignin ve hemiselüloz ile kaplanmıştır ve selülozun büyük bir kısmı açığa çıkmamıştır. Küspede uzun lif demetlerinin olduğu, DÖÇ muamelesinden sonra lif demetleri parçalanmış hale geldiği ve selülozun açığa çıktığı düzensiz tabaka hücreleri oluştuğu görülmüştür. DÖÇ muamelesinden sonra liflerin hücreler arası tabakası farklı derecelerde bozunmuştur. ChCl-G ve ChCl-EG tarafından işlenen lif yüzeyi belirgin bir tüylenme sergilemiştir. Liflerinin S1 katmanı açığa çıkmış; ancak genel geometrik durumu önemli ölçüde değişmemiştir. ChCl-U, ChCl-OA ve ChCl-LA ile muameleden sonra, lifin hücreler arası tabakası neredeyse tamamen ayrılmıştır ve lifin yüzeyinde çok sayıda delik açığa çıkmıştır. Lifin spesifik yüzey alanı arttıkça, lif farklı derecelerde bükülme, burulma ve deformasyon göstermiştir ve genel geometrik durum önemli ölçüde değişmiştir. Xu vd. (2016), yaptığı çalışma da bu bulguyu desteklemektedir.

Muamele öncesinde düz yüzeye sahip olan mısır atığı örneğinin kolin klorür ve formik asit muamelesiyle, selüloz fibrillerinin hidrojen içi ve arası hidrojen bağlarının bozularak hemiselüloz ve ligninin uzaklaştırıldığını belirtmişlerdir.

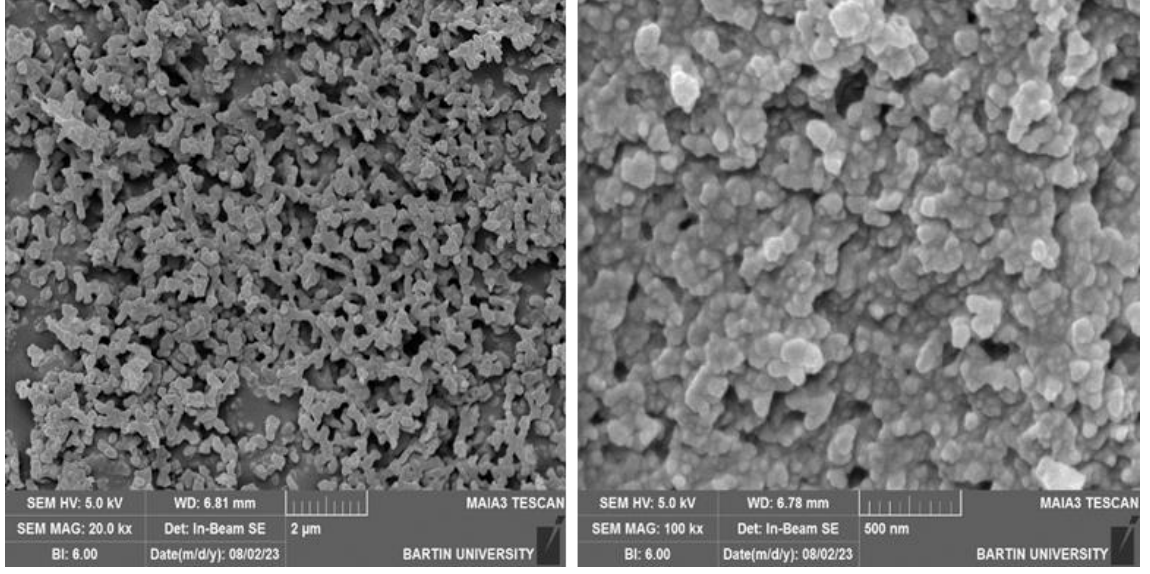
Lignin örneklerinin yüzey morfolojisi ve tane çapları, biyomateryal uygulamasında son derece önemli rol oynamaktadır. Lignin görüntüleri SEM ile farklı boyutlarda görüntüleri alınmıştır.



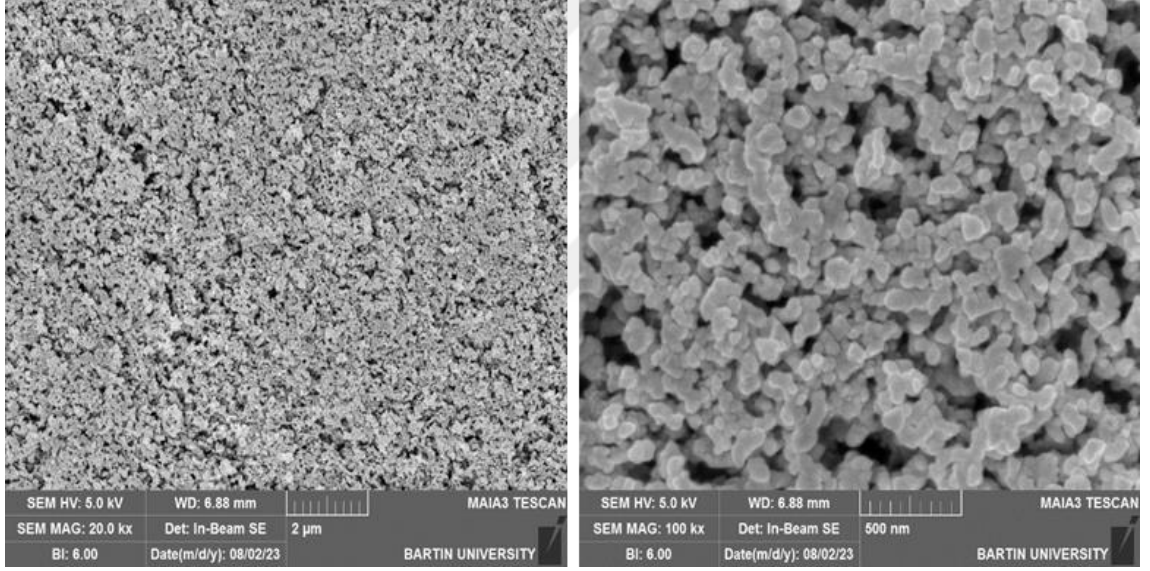
Şekil 3. 7: DK Göknarı LZK örnekleri SEM görüntüleri



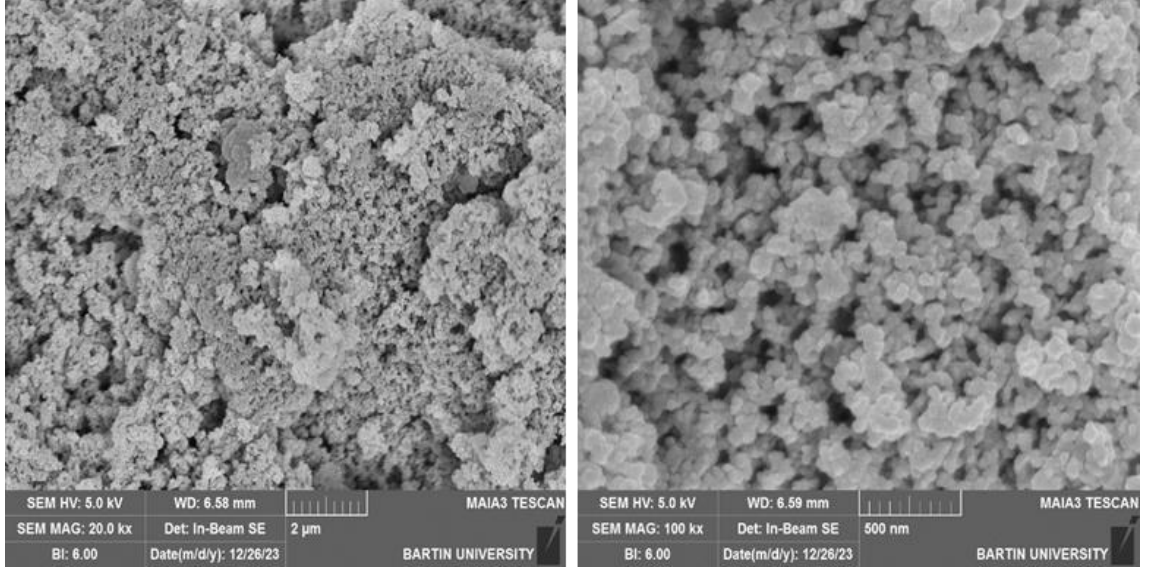
Şekil 3. 8: Toros Sediri LZK örnekleri SEM görüntüleri



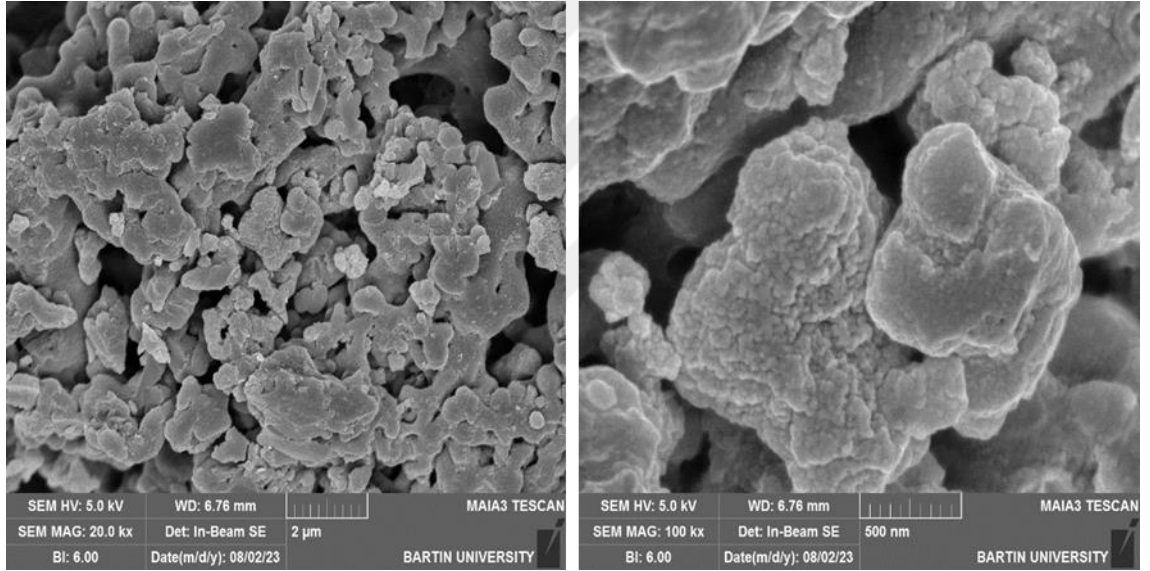
Şekil 3. 9: Doğru Ladini LKZ örnekleri SEM görüntüleri



Şekil 3. 10: Fıstık Çamı LKZ örnekleri SEM görüntüleri



Şekil 3. 11: DK Göknarı kraft lignin örnekleri SEM görüntüleri



Şekil 3. 12: Ticari kraft lignin örnekleri SEM görüntüleri

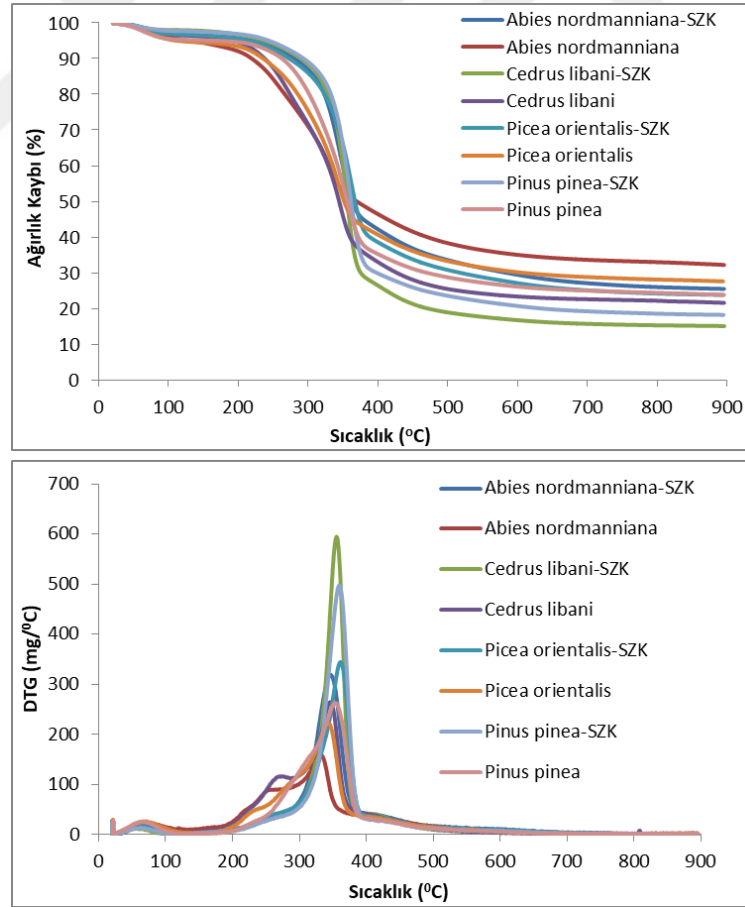
Şekil 3.7-3.12’te gösterildiği gibi, ligninlerin morfolojisi birbirine benzer olup, örneklerin yüzeyleri birbirine bağlı farklı boyutlarda benzer küresel ve toplanmış morfoloji göstermiştir. Bu veriler Li vd. (2021) bambu örneğinde kolin klorür ve hazırlamış oldukları DÖÇ ile yaptıkları çalışmayla uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni, hidrofilik gruplardan (OH ve COOH) ve hidrofobik aromatik kısımlarından oluşan ligninin kendi kendine birleşme yoluyla lignin nanoparçacıkları oluşturabilmesi olabilir (Ma vd., 2020).

Cassoni vd., (2022) üzüm saplarını alkali (NaOH) ve DÖÇ (kolin klorür: laktik asit) ile muamele ederek lignin elde etmiş ve SEM analizi yapmışlardır. Her iki lignin fraksiyonu da

morfolojik olarak benzer ve nispeten düzgün ve pürüzsüz bir yüzeye sahip çok yüzlü bir şekle sahip olduğu gözlenmiştir. Parçacıkların boyutu da yaklaşık 500 µm civarındadır. Bu nedenle, bu çalışmada ekstraksiyon yöntemlerinin ligninlerin morfolojisini etkilemediği görülmüştür. Yue vd. (2020), yaptıkları çalışmada alkali (K_2CO_3 -Gliserol) ve DÖÇ (kolin klorür: laktik asit) kullanarak buğday samanından lignini ekstrakte etmiştir. DÖÇ ligninin alkali lignine göre tekdüze ve pürüzsüz bir morfolojiye ve çok daha küçük boyutlu sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

3.2.3. TGA Analiz Bulguları

Farklı kozalak türleri ve DDÖÇ ile muamele edilerek elde edilen SZK örneklerinin azot atmosferinde termal davranışları TGA ve DTG kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.4 ve Şekil 3.13’de verilmiştir. DTG eğrileri, termal bozunma sırasında kütle kaybı hızını gösterir.



Şekil 3. 13: Kontrol ve SZK örneklerinin TGA ve DTG eğrileri

TG ve DTG eğrilerinde ilk kütle kaybı, nemin uzaklaştırılması nedeniyle yaklaşık 60 °C ile 100 °C arasında gerçekleşmiştir. Selüloz ve hemiselülozlar, 200 °C -380 °C aralığında hızlı bir şekilde azalmıştır. Hemiselüloz, termal bozunma sırasında deasetilasyon yoluyla asetik asit oluşturmuştur (Bianchi vd.. 2010). Selülozun bozunması, dehidrasyon, dekarboksilasyon, oksidasyon, hidroliz ve serbest radikal oluşumu yoluyla uçucu yanıcı bileşenlerin üretilmesine yol açmıştır. Serbest radikaller, hidrojen peroksit, karboksil ve karbonil gruplarının üretimine yol açmış ve bu gruplar termal bozunmadan sorumlu olmuştur (Junges vd.. 2019). Ligninin bozunması yaklaşık 200 °C’de başlamış, ancak kütle kaybı geniş bir sıcaklık aralığında gerçekleşmiştir. Selüloz ve hemiselülozun maksimum bozunma sıcaklıklarından daha yüksek sıcaklıklarda geçekleşmekte olup, lignin yavaş yavaş parçalanarak ortamdaki uzaklaşır. Diğer taraftan SZK örnekleri işlem görmemiş örneklerle oranla lignin ve hemiselüloz oranı daha az olmasından dolayı 200°C görülmeye başlanan hemiselülozun ve özellikle 400°C sonrasında görülen piklerin bu nedenden dolayı daha zayıf olduğu görülmektedir. Literatürde benzer üç aşamalı termal bozunma süreçleri ortaya konmuştur (Popescu vd., 2011; Altay vd., 2024).

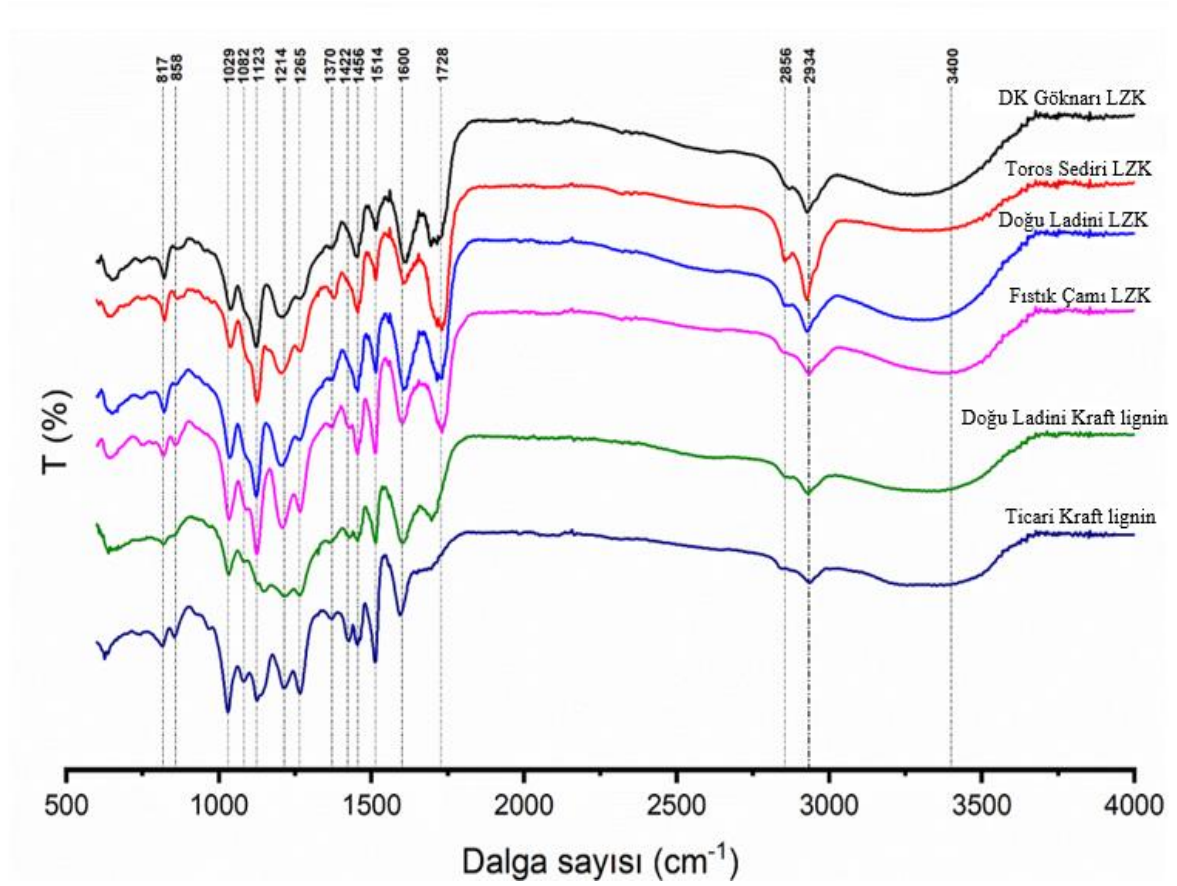
Tablo 3. 4: $T_{i\%}$ (% 10 Ağırlık Kaybındaki Sıcaklık) ve $T_{max\%}$ (%50 Ağırlık Kaybındaki Sıcaklık) ve TGA analizi sonucunda kalan kütle miktarı

	$T_{i\%}$ (°C)	$T_{max\%}$ (°C)	Kalan Kütle (%)
DK Göknarı SZK	279	362	25,47
DK Göknarı	219	369	32,19
Toros Sediri SZK	289	355	15,05
Toros Sediri	233	344	21,57
Doğu Ladini SZK	272	366	23,79
Doğu Ladini	235	351	27,57
Fıstık Çamı SZK	293	355	18,19
Fıstık Çamı	262	361	23,78

$T_{i\%}$ değerleri 219 °C ile 293 °C sıcaklık aralığında bulunmuştur. $T_{max\%}$ değerleri ise 344 °C ile 369 °C arasında bulunmuştur. 900 °C’deki termal bozunma sonucunda en fazla kalan kütle, %32,19 ile DK Göknarı’dır. TGA analizi sonucunda en az kalan kütle ise %15,05 ile Toros Sediri SZK’dır. Selülozca zengin kısımlardan oluşan örneklerin kalan kütle miktarları kontrol örneklerine göre daha düşüktür. Bunun da başlıca nedeni SZK örneklerini hazırlanırken bir kısım ligninin yapıdan uzaklaşmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü, lignin selüloz ve hemiselüloza göre ısı bozunmaya daha dirençlidir (Burhenne vd., 2013).

