



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARAÇAM (PİNUS NİGRA) BUDAKLARINDAKİ STİLBENLERİN
DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERLE (DÖÇ) GERİ KAZANILMASI**

ÖZNUR ÇAKAL

DANIŞMAN

DOÇ. DR. AYBEN KILIÇ PEKGÖZLÜ

BARTIN-2021



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**KARAÇAM (PİNUS NİGRA) BUDAKLARINDAKİ STİL BENLERİN DERİN
ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERLE (DÖÇ) GERİ KAZANILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Öznur ÇAKAL

BARTIN-2021

BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ danışmanlığında hazırlamış olduğum “KARAÇAM (*Pinus nigra*) BUDAKLARINDAKİ STİLBENLERİN DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERLE (DÖÇ) GERİ KAZANILMASI” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

09.09.2021

Öznur ÇAKAL



ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarında, tez konumun belirlenmesinden laboratuvar çalışmalarına kadar engin bilgi ve birikimini benden esirgemeyerek, yetişmemde ve tez yazım aşamasında bilimsel değerleri korumam ve uygulamam konusunda bana tecrübeleriyle kılavuzluk eden ve bilfiil yanımda olan danışmanım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ'ye içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Yüksek lisans tezimde jüri üyesi olma nezaketini gösteren, tez konusu ile ilgili değerli tecrübelerini ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Ayhan GENÇER'e ve Doç. Dr. İlhami Emrah DÖNMEZ'e şükranlarımı sunarım.

Kimyasal analizler, laboratuvar çalışmaları sırasında değerli tavsiye ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Esra CEYLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kimyasal analizler ve HPLC çalışmaları sırasında değerli tavsiye ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Hasan KESKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezin numune temininde bize yardımcı olan Ulus Orman İşletme Müdürlüğü Abdipaşa Şefliği çalışanlarına teşekkür ederim.

Öznur ÇAKAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARAÇAM (PİNUS NİGRA) BUDAKLARINDAKİ STİL BENLERİN DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLERLE (DÖÇ) GERİ KAZANILMASI

Öznur ÇAKAL

Bartın Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ

Bartın-2021, sayfa: 132

Bu çalışmada, Ulus Orman İşletme Müdürlüğü Abdipaşa Şefliği Meşcere Haritası 49 nolu bölmeden temin edilen, çapı 32 kutur ve yaş aralığı 25-30 olan Karaçam (*P.nigra*) gövde odunu ve budakları kullanılmıştır. Gövde odunu ve budaklara odun ana bileşenleri (holoselüloz, alfa-selüloz ve lignin) ve sıralı ekstraksiyon (n-hekzan, aseton: su) deneyleri uygulanmıştır. Ayrıca Derin Ötektik Çözücüler (DÖÇ) kullanılarak ultrason ve sıcak-su banyosunda karaçam budaklarındaki pinosilvin ve pinosilvinmonometileter miktarları HPLC ile tespit edilmiştir.

DÖÇ deneylerinde 1 gram budak örneği kullanılarak, iki farklı muamele sıcaklığı (60°C – 70°C), iki farklı muamele süresi (30 – 60 dk), üç farklı sıvı-katı oranı (10–20–40 g/ml), üç farklı su miktarı (10 – 20 – 30 %) ve kolin klorür bazlı üç farklı DÖÇ çözeltisi (ChCl: formik asit, ChCl: Üre, ChCl: Et-gly) uygulanmıştır.

Karaçam odun ve budaklarına ait odun ana bileşenleri genel olarak birbirine yakın değer bulunmuştur. Odun ve budak değerleri sırasıyla holoselüloz için % 76,4 – 75,6, α -selüloz %48,9 – 47,9, lignin %27,5 – 25,8 tespit edilmiştir. Ekstraksiyon sonuçları ise odun (% 3,5 – 4,5) ve budak (% 14- 25) arasında oldukça farklıdır.

Karaçam budaklarında bulunan stilbenlerin (pinosilvin-PS ve pinosilvinmonometileter-PSMME) DÖÇ'lerle geri kazanılmasında sırası ile katı-sıvı oranı, ekstraksiyon yöntemi, DÖÇ türü, ekstraksiyon süresi etkili olmaktadır. PS ve PSMME maddelerine ait optimum koşullar ultrason banyosunda kolin klorür:etilen glikol (1:2 Molar) DÖÇ karışımıyla %30 su ilavesi ve %10 katı-sıvı oranında 60 dakika süreyle 70 °C'de ekstraksiyon olarak belirlenmiştir.

Yukarıda belirtilen koşullarda PS değeri 230 ppm, PSMME değeri ise 489 ppm olarak tespit edilmiştir. Sıralı ekstraksiyonda bu değerler sırasıyla n-hekzan için 0-195 ppm ve aseton:su (95:5 v/v) için 46,3-75,3 ppm ölçülmüştür.

Derin ötektik çözücülerle budaklardaki stilbenler klasik ekstraksiyon yöntemi ve çözücülere göre PS için 5 kat, PSMME için ise 2,5 ile 6,5 kat oranlarında daha fazla geri kazanılabilmektedir. Ayrıca DÖÇ'lerde sadece 1-gram örnek kullanılmıştır. Çözücü miktarı ise sadece 7 ml DÖÇ olmuştur. Ekstarksiyon süresi 60 dakikadır. Bütün bu koşullar dikkate alındığında gıda sanayinde ve farmakolojide kullanım alanı olan stilbenlerin çevre dostu yeşil kimyasallarla elde edilmesinin daha uygun olacağı kanatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Derin Ötektik Çözücüler; Stilbenler; *P. nigra*; Stilbenlerin kimyasal analizi.