3.3.2. FT-IR Analiz Bulguları

DDÖÇ muamelesiyle elde edilen LZK, kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerinin FT-IR spektrumları Şekil 3.14’de gösterilmiştir. FT-IR spektrumları ligninlerin saflığının yanı sıra kimyasal yapısını da yansıtmaktadır. Spektrumlarda her bir lignine özgü ortak özelliklerin yanı sıra belirli titreşimler de bulunur. Farklı literatür kaynaklarından yararlanılarak (Boeriu vd., 2004; Horikawa vd., 2019; Ibrahim vd., 2019) elde edilen lignin için önemli dalga boyları, fonksiyonel gruplar ve titreşim türleri, tez kapsamında çalışılan lignin örnekleriyle karşılaştırmalı olarak Tablo 3.5’te verilmiştir.



Şekil 3. 14: Ligninlerin FT-IR spektrumları

Tablo 3. 5: Lignin örneklerine ait FT-IR analiz sonuçları (cm⁻¹)

Fonksiyonel gruplar/titreşim türleri	Dalga sayısı (cm ⁻¹)	DK Göknarı LZK	Toros Sediri LZK	Doğu Ladini LZK	Fıstık Çamı LZK	Doğu Ladini Kraft lignin	Ticari kraft lignin
O-H gerilmesi	3450-3400	3400	3400	3400	3400	3400	3400
C-H gerilmesi (CH ₃ ve CH ₂ grupları)	2960-2925	2929	2930	2929	2935	2933	2934
C-H titreşimleri (OCH ₃)	2865-2840	2863	2856	2856	2855	2855	2846
C=O gerilmesi (keton, karbonil, karboksil, asetil ve ester grupları)	1750-1720	1728	1736	1732	1728	1701	1700
C-C gerilmesi (aromatik iskelet)	1600	1608	1608	1608	1600	1600	1596
C-C gerilmesi (aromatik iskelet)	1515-1500	1514	1514	1514	1514	1514	1514
C-H deformasyonu (asimetrik -CH ₃ ve -CH ₂)	1460	1458	1456	1458	1458	1456	1456
Düzlemsel C-H ile aromatik iskelet titreşimleri	1425	-	-	-	1422	1422	1422
Alifatik C-H gerilmesi (metil ve fenolik OH)	1373-1358	1370	1376	1370	1370	1370	1370
G halkasındaki C=O gerilmesi	1265-1261	1265	1265	1265	1265	1265	1265
C-C+C-O+C=O gerilmesi	1219-1203	1206	1206	1206	1210	1214	1214
Düzlemsel deformasyondaki guayasil ünitelerindeki C-H bozulmaları ve C-O gerilmesi	1138-1122	1123	1124	1123	1126	1123	1127
Düzlemsel deformasyondaki Aromatic C-H	1030	1037	1037	1037	1035	1031	1029
G ünitelerinde 2, 5 ve 6 pozisyonlarda düzlem dışı C-H	860-852	858	858	858	858	858	858
G ünitelerinde 2, 5 ve 6 pozisyonlarda düzlem dışı C-H	818-806	820	820	820	817	817	817

Aromatik ve alifatik OH gruplarına 3400 cm⁻¹ civarında ortaya çıkan geniş ve yayvan bir absorpsiyon bandı görülmektedir. Bu bant tüm ligninlerde görülse de DK Göknarı, Doğu Ladini ve Fıstık Çamı ligninlerinde daha belirgindir. 2935 cm⁻¹ ile 2846 cm⁻¹ arasındaki bölgedeki absorpsiyon bantları metil, metilen ve metoksil gruplarındaki C-H gerilmesine bağlanmaktadır. Horikawa vd. (2019), 1730 cm⁻¹ bulunan piklerin hemiselüloz C=O gerilmesi olarak belirtmiştir. DDÖÇ LZK örneklerinde 1736 cm⁻¹ ile 1728 cm⁻¹ arasındaki absorpsiyon pikleri belirgindir. Bu bantlar keton, karbonil karboksil, asetil ve ester grupları gerilmesiyle ilişkilendirilebilir. Bu da elde edilen ligninlerin safsızlığının hemiselülozlardan

kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca bu ligninlerin 1718 cm^{-1} ile 1701 cm^{-1} arasındaki ikinci küçük piklerin varlığı görülmüştür. Kraft ligninde bu pik 1701 cm^{-1} de ve ticari kraft ligninde ise 1700 cm^{-1} bandında belli belirsiz yayvan olarak belirlenmiştir.

Tüm lignin örnekleri fenilpropan (C9) iskeletinin tipik aromatik halka titreşimlerine atfedilen 1600 cm^{-1} ve 1515 cm^{-1} civarında soğurma bantları göstermiştir. 1460 cm^{-1} civarındaki soğurma bandı metil, metilen ve metoksil gruplarında C-H deformasyonuna atfedilir. Fıstık Çamı, kraft lignin ve ticari kraft ligninde 1425 cm^{-1} bandı görülmüşken, DK Gökarnı, Toros Sediri ve Doğu Ladini ligninlerinde görülmemiştir. Bu bant düzlemsel C-H ile aromatik iskelet titreşimleri meydana gelmektedir. G halkasındaki C=O gerilmesi 1265 cm^{-1} bandı tüm ligninlerde görülmüştür fakat Fıstık Çamı ve ticari kraft ligninde pikler çok daha belirgindir. Spektrumdaki 1270 cm^{-1} ve 1117 cm^{-1} civarındaki absorpsiyon bandı, sırasıyla ikincil bir alkolün C-O gerilme titreşimine ve siringilin düzlem deformasyonlarındaki aromatik C-H'ye atfedilebilir. 1220 cm^{-1} civarında sunulan absorpsiyon bandı, siringil (S) ve guayasilde (G) C-O gerilmesine atanmıştır; bu aynı zamanda siringil ve guayasilde fenolik hidroksil grubunun ve eterin varlığını da gösterir. DDÖÇ ligninlerde bu bant çok belirginken kraft ligninlerde yayvan olduğu belirlenmiştir. 1030 cm^{-1} civarındaki absorpsiyon bandı, guayasil'in aromatik C-H düzlem içi deformasyonuna karşılık gelir. Düzlem dışındaki aromatik C-H, tüm lignin türlerinde benzer pikler vermiştir.

3.3.4. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) Bulguları

Teknik ligninin moleküler kütle dağılımının incelenmesi, ligninin reaktivitesinin ve fizikokimyasal özelliklerinin daha iyi anlaşılması için gereklidir (Al-Zagameem, 2020). Farklı lignin örneklerinin moleküler ağırlık dağılımı GPC ile tahmin edilmiştir. Ağırlık ortalaması (Mw) ve ortalama sayı (Mn) moleküler ağırlıkları ve polidispersite indeksi (Mw/Mn) değerlendirilmiş, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft lignin örnekleri ile karşılaştırılmıştır. Tablo 3.6, jel permeasyon kromatografisi (GPC) ile analiz edilen ve ortalama moleküler ağırlık (Mn), ağırlık ortalamalı moleküler ağırlık (Mw) ve polidispersite indeksi (PDI) ile temsil edilen ligninin moleküler kütle dağılımını özetlenmiştir. Mw değerleri 4900 ile 2400 g/mol arasında değişmektedir. DDÖÇ ile elde edilen LZK örneklerinin ve Doğu Ladini kraft lignin örneğinin PDI değeri, ticari kraft lignin örneğinden düşük olduğu tespit edilmiştir. En yüksek PDI değeri ticari kraft ligninin (4,00) en düşük ise

Doğu Ladini kraft ligninin (2,35) olduğu görülmüştür. Genellikle ligninin moleküler ağırlığı 1000-20.000 g/mol aralığında değişir (Doherty vd., 2011). Ligninin işlenmesi sırasında daha düşük molekül ağırlıklı parçalara ayrılır. Bu parçalar aynı zamanda ligninin fizikokimyasal özelliklerini de önemli ölçüde etkiler. Ligninin polidispersite indeksi (PDI), yani moleküler ağırlık dağılımının genişliği, kullanılacağı alanlarda önemli bir rol oynar (Jönsson vd., 2008).

Tablo 3. 6: Lignin örneklerine ait GPC analizi sonuçları

Örnek	M _w (g/mol)	M _n (g/mol)	PDI
DK Göknarı LZK	4300	1525	2.82
Toros Sediri LZK	3500	1104	3.17
Doğu Ladini LZK	5600	2171	2.58
Fıstık Çamı LZK	4900	1400	3.50
Doğu Ladini kraft lignin	2400	1021	2.35
Ticari kraft lignin	4200	1050	4.00

Kammoun vd., (2021) DÖÇ1 (ChCl-oksalik asit), DÖÇ2 (ChCl laktik asit) ve DÖÇ3 (ChCl-üre) ile alfa yaprağı, badem çekirdeği kabuğu, halep çamı kozalağı, Posidonia yaprağı ve pirinayı mikrodalga reaktöründe yaptıkları çalışmada moleküler ağırlıkları ve PDI değerlerini de tespit etmişlerdir. Elde edilen lignin örneklerinin Mw değerleri 48123 g/mol ile 147233 g/mol; PDI değerleri 1,5-2,7 arasında değişmektedir. Halep çamı kozalağının DÖÇ1, DÖÇ2 ve DÖÇ3 ile elde ettikleri Mw değerleri sırasıyla 34013 g/mol, 55513 g/mol ve 46409 g/mol; PDI değerleri sırasıyla 1,9, 2,6 ve 2,2 olarak tespit edilmiştir. Yapılan bu tez kapsamındaki çalışılan kozalak örneklerinin Mw çok daha düşük olup, PDI değerleri LZK örnekleriyle benzer olup kraft lignin örneğinkinden düşük olduğu belirlenmiştir.

Ponomarenko vd., (2015) çeşitli kaynaklardan ve biyokütle kimyasal işlemenin farklı süreçlerinde elde edilen toplamda 50 farklı ticari ligninin SEC, Py-GC/MS ve antioksidan aktivitesi gibi çeşitli yapısal ve aktivite özellikleri analiz edilmiştir. İncelenen ligninler ortalama moleküler kütleyle göre yüzlerce ila neredeyse 40 bin Da arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada üç lignin ekstraktı karşılaştırılmış (alkali, ticari kraft lignin ve DÖÇ ile elde edilmiş lignin). Hem alkali hem de kraft lignini alkali muameleye maruz kaldığından benzer sonuçlar gözlemlenmiştir (sırasıyla Mw: 29333 ± 7426 g/mol ve 26873 ± 7380 g/mol;

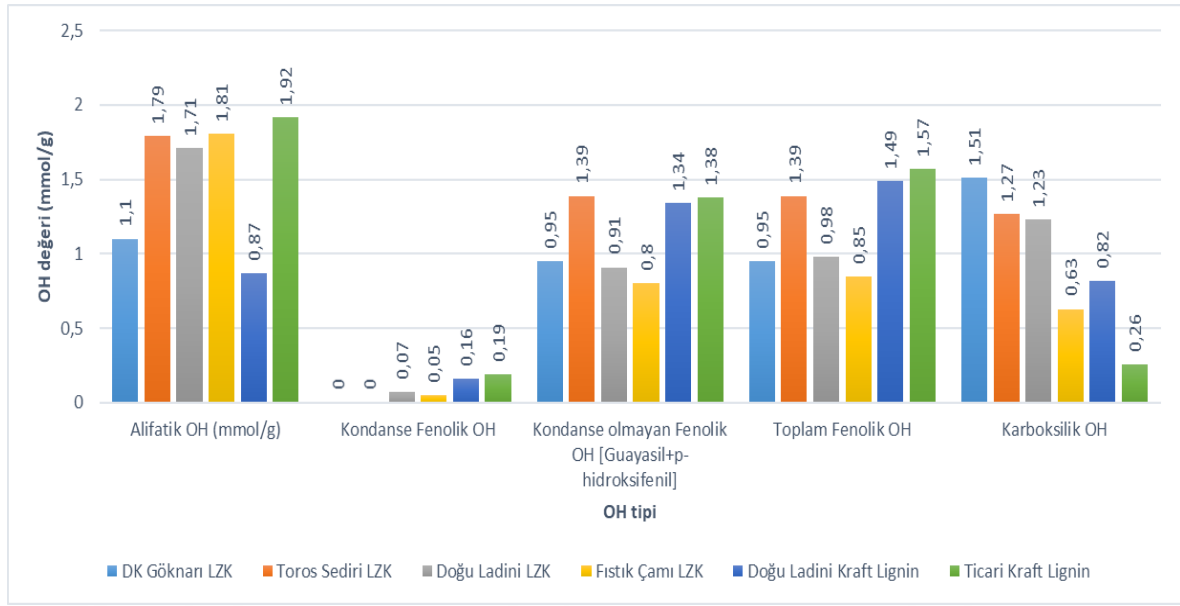
sırasıyla Mn: 23018 ± 7315 g/mol ve 21771 ± 5977 g/mol). DÖÇ ligninine ilişkin olarak molekül ağırlığı alkali ligninden daha yüksek (Mw: 38725 ± 2669 g/mol; Mn: 31144 ± 2081 g/mol) bulunmuştur. Sonuçlar ekstraksiyon koşullarının belirli bir dereceye kadar ligninlerin moleküler ağırlık dağılımını etkileyebileceğini göstermiştir. Polidispersite indeksi tüm numuneler için nispeten düşük (AAL $1,29 \pm 0,01$, DÖÇ $1,24 \pm 0,01$ ve Kraft lignin $1,23 \pm 0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Cassoni vd., 2022).

Zhou vd., (2024) yaptıkları çalışmada kavaktan farklı yöntemlerle DÖÇ ((kolin klorür (ChCl), etilen glikol (EG) ve 4-klorobenzen sülfonik asitten (4-Cl-BSA)), KOH (potasyum hidroksit) ve KOH-DÖÇ lignin elde edip enzimatik asidoliz lignini (EMAL) üretmişlerdir. EMAL-Ham Mw'si yaklaşık 9485 g/mol iken; EMAL-DÖÇ değerinin yaklaşık iki katı kadar yüksek olduğu; bu, önemli ölçüde depolimerizasyonun lignin izolasyonu sırasında meydana geldiğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, EMAL-KOH'un Mw'sinin (10210 g/mol) EMAL-Ham'inkinden biraz daha yüksek olduğu bulunmuştur; bu durum, KOH muamelesi sırasında ligninin küçük molekül ağırlıklı bölümünün sızmasından kaynaklanmış olabileceği vurgulanmıştır.

Wu vd., (2021) *Cunninghamia lanceolate* yongalarına DÖÇ (kolin klorür:laktik asit) ve öğütülmüş odun (MWL) lignini elde etmişlerdir. Lignin makromolekülleri ötektik çözücülerin etkisi altında daha düşük moleküllere parçalanmıştır. DÖÇ-Lignin'in Mw ve Mn'si 1967 g/mol ve 1261 g/mol olup, MWL'den (sırasıyla 5817 g/mol ve 4308 g/mol) çok daha düşüktü. Ayrıca DÖÇ-Lignin ve MWL'nin polidispersite indeksi (PDI) sırasıyla $1,56$ ve $1,35$ idi. DÖÇ-Lignin'in polidispersitesi MWL'ninkinden biraz daha yüksek bulunmuştur, ancak her iki lignin numunesi de biyolojik uygulamalar için kolaylık sağlayabilecek dar bir moleküler ağırlık dağılımına ($PDI < 2.0$) sahip olduğu belirtilmiştir.

3.3.5. ^{31}P NMR Bulguları

DDÖÇ muamelesiyle elde edilen LZK, kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerinin fonksiyonel grubu ayırt etmek için önceki yayınlara göre kantitatif ^{31}P NMR teknolojisi uygulanmıştır (Argyropoulos vd., 2021). ^{31}P NMR analiz sonuçları Şekil 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3. 15: ^{31}P NMR analiz sonuçları

Analiz sonuçlarına göre en yüksek toplam fenolik OH (1,57 mmol/g), en yüksek alifatik OH (1,92 mmol/g) ve en düşük karboksilik OH (0,26 mmol/g) ticari kraft lignininde tespit edilmiştir. DK Göknaarı LZK ve Toros Sediri LZK örneklerinde kondanse fenolik OH bulunamamıştır. Doğu Ladini kraft lignin en düşük alifatik OH (0,87 mmol/g), Fıstık Çamı LZK ise en düşük toplam fenolik OH (0,85 mmol/g) değerine sahiptir.

Argyropoulos vd., (1993) odunlardan izole edilen ve hamurlaştırma ve kağıt yapım sürecinden türetilen ligninlerdeki hidroksil gruplarını belirlemek için ^{31}P NMR kullanarak öncü çalışmalar gerçekleştirmiştir. Bu metodolojinin edinim koşulları ve lignin yapı birimlerinin sinyal atamaları, lignin model bileşikler kullanılarak geliştirilmiştir. Uygun fosfor reaktifleri ile alifatik, karboksilik, guayasil, siringil, p-hidroksifenil birimleri, katekoller ve C5 pozisyonunda karbon ikameli guayasile ait lignindeki farklı hidroksil grupları, ^{31}P NMR spektroskopisi ile kolayca ölçülebileceğini göstermişlerdir. Hidroksil grupları, özellikle serbest fenoksi grupları, ligninin fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkileyen en önemli işlevselliklerden biridir ve bu işlevsel gruplar, birimler arası bağların kopmasını teşvik etmek için ligninin reaktivitesini tanımlamada önemli bir rol oynar.

Pu vd., (2011) yaptıkları bir çalışmada iğne yapraklı, yapraklı ve otsu bitkilere ait olan çeşitli biyokütle kaynaklarından elde edilen lignin örneklerinin ^{31}P NMR analizlerini özetlemişlerdir. ^{31}P NMR verilerine göre, iğne yapraklı ağaçtan izole edilen ligninin

hidroksil içeriği alifatik OH > fenolik OH > karboksilik OH sırasına sahip olduğunu göstermiştir. İğne yapraklı ağaç ligninindeki başlıca fenolik hidroksillerin, az miktarda p-hidroksifenil içeren guayasil fenolikleri olduğu görülmüştür. Siringil fenolikleri genellikle iğne yapraklı ağaç lignininde tespit edilmezken, C5 ikameli guayasil fenolikleri ³¹P NMR kullanılarak iğne yapraklı ağaç lignininde gözlemlenmiştir.

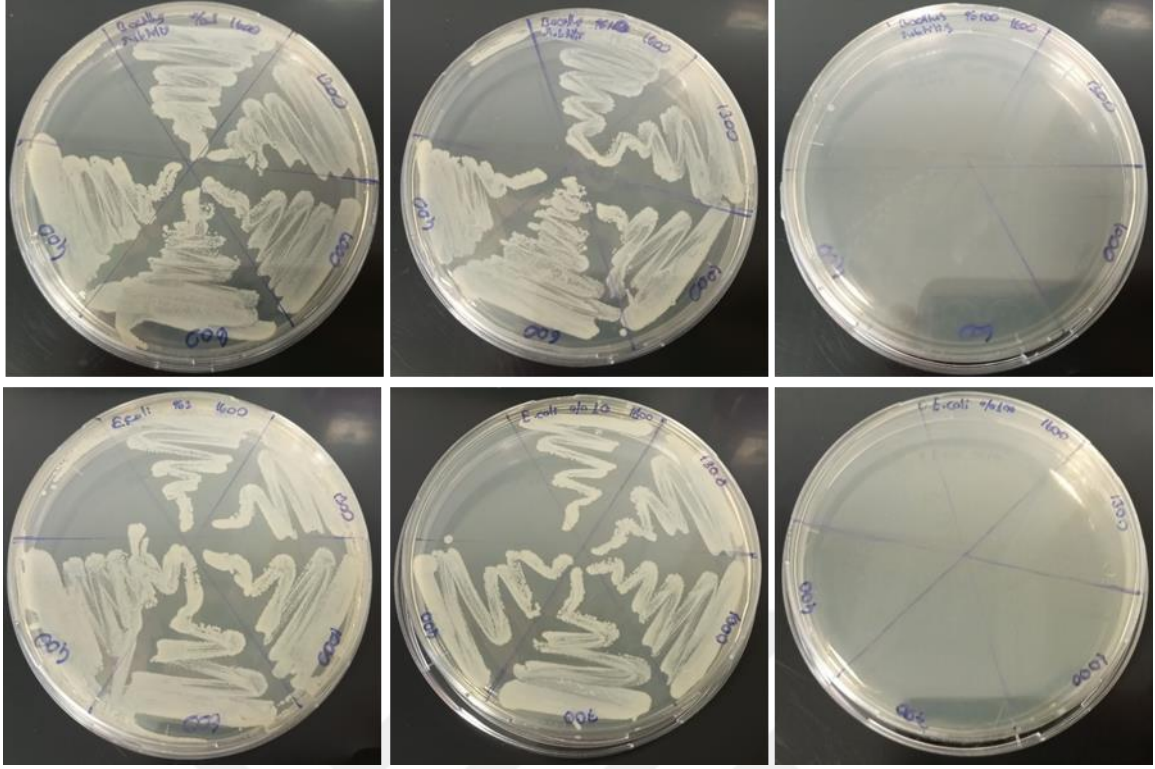
Yang vd., (2022) kavak odununa hidrotermel muamele uygulanmış daha sonra hidrotermal muameleli örneklerle DÖÇ (kolin klorür:etilen glikol:AlCl₃) muamele uygulamışlardır. Kontrol örneği olarak çift enzimatik lignin (DEL) örneği kullanmışlardır. DÖÇ lignin fraksiyonlarındaki farklı fenolik OH gruplarının miktarının DEL'dekinden daha fazla olduğunu; bu da entegre işlemin gözle görülür β-O-4 bağlantılarının bölünmesiyle sonuçlandığını ve bunun da daha fazla COOH ve fenolik OH gruplarının oluşmasına yol açtığını ortaya koymuşlardır.

3.4. Biyolojik Aktivite Sonuçlarına Ait Bulgular

Biyolojik aktiviteye ait bulgular antibakteriyel, antioksidan ve antikolinesteraz aktivite kısımlarından oluşmaktadır.

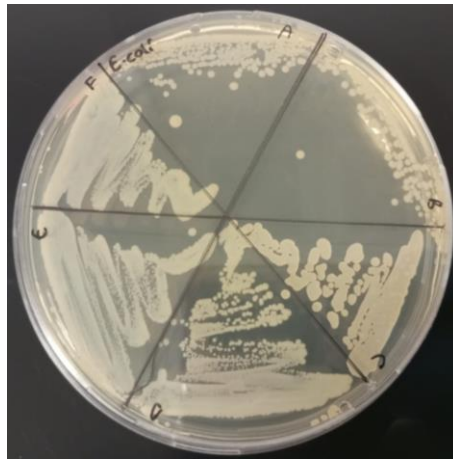
Ligninin organik çözücüler içindeki çözünürlüğü net değildir ve kimyasal yapı, molekül ağırlığı ve lignin moleküllerindeki hidrofilik kısımların varlığı gibi birçok değişkene bağlıdır (Shukry vd., 2008). Farklı türlerden elde edilmiş ligninlerin çözünürlüğünü test etmek için farklı çözücüler kullanılmıştır. Bu denemelerde dimetil sülfoksit ve piridin çözücülerinde ligninlerin tamamen çözündüğü, diğer çözücüler de ise kısmen çözündüğü tespit edilmiştir (Shukry vd., 2008; Sameni vd., 2017; Alzagameem vd., 2019). Antibakteriyel analizlerin ön denemelerinde literatürde yapılmış çalışmalar dikkate alınarak öncelikle lignin örneği DMSO da çözündürülerek gerçekleştirilmiştir (Alzagameem vd., 2019; Xu vd., 2021; Dong vd., 2011; Gordobil vd., 2018; Kaur vd., 2017)

İlk deneme ticari olarak temin edilen ticari kraft lignin 2 mg/ml olacak şekilde farklı DMSO konsantrasyonlarında (%3, %10 ve %100) çözündürülmüş ve *B. subtilis* ile *E. coli* üzerinde test edilmiştir. Şekil 3.16'da görüldüğü gibi %3 ve %10'luk DMSO'da bakterilerin büyümesi gözlenirken %100 DMSO kullanılan testte gözlenmemiştir.



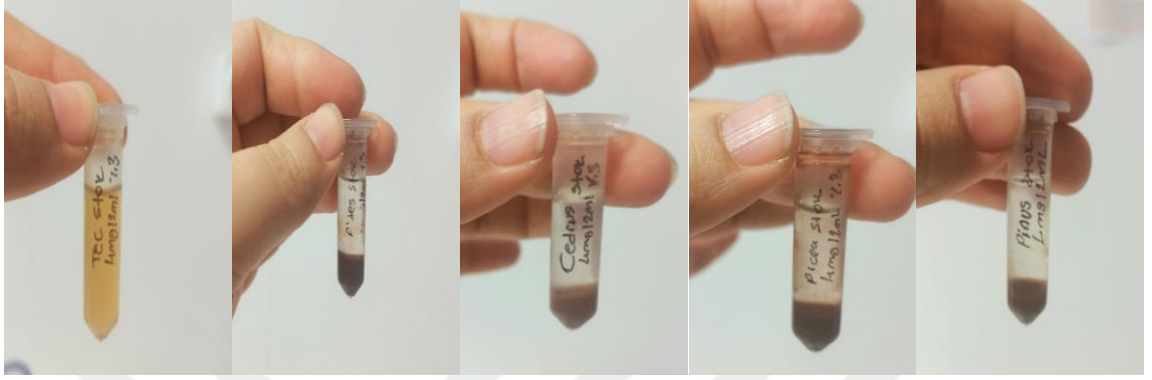
Şekil 3. 16: Ticari kraft ligninin %3, %10 ve %100 DMSO'da *B. Subtilis* ve *E. coli* üzerine etkisi

Kontrol olarak sadece DMSO nun farklı konsantrasyonlarının (%5, %10, %15, %20, %25 ve %30) *E. coli* üzerinde test edilmiştir. DMSO'nun *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkisi %15 ve üzerinde konsantrasyon arttıkça etkisinin arttığı görülmüştür (Şekil 3.17) Bu deneyler DMSO'nun çalışılan bakteriler üzerinde etkisi olduğu, lignin etkisinin çalışılan konsantrasyonlarda olmadığı sonucuna varılmasına sebep olmuştur.



Şekil 3. 17: DMSO'nun *E. coli* üzerinde etkisi (DMSO konsantrasyonları A:%30; B:%25; C:%20; D:%15; E:%10; F:%5)

Bazı çalışmalarda DMSO'nun % 10'nun üzerinde toksik olduğu ve genellikle %2'nin altında güvenli olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Kirkwood vd., 2018; Saral vd., 2019; Summer vd., 2022). %3 DMSO çözücüsünde ticari kraft lignin ve LZK örnekleri çözülmüştür fakat LZKlar daha sonra çökelmiştir.



Şekil 3. 18: %3 DMSO'da lignin çözünürlüğü a) ticari kraft lignin b) DK Göknaarı LZK c) Toros Sediri LZK c) Doğu Ladini LZK d) Fıstık Çamı LZK

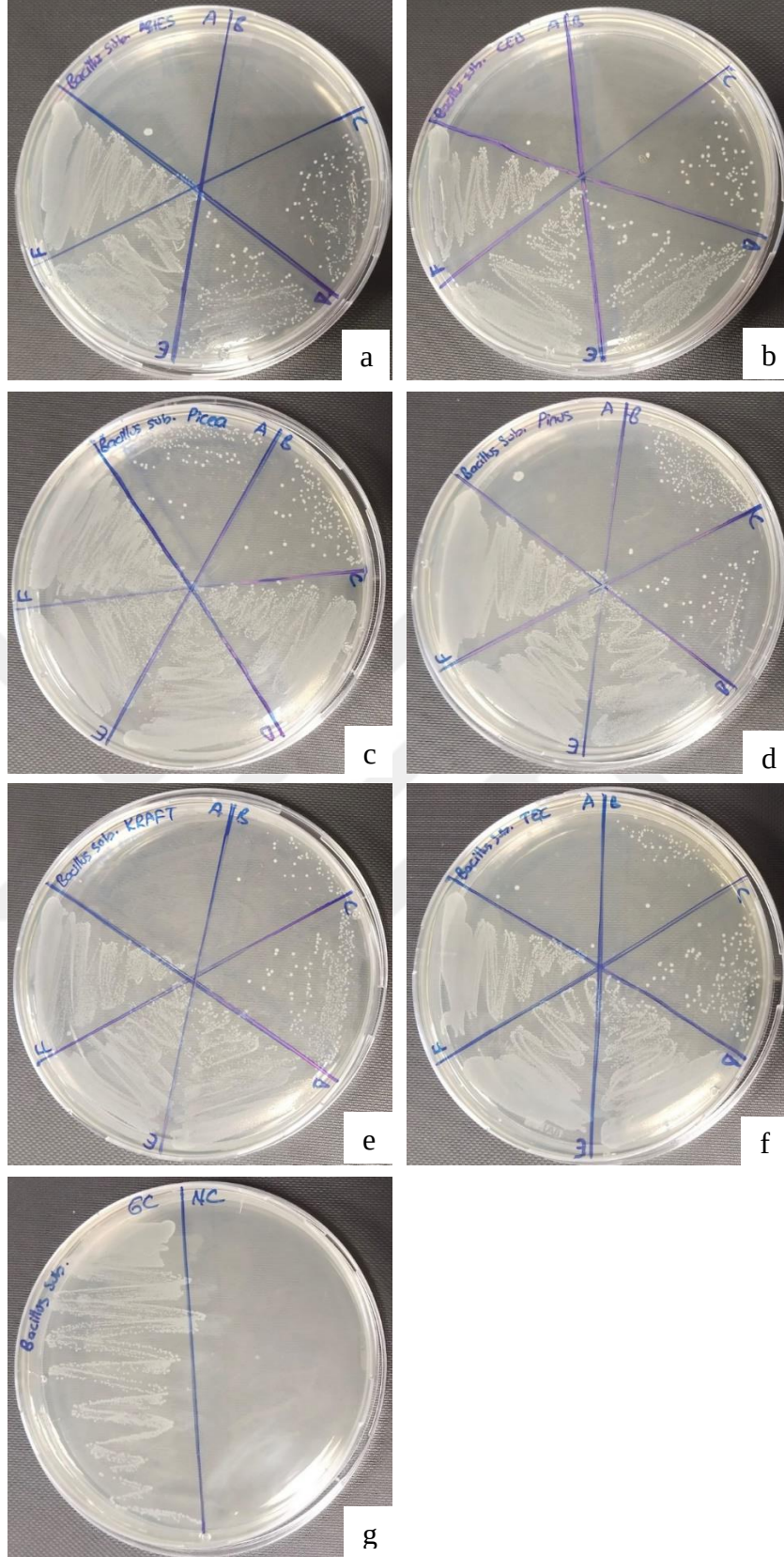
Bu veriler ışığında lignin örnekleri etil alkol ile çözülmüştür ve çözünürlük oranları aşağıdaki Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3. 7: Ligninlerin etil alkolde çözünürlükleri (mg/ml)

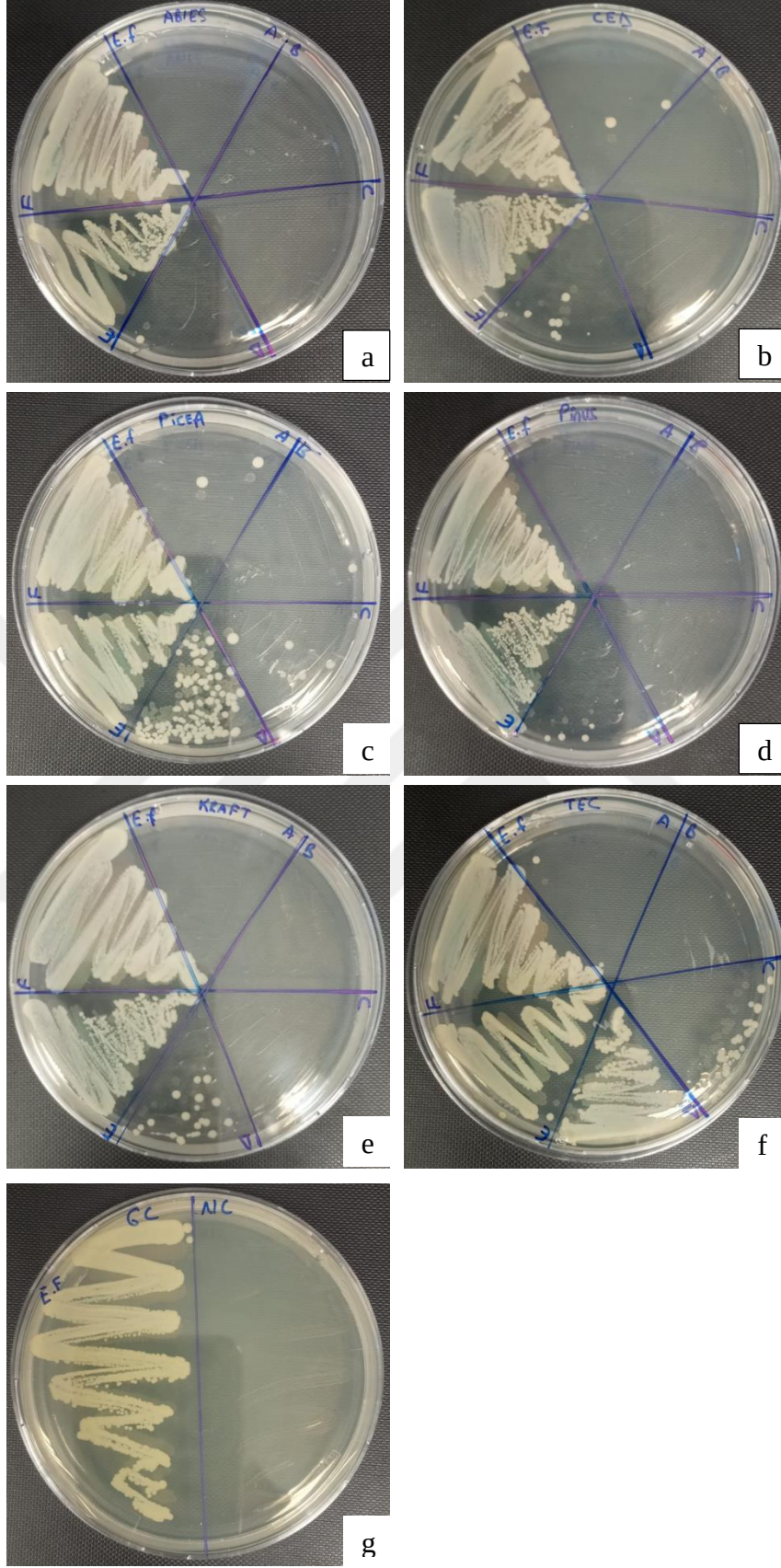
Örnek	Çözünürlük
DK Göknaarı LZK	8,47
Toros Sediri LZK	8,28
Doğu Ladini LZK	8,8
Fıstık Çamı LZK	5,7
Doğu Ladini kraft lignin	7,13
Ticari kraft lignin	4,09

3.4.1. Antibakteriyel Aktivite Bulguları

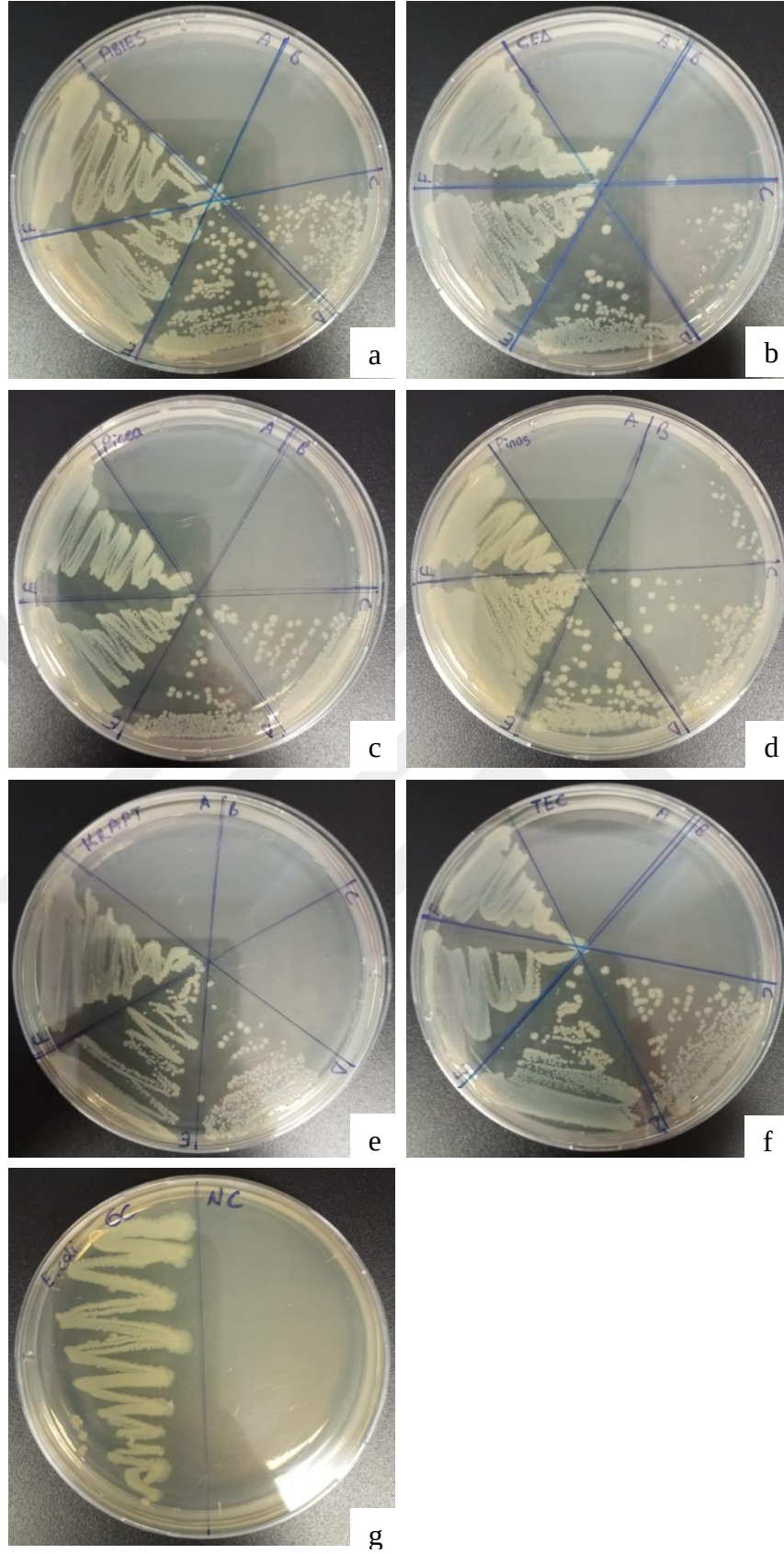
Elde edilen lignince zengin kısımların, kraft lignin ve ticari kraft ligninin antibakteriyel aktiviteleri Gram (-) (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) ve Gram (+) (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) olmak üzere 4 farklı bakteri suşu üzerinde test edilmiştir.