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

OPTAINING OF STILBENS WITH DEEP EUTECTIC SOLVENTS (DES) FROM KNOT OF *PINUS NIGRA*

Öznur ÇAKAL

Bartın University

Graduate School

Department of Forest Industry Engineering

Thesis Advisor: Assoc. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ

Bartın-2021, pp: 132

In this study, Black pine (*Pinus nigra*) stem wood and knots with a diameter of 32 cm and age range of 25-30, obtained from Abdipaşa- Ulus Forestry Management Directory, were used. Holocellulose, alpha-cellulose, lignin and sequential extraction (n-hexane, acetone:water) was applied to stem wood and knots. In addition, pinoslyvin and pinoslyvinmonomethylether were determined in the knotwood using deep eutechic solvents (DES) using ultrason bath and hot-water bath.

In DES experiments, 1 gram of knotwood was used with two different temperatures (60°C – 70 °C), two different time (30 – 60 min.), three different solid:liquid ratio (10 – 20 – 40 g/ml), three different water content (10 – 20 – 30 %) and choline-chloride based three different DES mixture (ChCl: formic acid, ChCl: Urea, ChCl: Et-gly).

Chemical composition of stem wood and knot wood of Black-pine were found similar to each other. Stem and knot wood values are 76,4–75,6 % for holocellulose, 48,9–47,9 % for α -cellulose and 27,5 – 25,8 % for lignin respectively. However, extraction results are quite different between stem (3,5 – 4,5 %) and knot wood (14- 25 %).

In the recovery of stilbenes (pinoslyvin -PS and pinoslyvinmonomethylether –PSMME)

with DES applications solid:liquid ratio, extraction method, DES type, extraction time are effective respectively. Optimum conditions for recovering of PS and PSMME were determined as applying ChCl: Et-gly (1:2) in ultrason bath for 60 min at 70 °C, 10 % solid:liquid ratio with 30 % water content.

According to the conditions mentioned above, PS was found 230 ppm and PSMME as 489 ppm. In the sequential extraction these values were measured as 0-195 ppm and 46,3-75,3 ppm for acetone:water (95:5 v/v) respectively.

With deep eutectic solvents, stilbenes in knot woods can be recovered 5 times more for PS and 2,5-6,5 times for PSMME compared to conventional extraction method and solvents. In addition, only 1 gram sample was used with DES. The amount of used DES solvent was only 7 mL and extraction time 1 hour. Considering all these conditions, it was concluded that it would be more appropriate to obtained stilbenes with environmentally friendly green chemicals.

Keywords: Derin Ötektik Çözücüler; Stilbenler; *P. nigra*; Stilbenlerin kimyasal analizi.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	ii
BEYANNAME	iii
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
EKLER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Genel Bilgiler.....	1
1.2 Çalışmanın Amacı.....	2
1.3 Karaçam (<i>P. nigra</i>) Hakkında Genel bilgiler.....	2
1.3.1 Karaçam (<i>P. nigra</i>) Sistematikteki Yeri	2
1.3.2 Karaçam (<i>P. nigra</i>) Yayılış Alanları	3
1.3.3 Karaçam (<i>P. nigra</i>) Anatomik Özellikleri	6
1.3.4 Karaçam (<i>P. nigra</i>) Kimyasal Özellikleri.....	9
1.4 Odun Kusurları.....	11
1.5 Fenolik Bileşikler	15
1.5.1 Lignanlar	18
1.5.2 Flavonoidler	19
1.5.3 Stilbenler.....	19
1.5.3.1 Stilbenlerin Kullanım Alanları.....	25
1.5.4 Tanenler.....	25
1.5.4.1 Hidrolize Tanenler.....	27
1.5.4.2 Kondanse Tanenler.....	27
1.6 Derin Ötektik Çözücüler.....	27
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	35
2.1 Karaçam Gövde Odunu ve Budaklardaki Stilbenlerin DÖÇ'ler ile Geri Kazanılması ile İlgili Yapılan Çalışmalar	35
3. MATERYAL VE METOT	44

3.1 Materyal	44
3.2 Metot.....	46
3.2.1 Odun Ana Bileşenlerinin Belirlenmesi	47
3.2.2 Yaş Halkası Sayımı.....	49
3.2.3 Kimyasal Analizler	49
3.2.3.1 Odun Ana Bileşenlerinin Belirlenmesi	49
3.2.3.2 Çözünürlük Değerlerinin Belirlenmesi.....	49
3.2.3.3 Ultrason Banyosunda Ekstraksiyon.....	50
3.2.3.4 Sıcak Su Banyosunda Ekstraksiyon.....	51
3.2.4 Kalitatif ve Kantitatif Analizler	51
3.2.5 Verilerin İstatistiksel Analizi.....	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR.....	55
4.1 Karaçam Odun Ana Bileşenlerine Ait Bulgular	55
4.2 Çözünürlük Değerlerine Ait Bulgular	56
4.3 Derin Ötektik Çözücülere (DÖÇ) Ait Bulgular	58
4.3.1 Karaçam Budaklarından Farklı DÖÇ'lerle Elde Edilen PS Bulguları	58
4.3.1.1 Karaçam Budaklarından ChI:Et-glc kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları.....	61
4.3.1.2 Karaçam Budaklarından ChCl:FA kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları.....	65
4.3.1.3 Karaçam Budaklarından ChCl:Üre kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları.....	69
4.3.1.4 Karaçam Budaklarından ChCl:Et-glc kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları.....	70
4.3.1.5 Karaçam Budaklarından ChCl:FA kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları.....	73
4.3.1.6 Karaçam Budaklarından ChCl:Üre kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları.....	77
4.3.2 Karaçam Budaklarından Farklı DÖÇ'lerle Elde Edilen PSMME Bulguları.....	80
4.3.2.1 Karaçam Budaklarından ChCl:Et-glc kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları	82
4.3.2.2 Karaçam Budaklarından ChCl:FA kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları	86
4.3.2.3 Karaçam Budaklarından ChCl:Üre kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde	

edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları	88
4.3.2.4 Karaçam Budaklarından ChCl:Et-glc kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları	90
4.3.2.5 Karaçam Budaklarından ChCl:FA kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları	93
4.3.2.6 Karaçam Budaklarından ChCl:Üre kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları	97
4.4 Optimizasyon Yöntemiyle Sonuçların Değerlendirilmesi.....	100
4.4.1 Parametrelerin Deneysel Tasarım Sonuçlarının Değerlendirilmesi	100
4.4.1.1 PS İÇİN SONUÇLAR	100
4.4.1.2 PSMME İÇİN SONUÇLAR.....	106
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	113
KAYNAKLAR.....	117
EKLER	122
ÖZGEÇMİŞ.....	132

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
1.1: Ülkemizdeki Karaçam yayılış haritası.	6
1.2: Karaçam (<i>P. nigra</i>) türüne ait bir görsel (Fotograf: Öznur ÇAKAL,2021).....	7
1.3: Karaçam (<i>P. nigra</i>) türüne ait gövde, yaprak ve kozalak görsel (Fotograf: Öznur ÇAKAL,2021).....	9
1.4: Bir fenol ünitesine ait kimyasal yapı.	15
1.5: Fenolik Bileşiklerin gruplandırılması. (Çizim: Öznur ÇAKAL,2020)	16
1.6: Pinosilvin sentezine ait reaksiyon zinciri. (Nisula ,2003).....	20
1.7: Odunda yaygın olarak bulunan stilbenler (Nisula, 2018)	22
1.8: Stilbenin enine kesitte dağılımı	23
1.9: Resveratrol'a ait kimyasal yapı.....	24
1.10: İki Bileşenli bir faz diyagramında ötektik noktanın gösterimi. (Abbott vd.,2014)	29
1.11: Kolin klorür kimyasal yapısı	32
1.12: Formik asit kimyasal yapısı.....	33
1.13: Etilen glikol kimyasal yapısı	33
1.14: Üre kimyasal yapısı.....	34
3.1: Karaçam numunesi (Fotoğraf : Öznur ÇAKAL,2018).....	44
3.2: Deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmış DÖÇ karışımları	45
3.3: Karaçam budaklarına ait deney akış şeması.....	46
3.4:Gövde odunun budak bölümlerinden ayrılması.(Fotoğraf : Öznur ÇAKAL,2018).....	48
3.5: Odun ve budak örneklerine ait kibrit çöpü eldesi ve öğütme işlemi.....	48
3.6: Budak-23, 24, 27 yaş halkası sayımı (Fotoğraf: Öznur ÇAKAL,2019)	49
3.7: Soxhlet Ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlar (Fotograf: Öznur ÇAKAL, 2018)	50
3.8: Ultrason banyosu öncesi Karaçam budak numunesi ve DÖÇ karışımı (Fotograf: Öznur ÇAKAL, 2020).....	50
3.9: Santrifüj işlemi ile katı-sıvı faz farkı elde edilen DÖÇ çözeltisi (Fotograf: Öznur ÇAKAL, 2020).....	51
3.10: DÖÇ çözeltisi için filtreleme işlemi (Fotograf: Öznur ÇAKAL, 2020)	52

4.1: Karaçam budaklarından elde edilen PS değerlerinin ortalamaları	61
4.2: SSB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PS değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi	64
4.3: SSB’de ChCl:FA ile elde edilen PS değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi.....	68
4.4: USB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PS değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi.....	72
4.5: USB’de ChCl:FA ile elde edilen PS değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi.	76
4.6: Karaçam budaklarından elde edilen PSMME değerlerinin ortalamaları	82
4.7: SSB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi.....	85
4.8: SSB’de ChCl:FA ile elde edilen PSMME değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi	88
4.9: USB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi	93
4.10: USB’de ChCl:FA ile elde edilen PSMME değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi	96
4.11: Pareto Analizi.....	100
4.12: PS’ye etki eden faktörler	105
4.13: PS değişkeni, sıvı-katı ve sıcaklık değişkenlerine ait üç boyutlu grafik.....	105
4.14: Pareto Analizi.....	106
4.15: PSMME’ye etki eden faktörler	111
4.16: PSMME değişkeni, sıvı katı ve sıcaklık değişkenlerine ait üç boyutlu grafik.....	111
4.17: PSMME değişkeni, su ve süre değişkenlerine ait üç boyutlu grafik.....	112