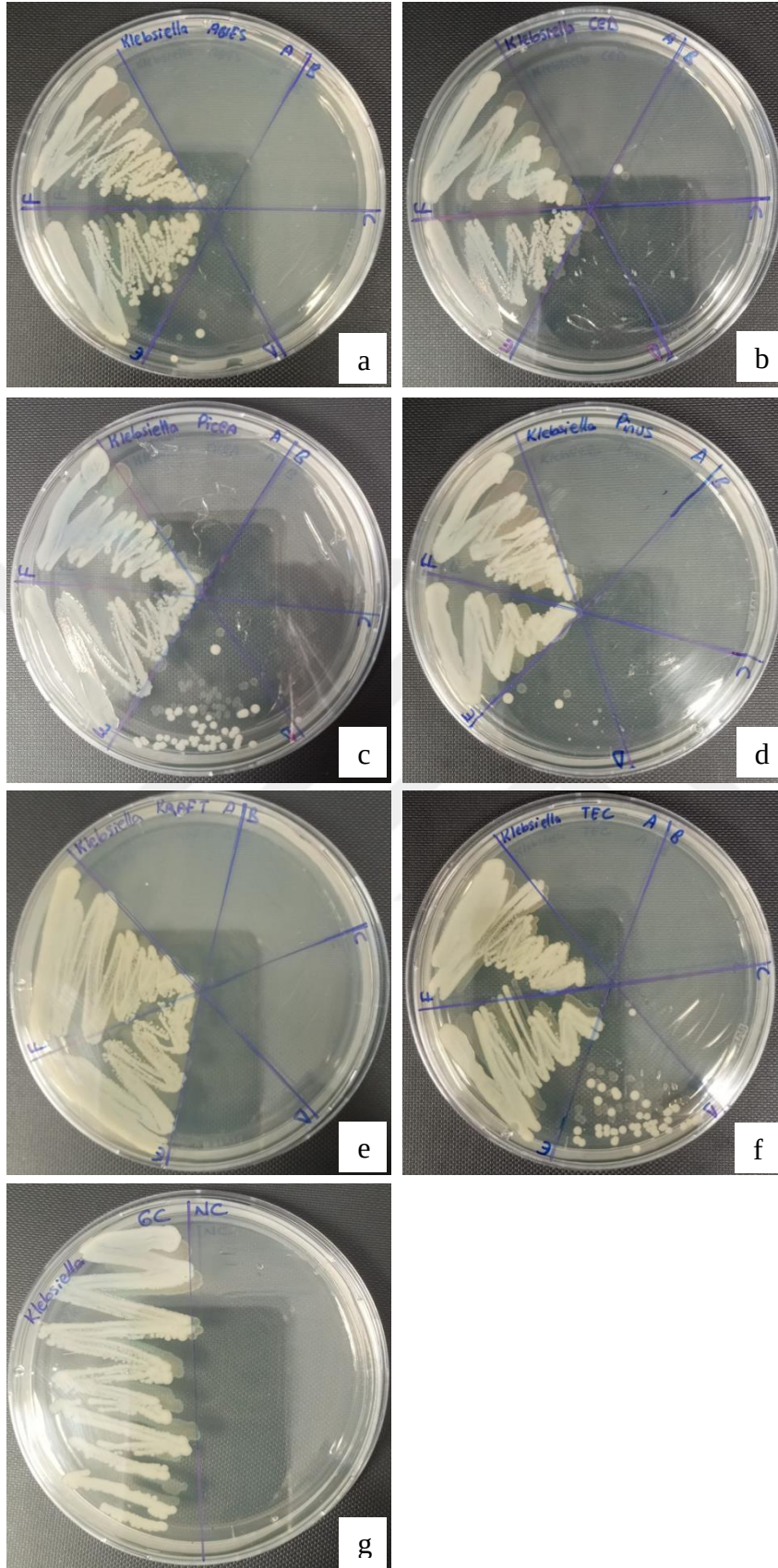
Şekil 3. 19: a) DK Göknaı LK b) Toros Sediri LK c) Doğu Ladini LK d) Fıstık Çamı LK e) Doğu Ladini kraft lignin f) Ticari kraft lignin örneklerinin *Basillus subtilis* üzerine etkisi g) *Basillus subtilis* pozitif ve negatif kontrol



Şekil 3. 20: a) DK Göknarı LZK b) Toros Sediri LZK c) Doğu Ladini LZK d) Fıstık Çamı LZK e) Doğu Ladini kraft lignin f) Ticari kraft lignin örneklerinin *Enterococcus faecalis* üzerine etkisi g) *Enterococcus faecalis* pozitif ve negatif kontrol



Şekil 3. 21: a) DK Göknaı LZW b) Toros Sediri LZW c) Doğu Ladini LZW d) Fıstık Çamı LZW e) Doğu Ladini kraft lignin f) Ticari kraft lignin örneklerinin *Escherichia coli* üzerine etkisi g) *Escherichia coli* pozitif ve negatif kontrol



Şekil 3. 22: a) DK Göknarı LZK b) Toros Sediri LZK c) Doğu Ladini LZK d) Fıstık Çamı LZK e) Doğu Ladini kraft lignin f) Ticari kraft lignin örneklerinin *Klebsiella pneumoniae* üzerine etkisi g) *Klebsiella pneumoniae* pozitif ve negatif kontrol

Tablo 3. 8: Lignin örneklerinin minimum inhibitör kapasitesi (mg/mL).

		DK Göknarı	Toros	Doğu	Fıstık	Doğu	Ticari
Lignin örnekleri		LZK	Sediri	Ladini	Çamı	Ladini	Kraft
			LZK	LZK	LZK	Kraft	lignin
						lignin	
Mikroorganizma		MİK	MİK	MİK	MİK	MİK	MİK
Gram (+)	<i>Bacillus subtilis</i>	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,1	0,15	0,2	0,15	0,15	0,2
Gram (-)	<i>Escherichia coli</i>	0,2	0,2	0,2	0,3	0,15	0,2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,15	0,1	0,15	0,15	0,1	0,15

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu

Elde edilen LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft ligninin test edilen mikroorganizmalara etkilerinin minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) Tablo 3.8’de verilmiştir. Tüm örnekler Şekil 3.19-3.22’de görüldüğü gibi hem gram negatif hem de gram pozitif bakteriler üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir. Minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) ise *Basillus subtilis* bakterisi için DK Göknarı LZK ve Toros Sediri LZK 0,2 mg/mL, Doğu Ladini LZK 0,4 mg/mL, Fıstık Çamı LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft lignin için 0,3 mg/mL olarak tespit edilmiştir. *Enterococcus faecalis* bakterisi için MİK değerleri DK Göknarı LZK 0,1 mg/mL, Toros Sediri LZK, Fıstık Çamı LZK, Doğu Ladini kraft lignin 0,15 mg/mL, Doğu Ladini LZK ve ticari kraft lignin 0,2 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre *Enterococcus faecalis* bakterisi için en etkili antibakteriyel DK Göknarı LZK olduğu belirlenmiştir. *Escherichia coli* bakterisi için Fıstık Çamı LZK en yüksek MİK değerine (0,3 mg/mL), Doğu Ladini kraft ligninin en düşük MİK değerine (0,15 mg/mL) sahip olduğu, diğer örneklerin ise MİK değerlerinin 0,2 mg/mL olduğu tespit edilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* bakterisi için Toros Sediri LZK ve Doğu Ladini kraft lignin örneklerinin MİK değerlerinin 0,1 mg/mL olduğu ve diğer lignin örneklerinin MİK değerlerinin 0,15 mg/mL olduğu belirlenmiştir. Birçok çalışmada ligninin gram negatiflere karşı antibakteriyel etkisinin zayıf olduğu belirtilse de (Alzagameem vd., 2019;Dong vd.,

2011; Morena vd., 2022; Zhang vd., 2022) bu çalışmada kozalak lignin örneklerinin gram negatiflere karşı da etkili olduğu bulunmuştur. Fakat etkinliğin gram boyama ile arasında bir korelasyon bulunamamıştır.

Yapılan literatür araştırmalarında DÖÇ ile elde edilmiş lignin örneklerinin antibakteriyel analizlerine rastlanılmamıştır.

Gordobil vd., (2018) ladin (iğne yapraklı ağaç) ve okaliptüs (geniş yapraklı ağaç) organosolv ve kraft işlemleri olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanarak lignin elde etmişlerdir. Gıda bozucu ve insan patojen bakterileri (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus microbilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus thuringiensis*, *Salmonella enterica* serotip *typhmurium* ve *Streptococcus mutans* A), lignin örneklerinin (organosolv ladin (OS), kraft ladin (KS), organosolv okaliptus (OE), Kraft okaliptüs (KE) antibakteriyel özelliklerini değerlendirmek için elde edilen bu ligninler kullanılmıştır. Test edilen lignin örneklerinin tümü, incelenen bakterilere karşı antibakteriyel etkinlik sergilemiştir. KS lignini (*E. coli* (17.72 ± 1.16 mm), *P. microbilis* (19.12 ± 1.22 mm), *P. vulgaris* (24.68 ± 1.31 mm), *P. aeruginosa* (21.89 ± 1.26 mm), *E. aerogenes* (18.97 ± 1.08 mm), *S. aureus* (19.18 ± 0.98 mm) ve *B. thuringiensis* (24.76 ± 1.19 mm)), test edilen KE ligninine karşı daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Buna karşılık, KE lignini, *S. typhmurium* (33.36 ± 1.42 mm) ve *S. mutans* (17.03 ± 1.05 mm) mikroorganizmasına karşı KS lignininden daha yüksek antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Öte yandan OS lignini (*E. coli* (13.32 ± 1.01 mm), *P. microbilis* (18.15 ± 1.04 mm), *P. vulgaris* (17.91 ± 0.96 mm), *E. aerogenes* (16.45 ± 0.98 mm) ve *B. thuringiensis* (18.36 ± 1.09 mm)), test edilen OE lignin numunesine karşı daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Ayrıca OE lignini (*S. typhmurium* (28.92 ± 1.36 mm), *P. aeruginosa* (16.10 ± 1.06 mm), *S. aureus* (17.88 ± 0.97 mm) ve *S. mutans* (15.66 ± 0.92 mm)), OS lignin formuna karşı daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Hemen hemen benzer bakteri kültürünün ladin ligninlerine (KS ve OS) karşı benzer duyarlılık gösterdiği elde edilmiştir. Genel olarak kraft ligninlerinin (KS ve KE) antimikrobiyal aktivitesi organosolv ligninlerden (OS ve OE) çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tüm testlerde, yalnızca solvent (DMSO) içeren kontrol diski, $1,2 \pm 0,06$ mm inhibisyon bölgesi oluşturmuştur. Kraft ligninlerinin (KS ve KE) antimikrobiyal aktivitesinin, test edilen hemen hemen tüm mikroorganizmalara karşı yaygın olarak kullanılan antibiyotikten (gentamisin) daha yüksek olduğu kaydedilmiştir.

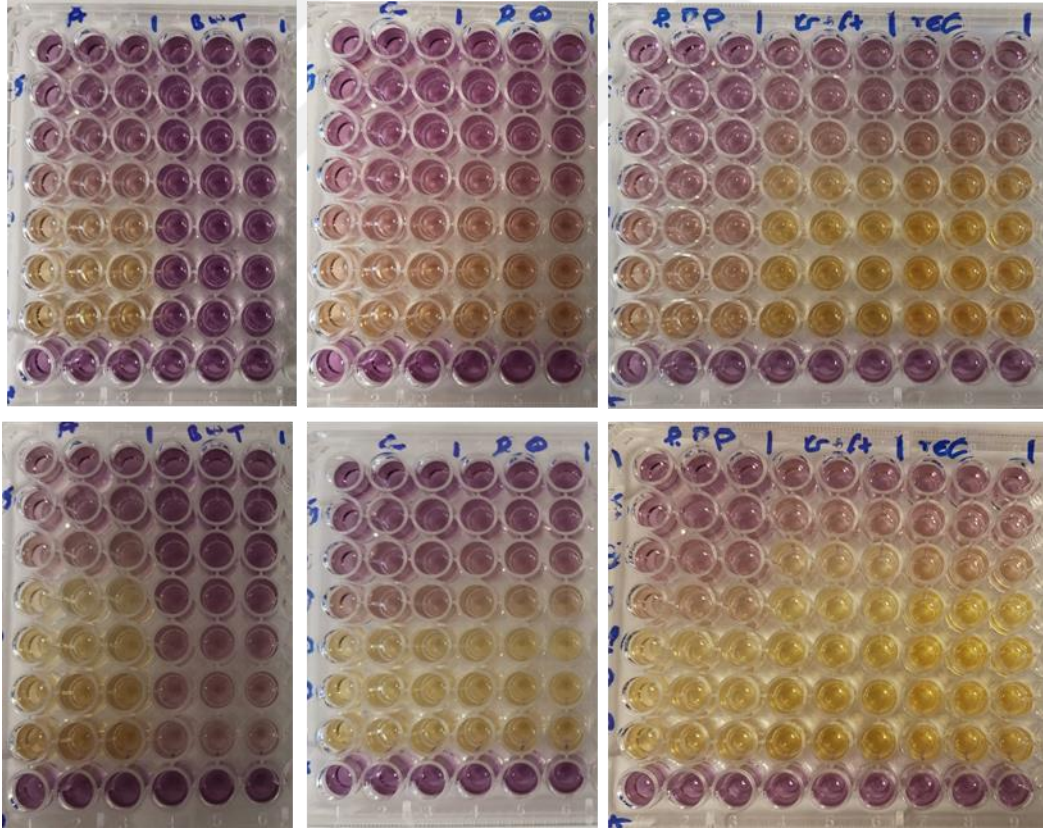
Biyokütle olarak asma kullanılan bu çalışmada geleneksel NaOH ve DÖÇ (kolin klorür/laktik asit ChCl-LA, kolin klorür/laktik asit ve potasyum karbonat/etilen glikol ChCl-LA ve K₂CO₃-EG) ile muameleye tabi tutulmuş, üç farklı lignin elde edilmiştir. Karboksimetil selüloz filmlerine dahil edilerek film özellikleri üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. CMC-NaOH, CMC-ChCl-LA ve CMC-ChCl-LA&K₂CO₃-EG lignin filmlerinin gram pozitif bakterilere (*Bacillus subtilis*) ve gram negatif bakterilere (*Escherichia coli*) karşı antibakteriyel etkileri, kontrol olarak kullanılan CMC filmi (boş) ile değerlendirilmiştir. CMC filminin (boş) inhibisyon bölgeleri 0,96 cm ve 0,88 cm olarak tespit edilmiş; bu, her iki bakteri türüne karşı önemli bir antibakteriyel aktivite olmadığını göstermiştir. Buna karşılık CMC-ChCl-LA&K₂CO₃-EG lignin filmi, *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* için sırasıyla 1,37 cm ve 1,48 cm'lik inhibisyon bölgeleriyle en iyi antibakteriyel etkiyi sergilemiştir. Sırasıyla 1,03 cm, 1,14 cm, 1,10 cm ve 1,32 cm inhibisyon bölgelerine sahip olan CMC-NaOH lignin ve CMC-ChCl-LA lignin filminin inhibisyon bölgelerinden daha iyi antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmüştür (Zhu vd., 2024).

Lourençon vd., (2021) yaptıkları çalışmada, sıralı asit çöktürme yoluyla farklı pHlarda (pH 9, 7, 5 ve 3) parçalanmış okaliptüs kraft ligninini kullanarak antioksidan, antibakteriyel ve antitümör aktivitelerine ilişkin testler ile karakterize edilmiştir. Yüksek verimli fraksiyonlar 9 ve 7'nin antibakteriyel aktiviteleri beş bakteriye karşı değerlendirilmiştir: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis* ve *Bacillus cereus*. Ligninler mikroorganizmalara bağlı olarak farklı tepkiler göstermiştir. Her iki fraksiyon da standart antibiyotik amoksisilin ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlarla *B. cereus* üzerinde inhibisyona neden olurken, DMSO bu spesifik bakterinin büyümesini değiştirmemiştir. *P. aeruginosa* ve *S. aureus* için lignin fraksiyonlarının neden olduğu inhibisyon DMSO ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. *E. coli* ve *S. enteritidis* için test edilen lignin fraksiyonları bakteri üremesini engellememiştir. *E. coli* üzerinde DMSO tarafından gözlenen büyüme inhibisyonu, lignin fraksiyonlarının varlığında gözlenmemiştir. Bakterilerin lignin ile doğrudan temas halinde olduğu farklı bir yaklaşım, ligninin minimum inhibitör konsantrasyonunu (MİK) değerlendirilmiştir. Genel olarak, iki lignin fraksiyonu, test edilen tüm bakterilere karşı minimum bir inhibitör konsantrasyon sergilemiştir. Gram-negatif bakteriler *E. coli* ve *S. enteritidis* en dirençli bakteriler ve lignin fraksiyonlarında en yüksek MİK'lere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, kullanılan fraksiyona bağlı olarak etkinlikte farklılıklar olduğu görülmüştür. Lignin fraksiyonu 9, *E. coli*'de (12,5 mg.mL⁻¹) en

yüksek MİK değerine sahipken, lignin fraksiyonu 7, *S. enteritidis*'te (12,5 mg.mL⁻¹) en yüksek MİK değerine sahip olduğu belirlenmiştir.