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
1.1: İğne yapraklı ağaçların ormanlık alanları Ağaç türleri Orman alanı (ha) (Anon 1987)	5
1.2: Karaçamın alansal dağılımı.....	5
1.3: Karaçam odun ana bileşenleri ve çözünürlük değerlerine ait literatür sonuçları (%).....	9
1.4: Odun kusurları. (Berkel, 1970 ve Aytuğ, 1979).....	11
1.5: DÖÇ hazırlamak için önerilen dört farklı kombinasyon (Abbott vd., 2003).	30
1.6: DÖÇ çeşitleri ve Molar Derişim Oranları (Wu, 2020).....	31
2.1: Sarıçam ve Ladin özodunu ve budaklarda belirlenen stilben miktarları (%) (Hovelstad vd.,2006).....	38
2.2: Melez türüne ait farklı noktalardan alınan örneklerin aseton/su ekstrak içeriği (Wagner vd., 2020).	42
2.3: Sarıçam diri odun, dış öz odun, orta öz odun ve budaklarda bulunan ekstraktifler (mg/g kuru odun).....	43
3.1: Deneylerde kullanılan DÖÇ çözeltileri ve mol oranları	45
3.2: Karaçam budaklarına uygulanan deney şablonu	47
3.3: HPLC-DAD Cihaz Analiz Şartları	53
4.1: Karaçam (<i>P. nigra</i>) numunesine ait kimyasal analiz sonuçları (%)	55
4.2: Karaçam budaklarına ait n-hekzan ekstraktına ait GC-MS analiz sonuçları.	56
4.3: Karaçam budaklarına ait aseton:su ekstraktına ait GC-MS analiz sonuçları.	56
4.4: Karaçam budaklarına ait sıralı ekstraksiyon HPLC sonuçları (ppm = mg/L).....	57
4.5: Sıcak su banyosunda Karaçam budaklarından elde edilen PS değerleri	59
4.6: Ultrason su banyosunda Karaçam budaklarından elde edilen PS değerleri (ppm)	60
4.7: Chl:Et:glc kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi	62
4.8: Su Miktarının SSB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi.	63
4.9: Katı-Sıvı oranının SSB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi.....	64
4.10: ChCl:FA kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi	66
4.11: Su Miktarının SSB’da ChCl:FA ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi.....	67
4.12: Katı-Sıvı oranının SSB’da ChCl:FA ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi	68
4.13: ChCl:Üre kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans	

Analizi.....	69
4.14: ChCl:Et-glc kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS miktarına ait Varyans Analizi.....	70
4.15: USB’de Et:gly için Su Miktarının çoklu karşılaştırılması	71
4.16: Katı-Sıvı oranının USB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi	72
4.17: ChCl:FA kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi.....	74
4.18: Su Miktarının USB’da ChCl:FA ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi	75
4.19: Katı-Sıvı oranının USB’da ChCl:FA ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi	76
4.20: ChCl:Üre kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi.....	78
4.21: Su Miktarının USB’da ChCl:Üre ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi	79
4.22: Katı Sıvı Oranının USB’da ChCl:Üre ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi.....	79
4.23: Sıcak su banyosunda Karaçam budaklarından elde edilen PSMME değerleri (ppm).....	80
4.24: Ultrason banyosunda Karaçam budaklarından elde edilen PSMME değerleri (ppm).....	81
4.25: ChCl:Et-glc kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi.....	83
4.26: Su Miktarının SSB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME’ye ait Tukey testi.....	84
4.27: Katı-Sıvı oranının SSB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME’ye ait Tukey testi	85
4.28: ChCl:FA kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi.....	86
4.29: Su Miktarının SSB’da ChCl:FA ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi	87
4.30: Katı-Sıvı oranının SSB’da ChCl:FA ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi.....	87
4.31: ChCl:Üre kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi.....	89
4.32: Su Miktarının SSB’da ChCl:Üre ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi	90
4.33: ChCl:Et-glc kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME miktarına ait Varyans Analizi.....	91
4.34: Su miktarının USB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi.....	92
4.35: Katı-Sıvı oranının USB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME’ye ait Tukey testi	92

4.36: ChCl:FA kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi.....	94
4.37: Su Miktarının USB’da ChCl:FA ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi.....	95
4.38: Katı-Sıvı oranının USB’da ChCl:FA ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi	96
4.39: ChCl:Üre kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi.....	98
4.40: Su Miktarının USB’da ChCl:Üre ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi.....	99
4.41: Katı Sıvı Oranının USB’da ChCl:Üre ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi	99
4.42: Verilerin varyans analizi	101
4.43: PS değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin regresyon katsayılarına ilişkin sonuçlar.....	103
4.44: Kullanılan formüller.....	104
4.45: PS’nin en verimli olduğu değerler	105
4.46: PSMME değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin varyans	107
4.47: PSMME değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin regresyon	109
4.48: Kullanılan formüller.....	110
4.49: PSMME’nin en verimli olduğu değerler.....	111
5.1: Sonuçların en verimli olduğu değerler.....	115

EKLER DİZİNİ

Ek	Sayfa
No	No
Ek 1. 1-B-1-SSB-30dk-60C-10ml-1CH-2FA	122
Ek 2. 1-B-2-SSB-60dk-60C-10ml-1CH-2FA	123
Ek 3. 1-B-3-USB-30dk-70C-10ml-1CH-2Et-gly	124
Ek 4. 1-B-4-SSB-60dk-70C-10ml-1CH-2FA	125
Ek 5. 1-B-5-SSB-30dk-60C-20ml-1CH-2Et-gly	126
Ek 6. 1-B-1-USB-30dk-60C-10ml-1CH-2Et-gly	127
Ek 7. 1-B-2-USB-60dk-60C-10ml-1CH-2Et-gly	128
Ek 8. 1-B-3-USB-30dk-70C-10ml-1CH-2Et-gly	129
Ek 9. 1-B-4-USB-60dk-70C-10ml-1CH-2Et-gly	130
Ek 10. 1-B-5-USB-30dk-60C-20ml-1CH-2Et-gly	131

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ha	: hektar
pm	: pikometre
ppm	: milyonda bir birim

KISALTMALAR

CBS	: Coğrafi Bilgi Sistemleri
ChCl	: Kolin Klorür
DÖÇ	: Derin Ötektik Çözücüler
Et-gly	: Etilen glikol
FA	: Formik Asit
HBA	: Hidrojen alıcı
HBD	: Hidrojen verici
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
İYA	: İğne yapraklı ağaç
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LDL	: Donsiteli Lipoprotein Kolesterol
OGM	: Orman Genel Müdürlüğü
PS	: Pinosilvin
PSMME	: Pinosilvin monometileter
SSB	: Sıcak Su Banyosu
USB	: Ultrason Banyosu
UV	: Ultraviyole
YA	: Yapraklı Ağaç

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler

Yaşadığı çevre üzerinde yarattığı olumsuz etkileri giderek artan oranda daha fazla hissetmeye başlayan insanoğlu, yine kendisi bu olumsuzluklardan kurtulmak için yeşil, yenilenebilir, sürdürülebilir ve akıllı terimleri altında birçok alanda çalışmalar yürütmektedir. Yeşil kimyada, bu alanlardan biri olup organik çözücülerin yarattığı çevre kirliliğini azaltmayı hedeflemektedir.

1990'ların başında ilk kez dile getirilen yeşil kimya, 12 kuraldan oluşmakta ve temel prensibi atık oluşturmamaya dayanmaktadır. Günümüzde, devletler oluşan çevre kirliliklerinin azaltılması için büyük bütçeler harcamaktadır. Bu da tüm dünyada yeşil kimyaya olan ilgiyi artırmıştır. Derin ötektik çözücüler (DÖÇ), petrol bazlı organik çözücüler yerine alternatif olarak düşünülen yeşil kimyanın önemli elementleridir. DÖÇ'lerle ilgili geniş bilgi ilerleyen bölümlerde verilmiştir. Yeşil kimyanın, kurallarından bir diğeri de yenilenebilir hammaddeler için daha yeşil sentezledir. Bu noktadan hareketle biyokütle (lignoselülozik madde) yenilenebilir hammadde kapsamında önemli bir potansiyeldir. Özellikle, kâğıt ve levha sektörlerinde geniş ölçüde kullanılmaktadır.

Budaklar, odun hammaddesinin kullanımını kısıtlayan oluşumlardır. Özellikle bazı endüstri alanlarında düşen budaklar istenmez. Oysa budaklar içerdikleri lignan ve stilben grubu maddeler ile ağacı koruma görevini üstlenmişlerdir. Stilbenler özellikle çam türü ağaçlarda bulunmakta olup normal gövde odununa göre budak kısımlarında % 12 kadar çıkmaktadırlar. Son yıllarda stilbenlerin gıda ve farmakoloji gibi alanlarda koruyucu olarak kullanımları artmaktadır. Ancak bu maddelerin geri kazanılmasında kullanılan organik çözücü kalıntıları stilbenlerin kullanımını kısıtlamaktadır. Bu noktadan hareketle çevre dostu, toksit olmayan DÖÇ çözücülerini kullanarak budaklardaki stilbenlerin geri kazanılması hedeflenmiştir.

1.2 Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, Karaçam (*Pinus nigra*) gövde odununda bulunan budaklardaki stilbenleri (pinoslyvine ve pinoslyvinemonometileter) nontoksit, ucuz ve hazırlanması kolay derin ötektik çözücüler (DÖÇ) kullanılarak daha yüksek bir verimle elde edilebilirliğinin incelenmesidir. Günümüzde farklı ağaç türlerine ait budaklardan organik çözücüler kullanılarak stilbenler elde edilmektedir. Çalışma kapsamında Batı Karadeniz Bölgesinde doğal yayılış yapan karaçam ağaç türü tercih edilmiştir. Ayrıca, hidrojen verici (HBD) olarak kolin klorür ve hidrojen alıcı (HBA) olarak ta formik asit, üre ve etilen glikol kullanılarak 3 farklı DÖÇ karışımı kullanılmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında DÖÇ üzerine bazı faktörlerin etkili olduğu görülmüş bu nedenle deney deseni oluştururken iki farklı muamele sıcaklığı (60 °C -70 °C), iki farklı muamele süresi (30-60 dk.), üç farklı katı:sıvı oranı (10-20-40 g/mL), üç farklı su miktarı (10-20-30 %) ve iki farklı muamele yöntemi (Ultrason ve sıcak su banyoları) seçilmiştir. Kontrol amacıyla sokselet cihazında sıralı ekstraksiyon yapılmıştır. Örneklerin HPLC’de kantitatif analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Box-Behnken optimizasyon yöntemi ile değerlendirilmiş ve budaklardan stilben eldesi için uygun koşullar belirlenmiştir.