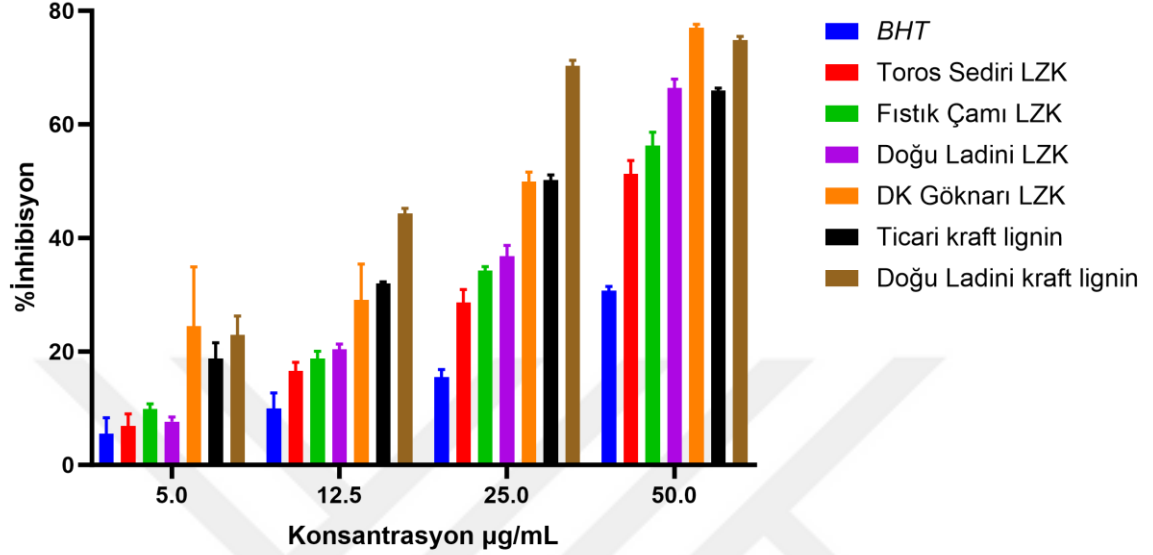
3.4.2. Antioksidan Aktivite Bulguları

LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerinin antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH serbest radikal giderme yöntemi kullanılmıştır. Lignin örneklerinin antioksidan aktivitesini değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılan ticari antioksidanlardan biri olan BHT kontrol olarak kullanılmıştır. DPPH radikalinin çözeltisi mor rengindedir ve hidrojen donörüyle reaksiyona girdiğinde soluk sarıya dönüşür. Absorbanstaki azalma antioksidan konsantrasyonuna doğrusal olarak bağlıdır (Gupta, 2015). Yapılan bu çalışmada Şekil 3.23'de görüldüğü inkübasyon öncesinde mor renk inkübasyon sonrasında sarı renge dönüşmüştür ve her lignin örneğinde farklılıklar gözlenmiştir.



Şekil 3. 23: a) İnkübasyon öncesi b) inkübasyon sonrası LZK, Kraft lignin ve ticari Kraft lignin mikroparka görüntüleri

Ligninin antioksidan aktivitesi, DDÖÇ lignininin antioksidan alanda katma değerli uygulamaları için gereklidir. Ayrıca bu örneklerin DPPH radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon olarak hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 3.24’de verilmiştir.



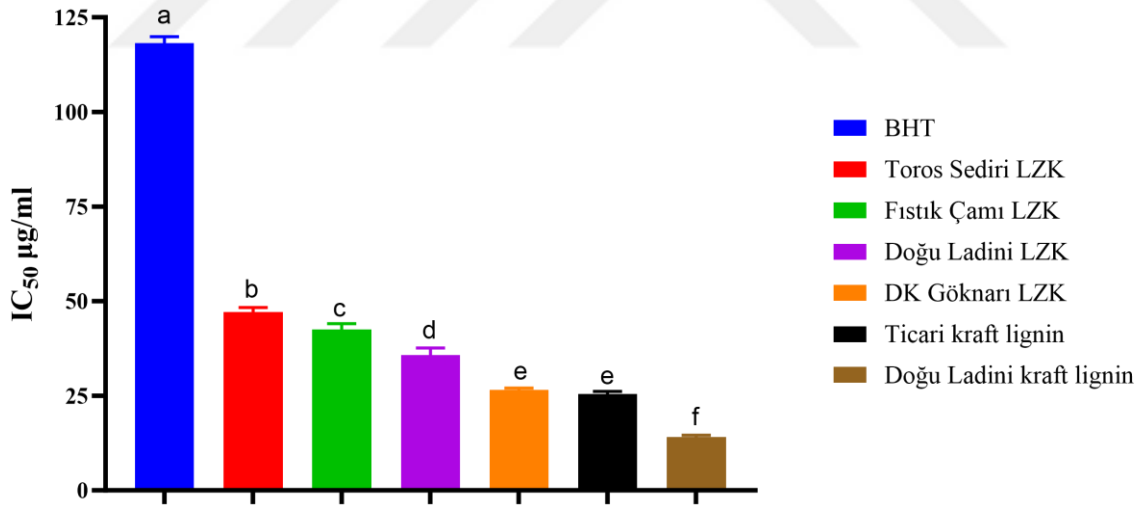
Şekil 3. 24: LZK, ticari kraft lignin ve Doğu Ladini kraft lignin % inhibisyon değerleri

Şekil 3.24’de görüldüğü üzere BHT örneğinin % inhibisyon değerleri %5,15-30,69 aralığında, Toros Sediri LZKnın %6,86-51,28 aralığında, Fıstık Çamı LZKnın %9,85-56,27 aralığında, Doğu Ladini LZKnın %7,63-66,41 aralığında, ticari kraft lignin %18,73-65,96 aralığında, DK Göknaı LZKnın %24,43 -77,04 aralığında ve Doğu Ladini kraft lignininin %22,94-74,85 aralığında olduğu tespit edilmiştir. 4 farklı konsantrasyon çalışılmış olup, konsantrasyon arttıkça inhibisyon değerinin arttığı görülmüştür.

Fenolik bileşiklerin serbest radikalleri etkili bir şekilde nötralize edebileceği belirli bir konsantrasyon aralığı vardır. Belirli bir konsantrasyonun üzerinde, antioksidan aktivitelerinde bir plato veya azalma olabilir. Yüksek konsantrasyonlarda, fenolik bileşiklerin pro-oksidan etki göstermesi olasılığı da vardır, bu da toplam antioksidan kapasitesinin azalmasına yol açabilir (Halliwell, 2007; Serdar vd., 2019; Shahidi ve Zhong, 2015).

Tablo 3. 9: LZK, ticari kraft lignin ve Doğu Ladini kraft lignin IC₅₀ değerleri

Lignin örnekleri	IC ₅₀ (µg/mL)
BHT	118,12±1,77 ^a
Toros Sediri LZK	47,11±1,20 ^b
Fıstık Çamı LZK	42,59±1,50 ^c
Doğu Ladini LZK	35,72±1,91 ^d
DK Gökmar LZK	26,55±0,48 ^e
Ticari kraft lignin	25,39±0,76 ^e
Doğu Ladini kraft lignin	14,08±0,52 ^f



Şekil 3. 25: Lignin örneklerinin IC₅₀ değerleri

Elde edilen % inhibisyon verileri kullanılarak Graphpad prism 10 programı ile IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. IC₅₀ değeri, antioksidan maddenin %50 inhibisyon sağladığı konsantrasyonu gösteren bir parametre olup, daha düşük IC₅₀ değerleri daha yüksek antioksidan aktiviteye işaret etmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen IC₅₀ değerleri, örneklerin antioksidan kapasitesini karşılaştırmak ve değerlendirmek için kullanılmıştır. Şekil 3.25’de görüldüğü

gibi standart olarak kullanılan BHT sentetik antioksidanın IC_{50} değeri $118,12 \pm 1,77 \mu\text{g/mL}$ olup en yüksek değerdir. Test edilen tüm örneklerin IC_{50} değerinin BHT den düşük olduğu, antioksidan aktivitesinin fazla olduğu belirlenmiştir. IC_{50} değeri en düşük $14,08 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ Doğu Ladini kraft ligninin olduğu, yani en yüksek antioksidan etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

İstatistiksel analiz, LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerinin antioksidan aktiviteleri arasında istatistiki açıdan fark olup olmadığını belirlemek için IC_{50} verilerine göre Graphpad prism 10 programında varyans analizleri (ANOVA) ve Tukey testi kullanılarak %95 güven düzeyinde yapılmıştır. Analiz sonucuna göre karşılaştırma grupları arasındaki niteliklerin ortalama değerlerindeki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermek için küçük harfler kullanılmıştır ($P < 0,05$). Tablo 3.9 ve Şekil 3.25’de görüldüğü gibi lignin örnekleri ve BHT arasında anlamlı farklılıklar olduğu fakat DK Göknaı LZK ve ticari kraft lignin arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Lignin, hidroksil ve metoksi fonksiyonel gruplarına sahip aromatik halkalar içeren, karmaşık bir kimyasal yapıya sahip, heteropolimerik aromatik bir bileşiktir. Bu fonksiyonel grupların varlığı nedeniyle oksidasyon yayılma reaksiyonu hidrojen bağış yoluyla sonlandırılabilir. (Kai vd., 2016). Daha yüksek anti-oksidatif etkinlik için lignin, daha yüksek miktarda fenolik hidroksil ve metoksi grupları, daha düşük miktarda alifatik hidroksil grupları, dar polidispersite ve daha düşük moleküler ağırlık gerektirir. Antioksidan aktiviteye katkıda bulunabilecek diğer faktörler arasında fenilpropan birimlerinin bağıl içeriğı, yan zincirlerin α -pozisyonunda CH_2 gruplarına sahip fenilpropan birimleri ve yan zincirlerde oksijen içeren gruplara sahip fenilpropan birimlerinin yanı sıra π -konjuge sistemlerinin boyutu yer almaktadır. Ayrıca yüksek moleküler ağırlık, artan heterojenlik ve polidispersite ise radikal süpürme aktivitesini azaltan faktörler arasında yer almaktadır (Dizhbite vd., 2004; Ponomarenko vd., 2015; Ugartondo vd., 2008).

Bu tez çalışmasında ^{31}P NMR, GPC analizleri ile antioksidan verileri karşılaştırıldığında ise bazı farklılıklar belirlenmiştir. Toplam fenolik OH en yüksek ($1,57 \text{ mmol/g}$) ticari kraft ligninde tespit edilmesine rağmen Doğu Ladini kraft lignin örneğinin IC_{50} değerinden daha fazla olduğu antioksidan aktivitesinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Doğu Ladini kraft ligninin toplam fenolik OH değerinin yüksek ($1,49 \text{ mmol/g}$) ve en düşük alifatik OH ($0,87 \text{ mmol/g}$) olmasının yanı sıra en düşük moleküler ağırlığı (2400 g/mol) ve en düşük PDI

değerine (2,35) sahip olması nedeniyle en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Toros Sediri LZK örneğinin ise toplam fenolik OH değerinin (1,39 mmol/g) yüksek olmasına rağmen en düşük antioksidan aktivite gösteren lignin olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeninin ise yüksek alifatik OH (1,79 mmol/g), yüksek karboksilik OH (1,27 mmol/g) ve yüksek PDI değerinden (3,17) olduğu bulunmuştur. Doğu Ladini LZK ve Doğu Ladini kraft lignin karşılaştırıldığında Doğu Ladini LZK örneğinin düşük toplam OH (0,98 mmol/g), yüksek alifatik OH (1,71 mmol/g), yüksek karboksilik OH (1,23 mmol/g), yüksek Mw değeri (5600 g/mol) ve yüksek PDI (2,58) değerine sahip olduğu için Doğu Ladini kraft ligninden daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca FTIR analizinde LZK örneklerinde 1730 cm^{-1} dalga sayısında belirgin pikler görülmüştür. Bu pikler C=O gerilmesine (keton, karbonil, karboksil, asetil ve ester grupları) aittir ve kraft lignin örneklerde bu pik yayvan ve belli belirsiz olarak 1700 cm^{-1} dalga sayısında görülmüştür. Fenoliklerin radikal gücü sadece fenoksil radikalinin oluşumuna değil aynı zamanda stabilitesine de bağlıdır. Bununla birlikte, karbonil grubunun antioksidan aktivite üzerinde olumsuz bir etkisi vardır. Yüksek karbonhidrat içeriği gibi safsızlıklar, lignin ile hidrojen bağı oluşumunu engellediği için serbest radikal oluşumunu engelleyerek antioksidan aktiviteyi olumsuz etkiler (Gordobil vd., 2018).

Gordobil vd., (2018) ladin ve okaliptüs odunlarından kraft ve organosolv lignin elde etmişlerdir. Elde etikleri lignin örneklerine GPC, NMR gibi analizler ile yapısal özellikleri belirlemişler ve antioksidan aktivitelerini tespit etmişlerdir. En düşük toplam fenolik OH (3,70 mmol/g) okaliptüs organosolv lignininde olmasına rağmen en düşük karboksilik OH (0,11 mmol/g) ve en yüksek metoksilik grup (1,19 mmol/g) olduğu için en yüksek antioksidan aktiviteyi ($IC_{50}=12,85\text{ }\mu\text{g/mL}$) sergilemiştir. Metoksil grupların ve konjuge çift bağların fenoksil radikallerin stabilitesini artırarak antioksidan etkisini artırdığı vurgulanmıştır. Ayrıca en yüksek toplam fenolik OH (5,79 mmol/g) ladin kraft ligninde olmasına rağmen yüksek alifatik OH (1,75 mmol/g), yüksek molekül ağırlığı ($M_w=7195\text{ g/mol}$) ve PDI (4,67) değerinden dolayı daha düşük antioksidan aktivite sergilediği belirtilmiştir.

Su vd., (2021) kavak odunundan kolin klorür (ChCl) ve laktik asiti (LA) farklı molar oranları (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 ve 1:10) kullanarak hazırladıkları DÖÇ ile $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarda 90 dakika süreyle muameleye tabi tutarak lignin elde etmişlerdir. Yapılan çalışmada sıcaklık ve DÖÇ'teki laktik asit oranı arttıkça katı kalıntı veriminin düştüğü, ligninlerin

delignifikasyon oranının arttığı görülmüştür. 110 °C de Ch:LA 1:2 mol oranı (La) ile 130 °C de Ch:LA 1:2 mol oranı (Lb) ve 1:10 mol oranı (Lc) ile elde edilen lignin örneklerinin çeşitli uygulamalarda bir antioksidan olarak nasıl işlev görebileceğini göstermek için bir DPPH radikal temizleme deneyi yapılmıştır. Tüm numunelerin temizleme aktivitesi artan lignin konsantrasyonu ile (konsantrasyon 0,013 g/L'den 0,10 g/L'ye arttıkça La, Lb ve Lc'nin temizleme aktivitesi sırasıyla %5'ten %60'a, %25'ten %86'ya, %27'den %71'e arttığı görülmüştür. La ve Lc ile karşılaştırıldığında Lb, 0,038 g/L'lik daha düşük bir IC₅₀ değerine sahip olduğu ve serbest radikalleri temizlemede daha yüksek performans gösterebileceğini belirtilmiştir. Lb örneğinin molekül ağırlığı ve PDI değerinin La örneğinden yüksek olmasına rağmen, toplam fenolik OH değerinin yüksek olmasından kaynaklanabileceği vurgulanmıştır.

Yang vd., (2022) hidrotermal muamelesinden sonra DÖÇ (kolin klorür:etilen glikol:AlCl₃) ile farklı sıcaklıklarda (130 °C, 140 °C ve 150 °C) 1 saat muamele sonrası elde ettikleri ligninin antioksidan aktivitesini değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılan ticari antioksidanlardan biri olan BHT kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm DÖÇ lignin fraksiyonlarının, endüstriyel antioksidan BHT'ninkinden (RSI = 2,4) önemli ölçüde daha yüksek DPPH antioksidan aktivitelerine (RSI = 17,79–30,21) sahip olduğu tespit edilmiştir. DÖÇ lignin fraksiyonlarının antioksidan aktiviteleri, artan muamele şiddetiyle birlikte artmıştır. ³¹P NMR sonuçlarına göre fenolik OH grupları içeriği en yüksek olan örnek L_{150-0.01} GPC analizine göre en düşük molekül ağırlık ve PDI değerine sahip olan örnek L_{130-0.005} olmasına rağmen antioksidan aktivitesi en yüksek L_{150-0.02} örneğinde bulunmuştur.

Kavak odununda molar oranın ve işlem süresinin lignin ekstraksiyonu üzerindeki etkisini araştırmak için işlem, 120 °C'de ve kolin klorür ve laktik asitten farklı molar oranlarda (1:4 ila 1:14) ve 6-16 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Molar oranı 1:4'ten 1:10'a çıkarılarak DÖÇ-Lignin verimi %24,6'dan %36,5'e yükselmiştir. Ancak 1:14'teki lignin verimi %30,1'a düşmüştür. Katı kalıntılar için bu oran 1:10 molar oranında %58,6 olarak tespit edilmiştir. Böylece, maksimum miktarda ligninin ekstrakte edilebilmesi ve katı kalıntının iyi bir şekilde muhafaza edilebilmesi nedeniyle 1:10 molar oranının öncelikli olduğu belirlenmiştir. Sürenin 6 saatten 12 saate çıkarılmasıyla lignin verimi %36,5'ten %80,4'e yükselmiş ve katı kalıntı verimi %61,2'den %42,3'e düşmüştür. Bununla birlikte, muamele süresinin daha da artması, lignin veriminde hafif bir artışla sonuçlanmıştır. İşlem süresinin 6 saatten 16 saate çıkarılmasıyla katı kalıntı verimi %35,3'e düşmüştür. Bu nedenle, 1:10

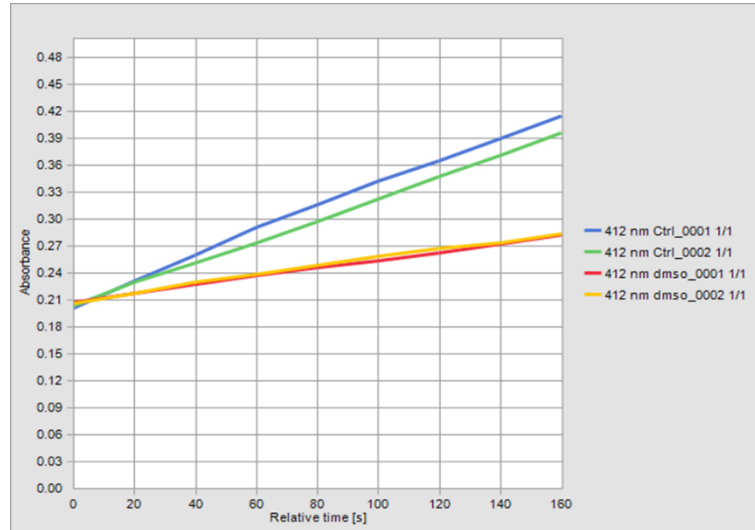
molar oranı ve 12 saatlik muamele süresi, uygun lignin arıtma koşulu olarak kabul edilmiştir. Lignoselülozun muameleini desteklemek için DÖÇ'lere fosfotungstik asit ($H_3O_{40}PW_{12}$) ve demir bromürün ($FeBr_3$) katı asitleri dahil edilmiştir. $H_3O_{40}PW_{12}$ ve $FeBr_3$ 'ün kullanımı, DÖÇ muamelesinden sonra materyalden lignin ekstraksiyonunun süresini belirgin bir şekilde kısaltmıştır. DÖÇ'lerde fosfotungstik asitin 4 saatte lignin verimi %82,2'ye, demir bromürün lignin verimi 8 saatte %80,9'e ulaşmıştır. Bunun olası nedeninin, katı asitli DÖÇ'lerin eter bağlarının bölünmesini teşvik edebilmesi, dolayısıyla DÖÇ'lerin ön muamelesini arttırabilmesi ve ligninin lignoselülozdan ayrılmasını daha da kolaylaştırabilmesi olduğu vurgulanmıştır. Bu nedenle, ön arıtma koşulları olarak DÖÇ-Lignin (12 saat), DÖÇ-W (4 saat) ve DÖÇ-Fe (8 saat) seçilmiştir. DÖÇ-Lignin, DÖÇ-W ve DÖÇ-Fe fraksiyonlarının antioksidan özellikleri, DPPH serbest radikalini temizleme kapasitesi olarak değerlendirilmiştir. Lignin konsantrasyonunun 0'dan 0,5 mg/ml'ye yükseltilmesiyle inhibisyon oranının arttığı belirlenmiştir. Lignin konsantrasyonu 0,05 mg/ml olduğunda DÖÇ-Lignin, DÖÇ-Fe ve DÖÇ-W örneklerinin inhibisyon oranları sırasıyla %37,2, %39,8 ve %42,6 idi. Lignin konsantrasyonu 0,5 mg/ml olduğunda DÖÇ Lignin, DÖÇ-Fe ve DÖÇ-W örneklerinin inhibisyon oranları sırasıyla %75,3, %76,6 ve %78,4 idi. Önceki çalışmalar, düşük IC_{50} değerlerine sahip iyi antioksidanların olduğunu bildirmiştir. Lignin örneklerinin IC_{50} 'si sırasıyla 0,086 mg/ml, 0,072 mg/ml ve 0,081 mg/ml idi. DÖÇ-Lignin ile karşılaştırıldığında DÖÇ-Fe ve DÖÇ-W'nin IC_{50} değerleri daha düşük; bu da asit katalizinden sonra elde edilen DÖÇ-Fe ve DÖÇ-W'nin DÖÇ Lignin'den daha iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca sonuçlar, tüm lignin örneklerinin BHA'dan ($IC_{50}=0,180$ mg/ml) önemli ölçüde daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ligninin molekül ağırlığı ne kadar küçük olursa spesifik yüzey alanı da o kadar büyük, PDI değeri ne kadar küçük olursa, ligninin kalitesi o kadar düzgün ve dağılım da o kadar konsantre olacağını dolayısıyla antioksidan etkisi daha avantajlı olacağını vurgulamışlardır. Fakat yaptıkları çalışmada DÖÇ-W ligninin M_w değeri en düşük olmasına rağmen en yüksek PDI değerine sahiptir (Wu vd., 2021a).

Wu vd., (2021b) yaptığı çalışmada *Cunninghamia lanceolata* odunundan, yüksek saflıkta lignini izole etmek ve antioksidan aktivitesini değerlendirmek için kolin klorür/laktik asit ($ChCl$:Laktik), $120\text{ }^{\circ}C$ 'de farklı molar oranlarda (1:2-1:12) ve sürelerde (4-24 saat), katı/sıvı oranı 1/30 (g/g) olacak şekilde uygulanmıştır. Molar oranın artmasıyla lignin verimi miktarı artarken, DÖÇ-Lignin verimi 1:10 mol oranında maksimuma ulaşmıştır. Lignin ve katı kalıntının verimi sırasıyla %61.23 ve %51.26 idi. Reaksiyon süresi 12 saate uzatıldığında

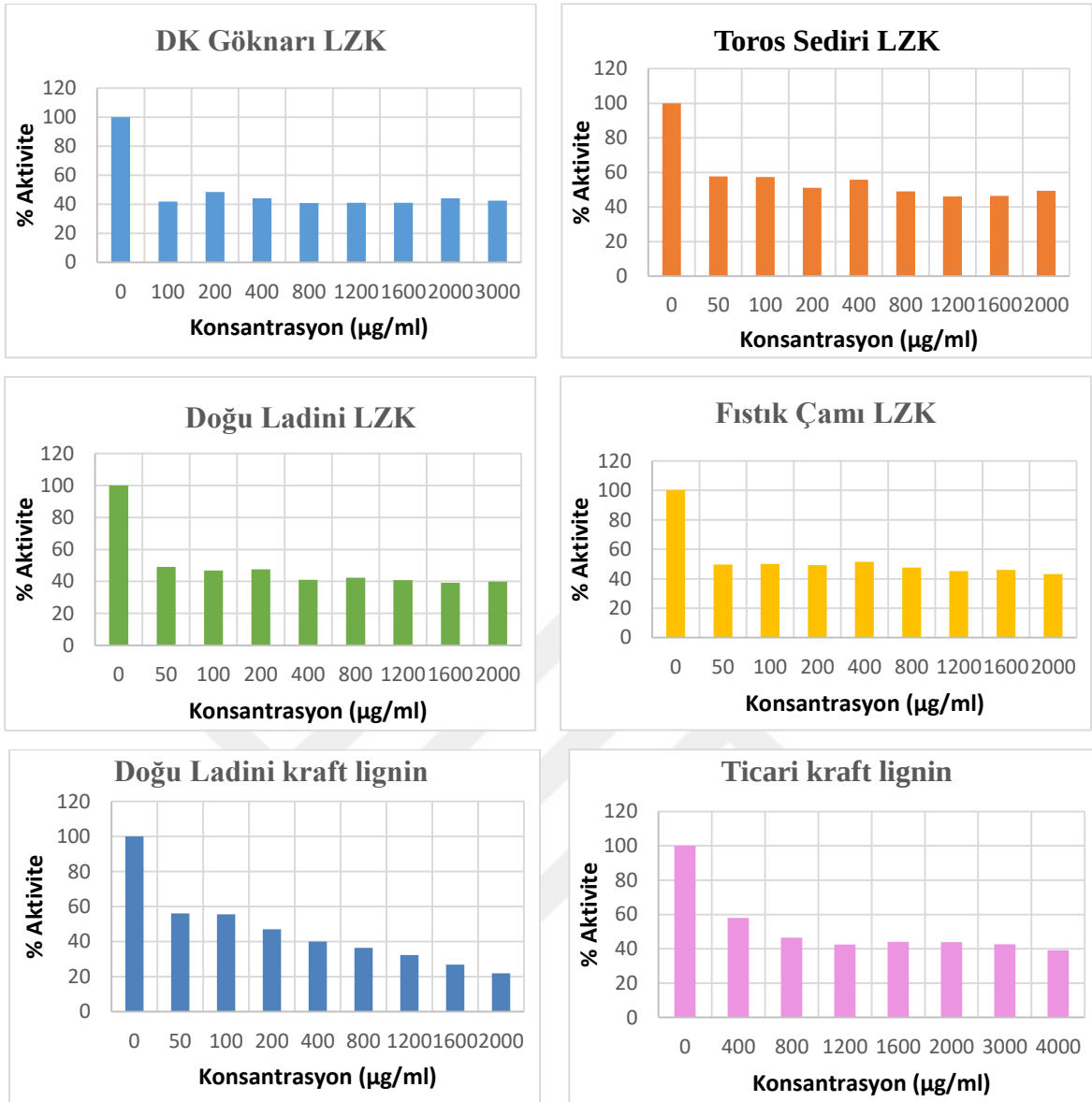
lignin ve katı kalıntı verimi sırasıyla %81.73 ve %42.58 olmuştur. Ekstraksiyon süresi uzadıkça lignin veriminde hafif bir artış görülürken, katı kalıntı miktarı azalmıştır. DÖÇ-Lignin veriminin optimal koşullar altında (120 °C, 1:10, 12 saat) %81,73 olduğunu göstermiştir. DÖÇ-Lignin saflığı %94,18 iken MWL'nin %92,17 olduğu belirlenmiştir. DES-Lignin'in molekül ağırlığının (1967 g/mol) MWL'den çok daha düşük (5817 g/mol) olduğu, DES-lignin PDI değerinin (1,59) ise, MWL örneğinden (1,35) yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmada reaksiyon süresi 12 saate uzatıldığında DÖÇ-Lignin'in antioksidan aktivitesi ticari antioksidanlardan (bütillenmiş hidroksianizol, BHA) daha yüksek olmaya başlamıştır. Yaklaşık 12 saat, 16 saat, 20 saat, 24 saat muamele süresinin IC₅₀ değerleri, BHA için 0,180 mg/ml ile karşılaştırıldığında sırasıyla 0,174 mg/ml, 0,163 mg/ml, 0,157 mg/ml ve 0,147 mg/ml idi. Veriler, lignin örneklerinin BHA'dan daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

3.4.3. Antiasetilkinesteraz Aktivite Bulguları

Şekil 3.26'de görüldüğü gibi DMSO asetilkolinesteraz enzimini inhibe etmiştir. Bu yüzden antiasetilkinesteraz aktivite deneylerinde de lignin örneklerinin etil alkolde çözölmüş örnekleri kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 3. 26: DMSO'nun antiasetilkinesteraz aktivitesi



Şekil 3. 27: LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari lignin örneklerinin enzim inhibisyon aktiviteleri (%)

Literatürde lignin antikolinesteraz enzim aktivitesine ait herhangi bir veriye rastlanılmamıştır. Şekil 3.27’de görüldüğü gibi örneklerin enzim inhibisyon etkisi olduğu fakat Doğu Ladini kraft lignin dışında konsantrasyon ve aktivite arasında korelasyon olmadığı belirlenmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, mikrodalga cihazında Doğu Karadeniz Göknarı, Toros Sediri, Doğu Ladini ve Fıstık Çamı kozalakları DDÖÇ ile muamele edilerek lignin elde edilmiştir. Ayrıca, geleneksel pişirme kazanında Doğu Ladini kozalaklarından Kraft lignin ve ticari Kraft lignin satın alınarak kullanılmıştır. Kontrol, SZK ve LZK örneklerine gravimetrik ve fizikokimyasal analizler uygulanmıştır. Kontrol ve SZK örneklerinin yapılarının belirlenmesinde termogravimetrik analiz (TGA), X-ışını kırınım (XRD) ve taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizleri gerçekleştirilmiştir. LZK örneklerinin saflıklarını belirlemek için klason lignin tayini yapılmıştır. LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerinin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), SEM, Fourier transform infrared (FTIR), ³¹P NMR analizleri yapılmıştır. LZK, Doğu Ladini Kraft lignini ve ticari Kraft lignin örneklerine antioksidan, antibakteriyel ve antikolinesteraz enzim inhibisyonu deneyleri yapılarak biyoktivite özelliklerini belirlenmiştir. Antioksidan aktivite 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal giderim yöntemi, antibakteriyel aktivitelerinin tespiti Gram (-) (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) ve Gram (+) (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) suşları ile sıvı besiyeri mikrodilüsyon yöntemi ve Asetilkolinesteraz (AChE) enzim inhibisyonu tayini yöntemi kullanılmıştır.

Kontrol örneklerine etil alkol ekstraksiyonu ve klason lignin tayini yapılmıştır. Etil alkol ekstraksiyonu Doğu Karadeniz Göknarı %21,1, Toros Sediri %24,74, Doğu Ladini %13,33 ve Fıstık Çamı %2,91 olarak tespit edilmiştir. Etil alkol yapılan kontrol örneklerine klason lignin tayini yapılmıştır. Klason lignin miktarları ise Doğu Karadeniz Göknarı %46,21, Toros Sediri %34,69, Doğu Ladini %46,32 ve Fıstık Çamı %36,13 olarak bulunmuştur. DDÖÇ muamelesi sonrası elde edilen katının başlangıçtaki miktara oranlanmasıyla bulunan SZK verimi en yüksek Fıstık Çamı %63,45, en düşük Doğu Karadeniz Göknarı %42,09, Toros Sediri %44,3, Doğu Ladini %54 olarak tespit edilmiştir.

Kontrol ve SZK örneklerine yapılan XRD analizi verileriyle kristallik indeksleri hesaplanmıştır. Doğu Karadeniz Göknarı %21,05; Toros Sediri %30,37; Doğu Ladini %36,47 ve Fıstık Çamı %38,06 olarak, DDÖÇ muamele sonrasında ise Doğu Karadeniz Göknarı SZK %39,32; Toros Sediri SZK %51,33; Doğu Ladini SZK %42,67 ve Fıstık Çamı

SZK %49,62 olarak hesaplanmıştır. I_{002} ve I_{am} için pikler sırasıyla $2\theta = 22,08^\circ$ - $22,88^\circ$ ve $18,44^\circ$ - $19,28^\circ$ 'de bulunmuştur. Kristallik indekslerinin DDÖÇ muamelesi sonrası artması kozalak örneklerinde bulunan lignin ve hemiselülozların amorf kısımların giderilmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. SEM analiziyle kontrol örneklerinin DDÖÇ muamelesiyle yüzeyinde meydana gelen morfolojik değişimler gözlemlenmiştir. Kontrol örneklerinin yüzeylerinin düzgün ve sağlam olduğu görülürken, SZK örneklerinin yüzeylerinin bozulduğu, düzensiz, pürüzlü ve gözenekli bir yapı oluştuğu görülmüştür. TG ve DTG eğrilerine göre $T_{i\%}$ (% 10 ağırlık kaybındaki sıcaklık) değerleri 219°C ile 293°C sıcaklık aralığında bulunmuştur. $T_{max\%}$ (%50 ağırlık kaybındaki sıcaklık) değerleri ise 344°C ile 369°C arasında bulunmuştur. 900°C 'deki termal bozunma sonucunda en fazla kalan kütle, %32,19 ile DK Göknarı kontrol örneğinde, en az kalan kütle ise %15,05 ile Toros Sediri SZK örneğinde olduğu belirlenmiştir. Lignin termal bozulmaya karşı daha dirençli olduğu için tüm kontrol örneklerinde kalan kütle miktarları SZK örneklerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir.

LZK örneklerine yapılan klason lignin tayini ile ligninlerin saflığı, elde edilen LZK miktarı ile başlangıçtaki lignin miktarının oranlanmasıyla lignin verimi belirlenmiştir. Lignin saflıkları DK Göknarı LZK %80,31, Toros Sediri LZK %82,65, Doğu Ladini LZK %78,6 ve Fıstık Çamı LZK %82,81, lignin verimleri ise DK Göknarı LZK %59,26, Toros Sediri LZK %89,29, Doğu Ladini LZK %55,25 ve Fıstık Çamı LZK %41,41 olarak tespit edilmiştir.

LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari Kraft lignin örneklerine FTIR, SEM ve GPC analizi yapılarak yapısal ve morfolojik özellikleri belirlenmiştir. FTIR analizinde genel olarak pikler literatürle uyumlu bulunmuştur. DDÖÇ LZK örneklerinde 1736 cm^{-1} ile 1728 cm^{-1} arasındaki absorpsiyon pikleri belirlenmiştir. Bu piklerin hemiselüloz C=O gerilmesinden kaynaklandığı LZKların safsızlığıyla ilişkilendirilmiştir. SEM analiz sonuçlarına göre lignin örneklerinin küresel, birbiri ile bağlantılı ve benzer morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ile analiz edilen ve ortalama moleküler ağırlık (M_n), ağırlık ortalamalı moleküler ağırlık (M_w) ve polidispersite indeksi (PDI) ile temsil edilen ligninin moleküler kütle dağılımı belirlenmiştir. M_w değerleri DK Göknarı LZK 4300 g/mol, Toros Sediri LZK 3500 g/mol, Doğu Ladini LZK 5600 g/mol, Fıstık Çamı LZK 4900 g/mol, Doğu Ladini kraft lignin 2400 g/mol ve ticari kraft lignin 4200 g/mol olarak bulunmuştur. Ortalama moleküler ağırlık (M_n) ve ağırlık ortalamalı moleküler ağırlık (M_w)'ın

oranlanmasıyla elde edilen polidispersite indeksi (PDI) LZK ve Doğu Ladini kraft ligninin, ticari ligninden düşük olduğu tespit edilmiştir. En yüksek PDI değeri ticari kraft ligninin (4,00) en düşük ise Doğu Ladini kraft ligninin (2,35) olduğu görülmüştür. Diğer örneklerin PDI değerleri ise DK Göknarı LZK 2,82, Toros Sediri LZK 3,17, Doğu Ladini LZK 2,58 ve Fıstık Çamı LZK 3,50 olarak bulunmuştur. LZK, kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerinin fonksiyonel grubu ayırt etmek için yapılan ³¹P NMR analiz sonuçlarına göre en yüksek toplam fenolik OH (1,57 mmol/g) ve alifatik OH (1,92 mmol/g), en düşük karboksilik OH (0,26 mmol/g) ticari kraft ligninde tespit edilmiştir. DK Göknarı LZK ve Toros Sediri LZK örneklerinde kondanse fenolik OH grubu tespit edilmemiştir.

DDÖÇ muamelesiyle elde edilen LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft lignin örneklerine antibakteriyel, antioksidan ve antiasetilkolinesteraz enzim inhibisyon biyoaktivite analizleri yapılmıştır. Antibakteriyel aktiviteleri Gram (-) (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) ve Gram (+) (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*) olmak üzere 4 farklı bakteri suşu üzerinde sıvıbesiyeri mikrodilüsyon yöntemi ile test edilmiştir. Tüm lignin örnekleri belirlenen konsantrasyon ve çalışılan suşlar üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) ise *Bacillus subtilis* bakterisi için DK Göknarı LZK ve Toros Sediri LZK 0,2 mg/mL, Doğu Ladini LZK 0,4 mg/mL Fıstık Çamı LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari kraft lignin için 0,3 mg/mL olarak tespit edilmiştir. *Enterococcus faecalis* bakterisi için en etkili antibakteriyel DK Göknarı LZK (0,1 mg/mL) olduğu, elde edilen tüm ligninlerin ticariden Kraft ligninden (0,2 mg/mL) daha etkili olduğu belirlenmiştir. *Escherichia coli* bakterisi için en yüksek MİK değerine (0,3 mg/mL) Fıstık Çamı LZK, en düşük MİK değerine (0,2 mg/mL) Doğu Ladini kraft ligninin sahip olduğu belirlenmiştir. *Klebsiella pneumoniae* bakterisi için Toros Sediri LZK ve Doğu Ladini Kraft lignin örneklerinin MİK değerlerinin 0,15 mg/mL olduğu ve diğer lignin örneklerinden daha etkili olduğu belirlenmiştir.

LZK, Doğu Ladini kraft lignin ve ticari Kraft lignin örneklerinin antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH serbest radikal giderme yöntemi kullanılmıştır. Kontrol olarak ticari antioksidan olan BHT kullanılmıştır. Örneklerin DPPH radikal giderme aktiviteleri % inhibisyon olarak hesaplanmıştır. BHT örneğinin % inhibisyon değerleri %5,15-30,69 aralığında, Toros Sediri LZK'nın %6,86-51,28 aralığında, Fıstık Çamı LZK'nın %9,85-56,27 aralığında, Doğu Ladini LZK'nın %7,63-66,41 aralığında, ticari kraft lignin %18,73-65,96 aralığında, DK Göknarı LZK'nın %24,43 -77,04 aralığında ve Doğu Ladini kraft ligninin

%22,94-74,85 aralığında olduğu tespit edilmiştir. IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. IC_{50} değeri ile antioksidan kapasite ters orantılıdır. En yüksek IC_{50} değeri BHT (118,12 $\mu\text{g/mL}$) olup, diğer tüm lignin örneklerinin IC_{50} değeri daha düşük bulunmuştur. IC_{50} değeri en düşük 14,08 $\mu\text{g/mL}$ Doğu Ladini kraft ligninin olduğu, en yüksek antioksidan etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Doğu Ladini LZK örneğinin ise IC_{50} değeri ise 35,72 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan Anova ve Tukey istatistik analizleri sonucunda BHT sentetik antioksidan ile lignin örnekleri arasında anlamlı fark olduğu, DK Göknarı LZK ve ticari Kraft lignin arasında ise anlamlı fark olmadığı bulunmuştur. Örneklerin antiasetilkinesteraz enzim inhibisyon etkisi olduğu fakat konsantrasyon ve aktivite arasında korelasyon olmadığı belirlenmiştir.