1.3 Karaçam (*P. nigra*) Hakkında Genel bilgiler

Karaçamın sistematikteki yeri, yayılış alanları, anatomik özellikleri, kimyasal özellikleri ve kullanım alanları bu bölümde ele alınmıştır.

1.3.1 Karaçam (*P. nigra*) Sistematikteki Yeri

Karaçam (*Pinus nigra* L.), Pinaceae familyası içinde yer alan oldukça geniş bir yayılışa sahiptir. Farklı ülkelerde pek çok araştırmaya konu olmuştur (Doğu ve Yılğör, 2001).

1785 yılında Avusturyalı botanikçi Arnold tarafından sarıçamdan ayırt edilerek *Pinus nigra* adı verilmiştir. Varyabilitesinin fazla olması nedeniyle Karaçam pek çok farklı isimle tanımlanmıştır ve sistematığı dinamik bir şekilde değişim göstermektedir (Röhrig, 1956).

1986 yılında Alptekin tarafından yapılan çalışmaya kadar türün taksonomisinde karşılaşılan güçlükler alt türe de yansımış ve günümüze değin bazı araştırmacıların

Anadolu'daki gözlem ve tespitlerine dayanarak yaptıkları çalışmalar dışında Anadolu karaçamında yapılmış detaylı bir taksonomik araştırmaya rastlanmamıştır. Önceki yıllarda tanımlanan varyete *zhukovkiana* ve varyete *fenzlii*'nin varyete olarak ayırabilecek ölçüde bir farklılığa sahip olmadıkları bu çalışma ile belirlenmiştir. Aynı çalışmada, Anadolu karaçamının ülkemizdeki alanlarından ayrıldıkları ve Türkiye'deki varyete olarak ayrılmış toplumların varyete *şeneriana*, varyete *pyramidata* ve varyete *pallasiana* olarak alt tür içinde farklı bir konuma sahip oldukları Türkiye dışındaki alanlarla kıyaslanarak ortaya konmuştur. Sinop-Boyabat bölgesinde çok uzun iğne yapraklı ve çok büyük kozalaklı karaçam fertlerine "varyete *yaltnkiana* alptekin" adı verilmiştir (Doğu ve Yılğör, 2001).

Özellikle büyüme formu açısından çok kesin olarak ayırtedilebilen varyete *şeneriana saatcioğlu* literatüre kazandırılmıştır (Saatcioğlu, 1955).

Acatay (1956) tarafından Kütahya Tavşanlı dolaylarında doğal yetişen, Ehrami Serviyindiran bir karaçam taksonu *Pinus nigra* var. *pyramidata* olarak tanımlanmıştır. Ülkemizin endemik bir varyetesi olması nedeniyle ayrı bir öneme sahip olan bu varyete, görünüş olarak piramidal bir forma sahiptir ve yan dallar gövdeden yukarıya doğru dar bir açı ile çıkmaktadır.

Karaçam, orman endüstri alanında tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de oldukça önem arz eden *Pinaceae* familyasına ait iğne yapraklı orman ağacı türüdür. Karaçamın dünya genelinde 13 cinsi ve 200'den fazla takson bulunurken, ülkemizde ise bu türe ait *Pinaceae* familyasında 4 cins, bu cinse mensup 9 tür ve bu türlere bağlı 22 takson bulunmaktadır (Roushfort, 2000; Yaltırık ve Akkemik, 2011).

1.3.2 Karaçam (*P. nigra*) Yayılış Alanları

Türkiye, ılıman kıta ve Akdeniz iklimlerinin kesişme bölgesindeki coğrafi konumu nedeniyle, ülkenin farklı bölgelerinde yetişen iğne yapraklı ağaçlar bakımından zengindir. Türkiye'deki toplam orman alanının yaklaşık yarısı iğne yapraklı ağaçlarla kaplıdır (Muthoo 1997).

Ülkeye hâkim kozalaklı ağaç olan çam beş türle temsil edilmektedir. En geniş yayılışı olan tür, Akdeniz Ege bölgesi, Marmara bölgesi ve batı Karadeniz kıyılarının bazı yerlerinde yaklaşık 3 milyon ha alanla yaygın olarak büyüyen *Pinus brutia* Ten.dir (Anon 1987).

Yine bir diğ er h akim  am türü, 2 mha'dan fazlasını kapsayan Kuzey Anadolu, Ege ve Akdeniz ilçelerinin i  kesimlerinde yaygın olarak görülen *P. nigra Arn.*'dir (Anon 1987).

Ülkemizde kızıl amdan sonra en geniş yayılı  alanına (4.693.059,6 ha) sahip t rd  Karaçam (*Pinus nigra Arnold.*), 400-2100 m rakıma kadar çıkabilen, 40 m boy ve 1 m'den fazla çap yapabilen düzgün gövdeli bir türdür. Dona ve kuraklığa karşı dayanıklı olan bu tür, sert ve reçineli bir oduna sahiptir (OGM, 2015). İ aat kerestesi, do rama, tel-travers, ambalaj sandığı, k  ıt hamuru üretimi ve kontraplak üretiminde kullanılmaktadır.

P. sylvestris L., Anadolu'nun kuzey kesimlerinde görülmektedir. *P. pinea L.*'nin dağılımı sınırlıdır ve esas olarak Ege bölgesinde görülür. *P. halepensis Mill.* sadece doğu Akdeniz bölgesinin sınırlı bir bölgesinde bulunur.

Göknar iki tür ve be  alt türle temsil edilmektedir. Bunlar, *Abies nordmanniana (Stev.) Spach. subsp.* Karadeniz bölgesinin doğu kesiminde meydana gelen *nordmanniana*, *A. nordmanniana (Stev.) Spach. subsp.* Karadeniz bölgesinin batı kesiminde ve Marmara ilçesinde *bornmülleriana*; *A. nordmanniana (Stev.) Spach. subsp. equitrojani*, Ege bölgesinin kuzeybatı noktasındaki Kazda ı'nda, Troya bölgesi yakınında antik Frigya – Mysia'da; *A. cilicica (Ant. Ve Kotschy.) Carr. subsp cilicica* ve Toros dağlarında *A. cilicica (Ant. et Kotschy.) Carr. subsp.*'dir (An ın ve  zkan 1993). *Picea orientalis L.*, Doğu Karadeniz bölgesindeki dağlarda yüksek rakımlarda yeti ir. *Cedrus libani A. Rich.* ağırlıklı olarak Toros dağlarında bulunur. *Picea orientalis L.*, Doğu Karadeniz bölgesindeki dağlarda yüksek rakımlarda yetişmektedir. *Cedrus libani A. Rich.* ise ağırlıklı olarak Toros dağlarında bulunur (Anon 1987). Tablo 1.1'de i ne yapraklı ağaçların ormanlık alanları Ağaç türleri Orman alanı (ha) (Anon, 1987) belirtilmektedir.

Tablo 1.1: İğne yapraklı ağaçların ormanlık alanları Ağaç türleri Orman alanı (ha) (Anon 1987)

Ağaç türleri	Orman alanı (ha)
<i>Pinus brutia</i>	3,096,064
<i>Pinus nigra</i>	2,204,381
<i>Pinus sylvestris</i>	738,192
<i>Pinus pinea</i>	20,549
<i>Pinus halepensis</i>	360
<i>Abies species</i>	183,88
<i>Picea orientalis</i>	135,959
<i>Cedrus libani</i>	99,325
<i>Juniperus sp.</i>	925,822
<i>Cupressus sempervirens</i>	1,315

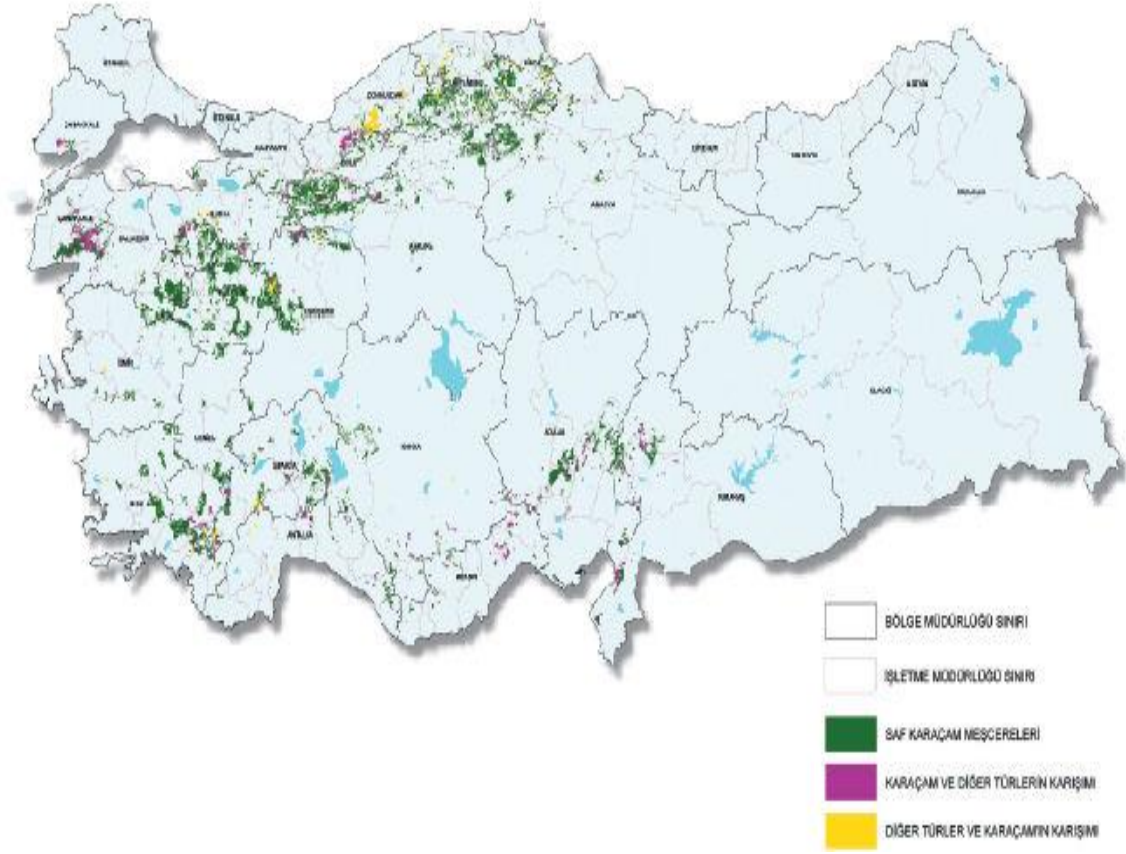
Türkiye’de mevcudiyet gösteren Karaçam, Trakya, Kuzey, Güney, Batı ve Orta Anadolu bölgelerinde ve Karadeniz’in batı kısımlarında saf ve karışık ormanlar kurmaktadır (Merev N, 2003).