Kozalaklar, lignin açısından zengin, yenilenebilir ve ticari kullanımı olmayan biyokütle kaynaklarıdır. Kozalak türlerinin çoğu orman atığı olarak kalmakta ya da yakacak olarak kullanılmaktadır. Kozalakların atık olarak değerlendirilmek yerine değerli bir hammadde kaynağı olarak kullanılması, sürdürülebilirlik açısından büyük bir öneme sahiptir. Orman ürünlerinin verimli bir şekilde değerlendirilmesi, atık yönetimini iyileştirir ve çevre üzerindeki olumsuz etkileri azaltır. Bu atıklarının katma değerli ürünler elde edilerek geri kazanılması döngüsel biyo-tabanlı ekonomiye doğru ilerlemeye ve çevresel, sosyal ve ekonomik faydaları olan bir biyorafineri konseptinin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Biyolojik olarak parçalanabilir bileşikler olan kolin klorür ve laktik asitten oluşan doğal derin ötektik çözücülerin kullanımı, geleneksel organik çözücülere kıyasla daha çevre dostudur. Bu yöntem, yeşil kimya prensiplerine uygun bir şekilde kimyasal süreçlerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Çalışmada mikrodalga reaktörü kullanılmıştır. Mikrodalga ısınması, geleneksel ısınma yöntemlerine göre çok daha hızlıdır. Mikrodalga enerjisi, materyali doğrudan ve homojen olarak ısıtarak işlem süresini önemli ölçüde kısaltır. Derin ötektik çözücülerin iyonik karakterini en üst düzeye çıkarır ve moleküler polaritelerini artırarak biyokütle gözeneklerine nüfuzunu artırır ve lignin çözülmesi için gereken lignin bağının kırılmasını aktive eder. Mikrodalga enerjisi, hedef materyale doğrudan enerji aktarır, bu da enerji verimliliğini artırır ve ısının kaybolmasını en aza indirerek enerji tasarrufu sağlar. Mikrodalga ısınması, çözücülerin daha etkili kullanılmasına olanak tanır, bu da çözücü tüketimini azaltır ve işlem maliyetlerini düşürür. İşlem parametrelerinin (sıcaklık, süre, güç)

hassas bir şekilde kontrol edilmesini sağlar. Bu da sürecin optimize edilmesine ve tekrarlanabilirliğin artırılmasına olanak tanır.

Bu tez çalışmasıyla doğal derin ötektik çözücü kullanılarak kozalaklardan lignin elde edilmesinin verimli bir yöntem olduğu ve elde edilen ligninin önemli biyolojik aktiviteler sergilediği sonucuna varılmıştır. Ligninlerin yüksek antioksidan aktivitesi, BHT gibi sentetik antioksidan kullanmak yerine doğal bir antioksidan olarak işlev görebilecekleri gösterilmiştir. Sahip oldukları biyoaktivite özelliklerinden dolayı ligninler UV koruyucu, fonksiyonel paketleme ve nanokompozit gibi malzemelere entegre edilerek gıda, tekstil, biyomedikal, farmasötik vb. alanlarda kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Yapılan çalışmanın sonraki çalışmalar için önemli bilgiler vermiştir. Bu bilgilerin geliştirilmesi için aşağıda belirtilen önerilerde bulunulmuştur:

- Tez kapsamında kozalaklar ile sadece DDÖÇ olarak kolin klorür laktik asit kullanılmış olup, muamele koşulları sabit tutulmuştur. Daha sonraki çalışmalarda farklı DDÖÇ türleri ve muamele koşulları ile farklı lignoselülozik hammaddeler kullanılarak daha kapsamlı çalışmalar yapılabilir.
- Elde edilen ligninler, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı belirgin antibakteriyel aktivite göstermiştir. Bu çalışmadan sonraki çalışmalarda antivirüs ve antifungal gibi farklı antimikrobiyal çalışmaların yapılabilineceği ön görülmüştür.
- Ligninin antiasetilkolinesteraz aktivitesi üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu konu ile ilgili daha fazla çalışma yapılmalıdır. Bu çalışmalar, ligninin nörodejeneratif hastalıklara karşı potansiyel terapötik kullanımını daha iyi anlamak için in vitro ve in vivo modellerde test edilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. ve Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chemical communications*, (1), 70-71.
- Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L. ve Rasheed, R. K. (2004). Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, 126(29), 9142-9147.
- Adekunle, K. F., & Okolie, J. A. (2015). A review of biochemical process of anaerobic digestion. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(03), 205-212.
- Abranches, D. O., Martins, M. A., Silva, L. P., Schaeffer, N., Pinho, S. P. ve Coutinho, J. A. (2019). Phenolic hydrogen bond donors in the formation of non-ionic deep eutectic solvents: the quest for type V DES. *Chemical Communications*, 55(69), 10253-10256.
- Albuquerque, T. L., Cavalcante, V. G. C., da Silva Rocha, W., de Macedo, A. C. ve Rocha, M. V. P. (2024). Hydrogels based on lignin extracted from cashew apple bagasse and its application in antimicrobial wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, 262, 130169.
- Ali F., Silvy T.N., Hossain T.J., Uddin M.K. ve Uddin M.S. (2021). Prevalence and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella* species recovered at various stages of broiler operations in Hathazari, Bangladesh, *International Journal of One Health*, 7(2): 158-164.
- Altay, Ç., Özdemir, E., Baysal, E., Ergün, M. E. ve Toker, H. (2024). Physical, mechanical, and thermal characteristics of alkaline copper quaternary impregnated Oriental beech wood. *Maderas Ciencia y tecnología*, 26.
- Alzagameem, A., Khaldi-Hansen, B. E., Büchner, D., Larkins, M., Kamm, B., Witzleben, S. ve Schulze, M. (2018). Lignocellulosic biomass as source for lignin-based environmentally benign antioxidants. *Molecules*, 23(10), 2664
- Alzagameem, A., Klein, S. E., Bergs, M., Do, X. T., Korte, I., Dohlen, S., ... ve Schulze, M. (2019). Antimicrobial activity of lignin and lignin-derived cellulose and chitosan composites against selected pathogenic and spoilage microorganisms. *Polymers*, 11(4), 670.
- Alzagameem, A. (2020). *Antioxidant and antimicrobial properties of lignin and lignin-based composites for active food packaging applications* (Doctoral dissertation, BTU Cottbus-Senftenberg).
- Anand, P. ve Singh, B. (2012). Synthesis and evaluation of novel 4-[(3H, 3aH, 6aH)-3-phenyl]-4, 6-dioxo-2-phenyldihydro-2H-pyrrolo [3, 4-d] isoxazol-5 (3H, 6H, 6aH)-yl] benzoic acid derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors and anti-amnesic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(1), 521-530.

- Anand, P. ve Singh, B. (2013). A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of pharmacal research*, 36, 375-399.
- Anastas, P. ve Eghbali, N. (2010). Green chemistry: principles and practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301-312.
- Anşın, R. 1994. *Tohumlu Bitkiler (Gymnospermae)*, 1. Cilt, (2. Baskı), Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi. Trabzon.
- Argenziano, R., Moccia, F., Esposito, R., D'Errico, G., Panzella, L. ve Napolitano, A. (2022). Recovery of lignins with potent antioxidant properties from shells of edible nuts by a green ball milling/deep eutectic solvent (des)-based protocol. *Antioxidants*, 11(10), 1860.
- Argyropoulos, D. S., Bolker, H. I., Heitner, C. ve Archipov, Y. (1993). ³¹P NMR spectroscopy in wood chemistry. Part IV. Lignin models: spin lattice relaxation times and solvent effects in ³¹P NMR. *Holzforschung*, 47(1), 50-56.
- Atta, E. M., Mohamed, N. H. ve Abdelgawad, A. A. (2017). Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365-375.
- Aydın, A. C. (2016). *Toros Sediri (Cedrus Libani A. Rich.)'nde Biyokütle Araştırmaları*. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta.
- Bachurin, S. O. (2003). Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease. *Medicinal Research Reviews*, 23(1), 48-88.
- Balouiri, M., Sadiki, M. ve Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Bartolini, M., Bertucci, C., Cavrini, V. Ve Andrisano, V. (2003). β -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochemical pharmacology*, 65(3), 407-416.
- Beisl, S., Miltner, A. ve Friedl, A. (2017). Lignin from micro-to nanosize: production methods. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1244.
- Benzie, I. F. (2000). Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European journal of nutrition*, 39, 53-61.
- Bianchi, O., Dal Castel, C., de Oliveira, R. V., Bertuoli, P. T. ve Hillig, E. (2010). Nonisothermal degradation of wood using thermogravimetric measurements. *Polimeros*, 20, 395-400.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Boeriu, C. G., Bravo, D., Gosselink, R. J. ve van Dam, J. E. (2004). Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial crops and products*, 20(2), 205-218.

- Bruijnincx, P. C., Rinaldi, R. ve Weckhuysen, B. M. (2015). Unlocking the potential of a sleeping giant: lignins as sustainable raw materials for renewable fuels, chemicals and materials. *Green Chemistry*, 17(11), 4860-4861.
- Brunow, G. (2001). Methods to reveal the structure of lignin. *Biopolymers Online*.
- Brauns, F. E., Brauns, D. A. B. ve Brauns, D. A. (1960). *The chemistry of lignin. Suppl. vol.. Covering the literature for the years 1949-1958*. Acad. Press.
- Brown, D. F. ve Brown, L. (1991). Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 27(2), 185-190.
- Burhenne, L., Messmer, J., Aicher, T. ve Laborie, M. P. (2013). The effect of the biomass components lignin, cellulose and hemicellulose on TGA and fixed bed pyrolysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 101, 177-184.
- Büyüktuncel, E. (2013). Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17(2), 93-103.
- Cassoni, A. C., Mota, I., Costa, P., Vasconcelos, M. W. ve Pintado, M. (2022). Effect of alkaline and deep eutectic solvents pretreatments on the recovery of lignin with antioxidant activity from grape stalks. *International Journal of Biological Macromolecules*, 220, 406-414.
- Castro, A. ve Martinez, A. (2001). Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 1(3), 267-272.
- Cazacu, G., Capraru, M., & Popa, V. I. (2012). Advances concerning lignin utilization in new materials. In *Advances in natural polymers: composites and nanocomposites* (pp. 255-312). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Chen, Z., Zhu, W., Zheng, Z. ve Zou, X. (2010). One-pot α -nucleophilic fluorination of acetophenones in a deep eutectic solvent. *Journal of Fluorine Chemistry*, 131(3), 340-344.
- Chaudière, J. ve Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10), 949-962.
- Chen, Z. ve Wan, C. (2018). Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresource technology*, 250, 532-537.
- Chew, Y. L., Ling Chan, E. W., Tan, P. L., Lim, Y. Y., Stanslas, J. ve Goh, J. K. (2011). Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC complementary and alternative medicine*, 11, 1-10.

- Christensen, M., (2013). *Developing new consolidants for archaeological wood dissertation* for the degree of philosophiae doktor. ISSN 1501-7710 dü. Oslo: Department of Chemistry Faculty of Mathematics and Natural Sciences and Museum of Cultural History University of Oslo.
- Colombres, M., Sagal, J. P. ve Inestrosa, N. C. (2004). An overview of the current and novel drugs for Alzheimer's disease with particular reference to anti-cholinesterase compounds. *Current pharmaceutical design*, 10(25), 3121-3130.
- Correa, M. G., Martínez, F. B., Vidal, C. P., Streitt, C., Escrig, J. ve de Dicastillo, C. L. (2020). Antimicrobial metal-based nanoparticles: A review on their synthesis, types and antimicrobial action. *Beilstein journal of nanotechnology*, 11(1), 1450-1469.
- Crestini, C., Lange, H., Sette, M. ve Argyropoulos, D. S. (2017). On the structure of softwood kraft lignin. *Green Chemistry*, 19(17), 4104-4121.
- Deetlefs, M. ve Seddon, K. R. (2010). Assessing the greenness of some typical laboratory ionic liquid preparations. *Green Chemistry*, 12(1), 17-30.
- De Ferrari, G. V., Canales, M. A., Shin, I., Weiner, L. M., Silman, I. ve Inestrosa, N. C. (2001). A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid β -peptide fibril formation. *Biochemistry*, 40(35), 10447-10457.
- Dickert, H., Machka, K. ve Braveny, I. (1981). The uses and limitations of disc diffusion in the antibiotic sensitivity testing of bacteria. *Infection*, 9(1), 18-24.
- Dizhbite, T., Telysheva, G., Jurkjane, V. ve Viesturs, U. (2004). Characterization of the radical scavenging activity of lignins-natural antioxidants. *Bioresource technology*, 95(3), 309-317.
- Doddangoudar, V. C., O'Donoghue, M. M., Boost, M. V., Tsang, D. N. ve Appelbaum, P. C. (2010). Rapid detection of vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus* using the spiral gradient endpoint technique. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(11), 2368-2372.
- Doherty, W. O., Mousavioun, P. ve Fellows, C. M. (2011). Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. *Industrial crops and products*, 33(2), 259-276.
- Dong, X., Dong, M., Lu, Y., Turley, A., Jin, T. ve Wu, C. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 34(3), 1629-1634.
- Dontha, S. (2016). A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 14-32.
- Dönmez, I. E., Hafizoğlu, H., Kilic, A., Tümen, I. ve Sivrikaya, H. (2012). Chemical composition of fourteen different coniferous species cones growing naturally in Turkey. *Wood Research*, 57(2), 339-344.
- Elhamarnah, Y., Qiblawey, H. ve Nasser, M. (2024). A review on deep eutectic solvents as

- the emerging class of green solvents for membrane fabrication and separations. *Journal of Molecular Liquids*, 124250.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V. ve Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Espinoza-Acosta, J. L., Torres-Chávez, P. I., Ramírez-Wong, B., López-Saiz, C. M. ve Montaña-Leyva, B. (2016). Antioxidant, antimicrobial, and antimutagenic properties of technical lignins and their applications. *BioResources*, 11(2).
- Fengel, D. ve Wegener, G. (1989). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
- Feroz, S., Muhammad, N., Ratnayake, J. ve Dias, G. (2020). Keratin-Based materials for biomedical applications. *Bioactive materials*, 5(3), 496-509.
- Flores, F. G. C., Dobado, J. A., Isac-García, J. ve Martín-Martínez, F. J. (2015). *Lignin and lignans as renewable raw materials: chemistry, technology and applications*. John Wiley & Sons.
- García, A., Alriols, M. G., Spigno, G. ve Labidi, J. (2012). Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification processes on the antioxidant behaviour of lignin. *Biochemical engineering journal*, 67, 173-185.
- García, A., Spigno, G. ve Labidi, J. (2017). Antioxidant and biocide behaviour of lignin fractions from apple tree pruning residues. *Industrial Crops and Products*, 104, 242-252.
- García-García, D., Balart, R., Lopez-Martinez, J., Ek, M. ve Moriana, R. (2018). Optimizing the yield and physico-chemical properties of pine cone cellulose nanocrystals by different hydrolysis time. *Cellulose*, 25, 2925-2938.
- Gellerstedt, G. ve Henriksson, G. (2008). Lignins: major sources, structure and properties. *Monomers, polymers and composites from renewable resources*, 201-224.
- Geula, C. ve Darvesh, S. (2004). Butyrylcholinesterase, cholinergic neurotransmission and the pathology of Alzheimer's disease. *Drugs Today (Barc)* 40: 711-721.
- Gorke, J. T., Srienc, F. ve Kazlauskas, R. J. (2010). Deep eutectic solvents for *Candida antarctica* lipase B-catalyzed reactions. In *Ionic liquid applications: pharmaceuticals, therapeutics, and biotechnology* (pp. 169-180). American Chemical Society.
- Gordobil, O., Herrera, R., Yahyaoui, M., İlk, S., Kaya, M. ve Labidi, J. (2018). Potential use of kraft and organosolv lignins as a natural additive for healthcare products. *Royal Society of Chemistry (RSC) advances*, 8(43), 24525-24533.
- Gonultas, O. ve Ucar, M. B. (2013). Chemical characteristics of the cone and wood of *Pinus*

pinea. *Lignocellulose*, 2(1), 262-269.

- Gönültaş, O. 2008. *Fıstık Çamı (Pinus Pinea) Kozalak, Odun Ve İbrelerinin Kimyasal Karakterizasyonu*. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.
- Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M. ve Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3), 174-179.
- Guo, K. N., Zhang, C., Xu, L. H., Sun, S. C., Wen, J. L. ve Yuan, T. Q. (2022). Efficient fractionation of bamboo residue by autohydrolysis and deep eutectic solvents pretreatment. *Bioresource Technology*, 354, 127225.
- Guo, M., Jin, T., Nghiem, N. P., Fan, X., Qi, P. X., Jang, C. H., ... ve Wu, C. (2018). Assessment of antioxidant and antimicrobial properties of lignin from corn stover residue pretreated with low-moisture anhydrous ammonia and enzymatic hydrolysis process. *Applied biochemistry and biotechnology*, 184, 350-365.
- Guo, Z., Li, D., You, T., Zhang, X., Xu, F., Zhang, X. ve Yang, Y. (2020). New lignin streams derived from heteropoly acids enhanced neutral deep eutectic solvent fractionation: toward structural elucidation and antioxidant performance. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(32), 12110-12119.
- Gupta, D. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), 546.
- Güleç, A. (2015). *Devlet Fıstık Çamı Ormanlarının Köy Tüzel Kişiliklerine Ve Yöresel Ekonomiye Sağladığı Katkılar: Gediz Havzası Örneği*. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Isparta.
- Gülsoy, S. K., Hafizoğlu, H., Pekgözlü, A. K., Tümen, İ., Dönmez, İ. E. ve Sivrikaya, H. (2017). Fiber properties of axis and scale of eleven different coniferous cones. *Industrial Crops and Products*, 109, 45-52.
- Gülsoy, S. K. ve Kilic Pekgözlü, A. (2024). Effect of Treatment Time on Deep Eutectic Solvent Treatment of Scots Pine Wood. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 24(1), 48-58.
- He, Y. C., Ding, Y., Xue, Y. F., Yang, B., Liu, F., Wang, C., ... ve Zhang, D. P. (2015). Enhancement of enzymatic saccharification of corn stover with sequential Fenton pretreatment and dilute NaOH extraction. *Bioresource technology*, 193, 324-330.
- Horikawa, Y., Hirano, S., Mihashi, A., Kobayashi, Y., Zhai, S. ve Sugiyama, J. (2019). Prediction of lignin contents from infrared spectroscopy: chemical digestion and lignin/biomass ratios of *Cryptomeria japonica*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 188, 1066-1076.
- Hossain, T. J. (2024). Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of*

Microbiology and Immunology, 14(2), 97-115.

- Huang, D., Ou, B. ve Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Ibrahim, M. N. M., Iqbal, A., Shen, C. C., Bhawani, S. A. ve Adam, F. (2019). Synthesis of lignin based composites of TiO₂ for potential application as radical scavengers in sunscreen formulation. *BMC chemistry*, 13, 1-14.
- Isikgor, F. H. ve Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer chemistry*, 6(25), 4497-4559.
- Iwasaki, Y., Hirasawa, T., Maruyama, Y., Ishii, Y., Ito, R., Saito, K., ... ve Nakazawa, H. (2011). Effect of interaction between phenolic compounds and copper ion on antioxidant and pro-oxidant activities. *Toxicology in Vitro*, 25(7), 1320-1327.
- Junges, J., Perondi, D., Ferreira, S. D., Dettmer, A., Osório, E. ve Godinho, M. (2019). Multi-technique characterization of chromated copper arsenate-treated wooden utility poles from the Brazilian electricity network. *European Journal of Wood and Wood Products*, 77, 279-291.
- Kalhor, P. ve Ghandi, K. (2019). Deep eutectic solvents for pretreatment, extraction, and catalysis of biomass and food waste. *Molecules*, 24(22), 4012.
- Kalinoski, R. M. ve Shi, J. (2019). Hydrogels derived from lignocellulosic compounds: Evaluation of the compositional, structural, mechanical and antimicrobial properties. *Industrial crops and products*, 128, 323-330.
- Kammoun, M., Berchem, T. ve Richel, A. (2021). Ultrafast Lignin Extraction from Unusual Mediterranean Lignocellulosic Residues. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (169), e61997.
- Kang, X., Deng, C., Shinde, R., Lin, R. ve Murphy, J. D. (2023). Renewable deep eutectic solvents pretreatment improved the efficiency of anaerobic digestion by lignin extraction from willow. *Energy Conversion and Management*, 288, 117115.
- Kaur, R., Uppal, S. K. ve Sharma, P. (2017). Antioxidant and antibacterial activities of sugarcane bagasse lignin and chemically modified lignins. *Sugar tech*, 19, 675-680.
- Kepp, K. P. (2012). Bioinorganic chemistry of Alzheimer's disease. *Chemical reviews*, 112(10), 5193-5239.
- Keskin, S. (1992). *Sedirin Botanik Özellikleri. Sedir El Kitabı Dizisi: 6. (Editör Ünal ELER) Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları*. Muhtelif Yayınlar Serisi: 66, 265- 286, Ankara.
- Khemani, L. D., Srivastava, M. M. ve Srivastava, S. (Eds.). (2012). *Chemistry of phytopotentials: Health, energy and environmental perspectives*. Berlin/Heidelberg: Springer.

- Kilic, A., Hafizoglu, H., Dönmez, I. E., Tümen, I., Sivrikaya, H., Reunanen, M. ve Hemming, J. (2011). Extractives in the cones of Pinus species. *European Journal of Wood and Wood Products*, 69(1), 37-40.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B. ve Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126.
- Konukçu, M. (2001). *Ormanlar ve Ormancılığımız. Devlet Planlama Teşkilatı*, Yayın ve Temsil Dairesi Başkanlığı, Yayın No. DPT: 2630, ISBN 975-19-2875-3, 238 s.
- Kumar, S., Mohanty, A. K., Erickson, L. ve Misra, M. (2009). Lignin and its applications with polymers. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(1), 1-24.
- Ladner, C. J. ve Lee, J. M. (1998). Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: the cholinergi hypothesis revisited. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 57(8), 719.
- Lange, H., Rulli, F. ve Crestini, C. (2016). Gel permeation chromatography in determining molecular weights of lignins: critical aspects revisited for improved utility in the development of novel materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(10), 5167-5180.
- Li, T., Lyu, G., Liu, Y., Lou, R., Lucia, L. A., Yang, G., ... ve Saeed, H. A. (2017). Deep eutectic solvents (DESs) for the isolation of willow lignin (*Salix matsudana* cv. Zhuliu). *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2266.
- Li, P., Zhang, Q., Zhang, X., Zhang, X., Pan, X. ve Xu, F. (2019). Subcellular dissolution of xylan and lignin for enhancing enzymatic hydrolysis of microwave assisted deep eutectic solvent pretreated *Pinus bungeana* Zucc. *Bioresource technology*, 288, 121475.
- Li, C., Huang, C., Zhao, Y., Zheng, C., Su, H., Zhang, L., ... ve Huang, L. J. (2021). Effect of choline-based deep eutectic solvent pretreatment on the structure of cellulose and lignin in bagasse. *Processes*, 9(2), 384.
- Li, D. (2022). Natural deep eutectic solvents in phytonutrient extraction and other applications. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1004332.
- Li, H., Liang, J., Chen, L., Ren, M. ve Zhou, C. (2023). Utilization of walnut shell by deep eutectic solvents: enzymatic digestion of cellulose and preparation of lignin nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, 192, 116034.
- Li, W. X., Xiao, W. Z., Yang, Y. Q., Wang, Q., Chen, X., Xiao, L. P. ve Sun, R. C. (2021). Insights into bamboo delignification with acidic deep eutectic solvents pretreatment for enhanced lignin fractionation and valorization. *Industrial Crops and Products*, 170, 113692.
- Li, Z., Zhang, J., Qin, L. ve Ge, Y. (2018). Enhancing antioxidant performance of lignin by

- enzymatic treatment with laccase. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(2), 2591-2595.
- Lim, W. L., Gunny, A. A. N., Kasim, F. H., AlNashef, I. M. ve Arbain, D. (2019). Alkaline deep eutectic solvent: a novel green solvent for lignocellulose pulping. *Cellulose*, 26, 4085-4098.
- Lima, P. G., Oliveira, J. T., Amaral, J. L., Freitas, C. D. ve Souza, P. F. (2021). Synthetic antimicrobial peptides: Characteristics, design, and potential as alternative molecules to overcome microbial resistance. *Life Sciences*, 278, 119647.
- Lin, K. T., Wang, C., Guo, M. F., Aprà, E., Ma, R., Ragauskas, A. J. ve Zhang, X. (2023). Lignin with controlled structural properties by N-heterocycle-based deep eutectic solvent extraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(32), e2307323120.
- Liu, H., Cao, J. ve Jiang, W. (2015). Evaluation and comparison of vitamin C, phenolic compounds, antioxidant properties and metal chelating activity of pulp and peel from selected peach cultivars. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2), 1042-1048.
- Lobato-Peralta, D. R., Duque-Brito, E., Villafan-Vidales, H. I., Longoria, A., Sebastian, P. J., Cuentas-Gallegos, A. K., ... ve Okoye, P. U. (2021). A review on trends in lignin extraction and valorization of lignocellulosic biomass for energy applications. *Journal of Cleaner Production*, 293, 126123.
- Loow, Y. L., Wu, T. Y., Yang, G. H., Ang, L. Y., New, E. K., Siow, L. F., ... ve Teoh, W. H. (2018). Deep eutectic solvent and inorganic salt pretreatment of lignocellulosic biomass for improving xylose recovery. *Bioresource technology*, 249, 818-825.
- Lourençon, T. V., de Lima, G. G., Ribeiro, C. S., Hansel, F. A., Maciel, G. M., da Silva, K., ... ve Magalhães, W. L. (2021). Antioxidant, antibacterial and antitumoural activities of kraft lignin from hardwood fractionated by acid precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 1535-1542.
- Ma, M., Dai, L., Xu, J., Liu, Z. ve Ni, Y. (2020). A simple and effective approach to fabricate lignin nanoparticles with tunable sizes based on lignin fractionation. *Green Chemistry*, 22(6), 2011-2017.
- Ma, C. Y., Gao, X., Peng, X. P., Gao, Y. F., Liu, J., Wen, J. L. ve Yuan, T. Q. (2021a). Microwave-assisted deep eutectic solvents (DES) pretreatment of control and transgenic poplars for boosting the lignin valorization and cellulose bioconversion. *Industrial Crops and Products*, 164, 113415.
- Ma, C. Y., Peng, X. P., Sun, S., Wen, J. L. ve Yuan, T. Q. (2021b). Short-time deep eutectic solvents pretreatment enhanced production of fermentable sugars and tailored lignin nanoparticles from abaca. *International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 417-425.

- Ma, C. Y., Xu, L. H., Sun, Q., Sun, S. N., Cao, X. F., Wen, J. L. ve Yuan, T. Q. (2022a). Ultrafast alkaline deep eutectic solvent pretreatment for enhancing enzymatic saccharification and lignin fractionation from industrial xylose residue. *Bioresource Technology*, 352, 127065.
- Ma, C. Y., Xu, L. H., Sun, Q., Shen, X. J., Wen, J. L. ve Yuan, T. Q. (2022b). Tailored one-pot lignocellulose fractionation to maximize biorefinery toward controllable producing lignin nanoparticles and facilitating enzymatic hydrolysis. *Chemical Engineering Journal*, 450, 138315.
- Magaldi, S., Mata-Essayag, S., De Capriles, C. H., Pérez, C., Colella, M. T., Olaizola, C. ve Ontiveros, Y. (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International journal of infectious diseases*, 8(1), 39-45.
- Mandlekar, N., Cayla, A., Rault, F., Giraud, S., Salaün, F., Malucelli, G. ve Guan, J. P. (2018). An overview on the use of lignin and its derivatives in fire retardant polymer systems. *Lignin-trends and applications*, 9, 207-231.
- Mankar, A. R., Pandey, A. ve Pant, K. K. (2022). Microwave-assisted extraction of lignin from coconut coir using deep eutectic solvents and its valorization to aromatics. *Bioresource Technology*, 345, 126528.
- Mesulam, M. M., Guillozet, A., Shaw, P., Levey, A., Duysen, E. G. ve Lockridge, O. (2002). Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *neuroscience*, 110(4), 627-639.
- Mišan, A., Nađpal, J., Stupar, A., Pojić, M., Mandić, A., Verpoorte, R. ve Choi, Y. H. (2020). The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(15), 2564-2592.
- Morena, A. G., Bassegoda, A., Natan, M., Jacobi, G., Banin, E. ve Tzanov, T. (2022). Antibacterial properties and mechanisms of action of sonoenzymatically synthesized lignin-based nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(33), 37270-37279.
- Nahar, Y., & Thickett, S. C. (2021). Greener, faster, stronger: the benefits of deep eutectic solvents in polymer and materials science. *Polymers*, 13(3), 447.
- Nanda, S., Reddy, S. N., Mitra, S. K. ve Kozinski, J. A. (2016). The progressive routes for carbon capture and sequestration. *Energy Science & Engineering*, 4(2), 99-122.
- Odegova, V., Lavrinenko, A., Rakhmanov, T., Sysuev, G., Dmitrenko, A. ve Vinogradov, V. (2024). DESignSolvents: an open platform for the search and prediction of the physicochemical properties of deep eutectic solvents. *Green Chemistry*, 26(7), 3958-3967.
- OGM (2021), Orman Genel Müdürlüğü, <https://www.ogm.gov.tr/tr/e-kutuphane/resmi-istatistikler>, (20.11.2023).
- OGM (2009), Orman Genel Müdürlüğü, <https://www.ogm.gov.tr/tr/e->

kutuphane/kitaplik/yayinlar, (20.11.2023).

- Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K. ve Kozinski, J. A. (2021). Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 2145-2169.
- Olgun, Ç., (2019). *Farklı lignin yapılarına sahip hammaddelerden lignin esaslı karbon lifi üretimi*. Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Kastamonu
- Özgürlük, Ö., Özlüsoylu, Ş., Gülsoy, S. K. ve Pekgözlü, A. K. (2024). Effect of ternary deep eutectic solvents on delignification of stone pine cone. *Turkish Journal of Forestry*, 25(1), 107-112.
- Parakh, P. D., Nanda, S. ve Kozinski, J. A. (2020). Eco-friendly transformation of waste biomass to biofuels. *Current Biochemical Engineering*, 6(2), 120-134.
- Pfaller, M. A., Sheehan, D. J. ve Rex, J. H. (2004). Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 268-280.
- Peterson, A. A., Vogel, F., Lachance, R. P., Fröling, M., Antal Jr, M. J. ve Tester, J. W. (2008). Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: a review of sub-and supercritical water technologies. *Energy & environmental science*, 1(1), 32-65.
- Perez, C. (1990). Antibiotic assay by agar-well diffusion method. *Acta biologiae et medicinae experimentalis*, 15, 113-115.
- Ponomarenko, J., Dizhbite, T., Lauberts, M., Volperts, A., Dobelev, G. ve Telysheva, G. (2015). Analytical pyrolysis—A tool for revealing of lignin structure-antioxidant activity relationship. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 113, 360-369.
- Popescu, M. C., Popescu, C. M., Lisa, G. ve Sakata, Y. (2011). Evaluation of morphological and chemical aspects of different wood species by spectroscopy and thermal methods. *Journal of molecular structure*, 988(1-3), 65-72.
- Pu, Y., Cao, S. ve Ragauskas, A. J. (2011). Application of quantitative ³¹P NMR in biomass lignin and biofuel precursors characterization. *Energy & Environmental Science*, 4(9), 3154-3166.
- Querfurth, H. W. ve LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344.
- Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, 26, 863-871.
- Rees, T., Hammond, P. I., Soreq, H., Younkin, S. ve Brimijoin, S. (2003). Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiology of aging*, 24(6), 777-787.
- Rice-Evans, C., Miller, N. ve Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic

- compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- Saibaba, K. N. (2023). Next generation biosurfactants and their practical application in the food sector. In *Applications of Next Generation Biosurfactants in the Food Sector*, 349-360. Academic Press.
- Savi, L. K., Carpiné, D., Waszczynskyj, N., Ribani, R. H. ve Haminiuk, C. W. I. (2019). Influence of temperature, water content and type of organic acid on the formation, stability and properties of functional natural deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilibria*, 488, 40-47.
- Segal, L. G. J. M. A., Creely, J. J., Martin Jr, A. E. ve Conrad, C. M. (1959). An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile research journal*, 29(10), 786-794.
- Selkoe, D. J. (2002). Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*, 110(10), 1375-1381.
- Sharma, V., Tsai, M. L., Chen, C. W., Sun, P. P., Patel, A. K., Singhanian, R. R., ... ve Dong, C. D. (2022). Deep eutectic solvents as promising pretreatment agents for sustainable lignocellulosic biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 360, 127631.
- Smith, E. L., Abbott, A. P. ve Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical reviews*, 114(21), 11060-11082.
- Shu, F., Jiang, B., Yuan, Y., Li, M., Wu, W., Jin, Y. ve Xiao, H. (2021). Biological activities and emerging roles of lignin and lignin-based products— A review. *Biomacromolecules*, 22(12), 4905-4918.
- Soto-Salcido, L. A., Anugwom, I., Ballinas-Casarrubias, L., Mänttari, M. ve Kallioinen, M. (2020). NADES-Based Fractionation of Biomass to Produce Raw Material for the Preparation of Cellulose Acetates. *Cellulose*, 27, 6831-6848.
- Stevens, J. ve Gardner, D. J. (2010). Enhancing the fuel value of wood pellets with the addition of lignin. *Wood and Fiber Science*, 439-443.
- Su, Y., Huang, C., Lai, C. ve Yong, Q. (2021). Green solvent pretreatment for enhanced production of sugars and antioxidative lignin from poplar. *Bioresource Technology*, 321, 124471.
- Škulcová, A., Jablonský, M., Ház, A., Vrška, M. (2016). Pretreatment of Wheat Straw Using Deep Eutectic Solvents and Ultrasound. *Przegląd Papierniczy*, 72, 243-247.
- Tao, J., Li, S., Ye, F., Zhou, Y., Lei, L. ve Zhao, G. (2020). Lignin—An underutilized, renewable and valuable material for food industry. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(12), 2011-2033.
- TAPPI, (1985). Sampling and preparing wood for analysis. Test Method T 257 om-85. ABD. 229

- TAPPI, (1988a). Solvent extractives of wood and pulp. Test Method T 204 om-88. ABD.
- TAPPI, (1988b). Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Test Method T 222 om-88. ABD.
- Tayanç, Y., Çengel, B., Kandemir, G. ve Velioğlu, E. (2013). *Türkiye’de Yayılış Gösteren Gökmar (Abies spp.) Populasyonlarının Genetik Çeşitliliği ve Filogenetik Sınıflandırması*. Orman Genel Müdürlüğü Orman Ağaçları ve Tohumları İslah Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, (47).
- Vanholme, B., El Houari, I. ve Boerjan, W. (2019). Bioactivity: phenylpropanoids’ best kept secret. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 156-162.
- Wang, L., Li, X., Jiang, J., Zhang, Y., Bi, S. ve Wang, H. M. (2022). Revealing structural and functional specificity of lignin from tobacco stalk during deep eutectic solvents deconstruction aiming to targeted valorization. *Industrial Crops and Products*, 180, 114696.
- Wang, Z. K., Hong, S., Wen, J. L., Ma, C. Y., Tang, L., Jiang, H., ... ve Yuan, T. Q. (2019). Lewis acid-facilitated deep eutectic solvent (DES) pretreatment for producing high-purity and antioxidative lignin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(2), 1050-1057.
- White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M. ve Bosso, J. A. (1996). Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(8), 1914-1918.
- Wilkins, T. D. ve Thiel, T. (1973). Modified broth-disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 3(3), 350-356.
- Wootton-Beard, P. C. ve Ryan, L. (2011). Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Research International*, 44(10), 3135-3148.
- Wu, Y., Cheng, J., Yang, Q., Hu, J., Zhou, Q., Wang, L., ... ve Hui, L. (2021). Solid acid facilitated deep eutectic solvents extraction of high-purity and antioxidative lignin production from poplar wood. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 64-70.
- Wu, Y., Liu, Z., Ma, L., Guo, Z., Yang, Q., Wang, X. ve Hui, L. (2021). Structural characterization and evaluation of the antioxidant activity of DES-Lignin isolated from *Cunninghamia lanceolata*. *Wood Science and Technology*, 55, 1041-1055.
- Xu, G. C., Ding, J. C., Han, R. Z., Dong, J. J. ve Ni, Y. (2016). Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. *Bioresource technology*, 203, 364-369.
- Xu, Y. H., Zeng, P., Li, M. F., Bian, J. ve Peng, F. (2021). γ -Valerolactone/water system for lignin fractionation to enhance antibacterial and antioxidant capacities. *Separation*

and Purification Technology, 279, 119780.

- Yang, Y. T., Qin, M. K., Sun, Q., Gao, Y. F., Ma, C. Y. ve Wen, J. L. (2022). Structural elucidation and targeted valorization of poplar lignin from the synergistic hydrothermal-deep eutectic solvent pretreatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 209, 1882-1892.
- Yener, D. Y. (2012). Abies Taxa of Turkey and Their Visual Characteristics. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 12(3), 259-262.
- Yerli, Z. (2012). *Doğu Ladini'nin (Picea orientalis L. Link.) Kozalak Ve Tohum Özelliklerindeki Coğrafi Farklılıklar*. Artvin Çoruh Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Artvin.
- Yue, X., Suopajarvi, T., Mankinen, O., Mikola, M., Mikkelsen, A., Ahola, J., ... ve Liimatainen, H. (2020). Comparison of lignin fractions isolated from wheat straw using alkaline and acidic deep eutectic solvents. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 68(51), 15074-15084.
- Yun, J., Wei, L., Li, W., Gong, D., Qin, H., Feng, X., ... ve Yin, B. (2021). Isolating high antimicrobial ability lignin from bamboo kraft lignin by organosolv fractionation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 683796.
- Zakzeski, J., Bruijninx, P. C., Jongerius, A. L. ve Weckhuysen, B. M. (2010). The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical reviews*, 110(6), 3552-3599.
- Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S. ve Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108-7146.
- Shamsuri, A. A. ve Abdullah, D. K. (2010). Ionic liquids: Preparations and limitations. *Makara Journal of Science*, 14(2), 19.
- Zhang, W., Shen, J., Gao, P., Jiang, Q. ve Xia, W. (2022). Sustainable chitosan films containing a betaine-based deep eutectic solvent and lignin: Physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 129, 107656.
- Zhao, Q., Wang, H., Yin, Y., Xu, Y., Chen, F. ve Dixon, R. A. (2010). Syringyl lignin biosynthesis is directly regulated by a secondary cell wall master switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(32), 14496-14501.
- Zhou, M., Fakayode, O. A., Yagoub, A. E. A., Ji, Q. ve Zhou, C. (2022). Lignin fractionation from lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents and its valorization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 156, 111986.
- Zhu, Y., Yang, T. X., Qi, B. K., Li, H., Zhao, Q. S. ve Zhao, B. (2023). Acidic and alkaline deep eutectic solvents (DESS) pretreatment of grapevine: Component analysis, characterization, lignin structural analysis, and antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 236, 123977.

- Zhu, Y., Li, H., Zhao, Q. S. ve Zhao, B. (2024). Effect of DES lignin incorporation on physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of carboxymethyl cellulose-based films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130294.
- Zhu, Z., Lü, H., Zhang, M. ve Yang, H. (2021). Deep eutectic solvents as non-traditionally multifunctional media for the desulfurization process of fuel oil. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 23(2), 785-805.
- Zourif, A., Chajii, O., Chemchame, Y., Benbiyi, A., Azoubi, Z., El Guendouzi, M. ve El Bouari, A. (2024). High extraction and excellent anti-UV and anti-oxidant proprieties of lignin from Reseda Luteola L. waste by organosolv process. *International Journal of Biological Macromolecules*, 268, 131624.



ÖZGEÇMİŞ