Karaçamın alansal dağılımı Tablo 1.2’de verilmektedir.

Tablo 1.2: Karaçamın alansal dağılımı
(URL-1, 2021)

KARAÇAM’IN ALANSAL DAĞILIM		
Normal (ha)	Bozuk (Ha)	TOPLAM (Ha)
2.580.193,0	2.112.866,6	4.693.059,6

Ülkemizdeki Karaçam yayılış haritası Şekil 1.1’de verilmiştir.



Şekil 1.1: Ülkemizdeki Karaçam yayılış haritası.
(OGM Bilgi Sistemleri Dairesi Başkanlığı, CBS Şube Müdürlüğü,2012)
(URL-2, 2021)

1.3.3 Karaçam (*P. nigra*) Anatomik Özellikleri

Dar yıllık halkalarında ilkbahar-yaz odunu geçişi ani olan Karaçamda özodunu belirgindir. Sarıçamın anatomik özellikleri bakımından benzerlik gösterirken özışını yükseklikleri açısından farklıdır. Karaçamda 10 hücreyi geçmeyen bir özışın yüksekliği mevcuttur. Bu özellikleri vasıtasıyla Sarıçamdan ayırt edilir. Testere dişi gibi kalınlaşmış enine traheitlere sahiptir. Kalınlaşma bölgelerinde pencere şeklinde geçitler mevcuttur (Merev, 2003).

400-2100 metre yükseltide yer alan Karaçam (*P. nigra*) coğrafi olarak geniş yayılışa sahip bir çam türüdür. Ülkemizin hemen hemen her yerinde görülen bu türün yaşlı gövdesi derin

çatlkaklı kabukları ise kalın ve boz renklidir. Silindir şeklinde düzgün gövdesi 1 metreden çok çap yapabilir. Boyu ise 40 metreye kadar ulaşabilir. Tepe yapısı, azman yapabilme yeteneğine sahip olmasına karşın, sık meşcereler ve yüksek mıntikalarda dar ve küçük olamayı tercih eder. İlk yıllarında büyüme seyri hızlıdır.



Şekil 1.2: Karaçam (*P. nigra*) türüne ait bir görsel (Fotograf: Öznur ÇAKAL,2021)

Doğu ve Yılğör (2001), *Pinus nigra* var. *pallasiana* ve var. *pyramidata* örnekleri ile yapılan çalışmada makroskopik olarak her iki varyetede diri odun sarımsı ya da kırmızımsı beyaz renkte, öz odun ise kırmızımsı renkte olduğu belirlenmiştir. Yıllık halka sınırları belirgin, ilkbahar odunundan yaz odununa geçiş ise anidir. Öz ışınları çok ince olup, lup yardımı ile görülememektedir. Reçine kanalları özellikle yaz odunu tabakası içinde bulunmaktadır. Odunu mat, sert ve orta ağırlıkta olup dekoratif bir görünüşe sahiptir. Aynı çalışmada iki varyete üzerinde mikroskobik incelemelerde yapılmıştır. Her iki varyeteye ait mikroskopik özellikler; enine, radyal ve teğet kesitlerde incelenmiş. Bu sonuçlara göre genel olarak, Boyuna reçine kanallarının mırü'deki sayılarının belirlenmesi için her

varyetede toplam 40 mm²'lik alan taranmıştır. Varyete *pallasiana*'âa reçine kanalına rastlanılan alanlarda mm²'deki sayısının 1-5 adet, varyete *pyram idata*'da ise 1-4 arasında değiştiği, en fazla tekrarlanan reçine kanalı sayısının her iki varyetede de 1-2 adet olduğu belirtilmiştir. Geçit çapları yaz odunu tabakasında da ölçülmüş, boyuna traheidlerin radyal çeperleri üzerindeki kenarlı geçitlerin ortalama çapları varyete *pallasiana*'âa 11 µm varyete *pyram idata*'da 11 µm, öz ışını traheidi kenarlı geçitlerinin ortalama çapları ise yukarıdaki sıraya göre 7 µm ve 8 µm olarak tespit edilmiştir. Boyuna traheidlerle öz ışını paranşim hücrelerinin karşılaşma yerindeki geçitlerin ortalama çapları varyete *pallasiana*'âa 14 µm, varyete *pyram idata*'da 17 µm olduğu belirlenmiştir. Karşılaşma yeri geçitleri her iki varyetede de pencere tipinde ve 1-3 adet arasında olup, karşılaşma alanlarında en çok 1 adet geçite rastlanmıştır. Boyuna traheidlerin radyal çeperleri üzerindeki kenarlı geçitler her iki varyetede de genellikle tek sıralı olup nadiren iki sıralı geçitlere rastlanmıştır.

Sonuç olarak; yapılan incelemelerde, her iki varyetenin anatomik yapı bakımından benzer olduğu, asıl farklılığın hücrelerin boyutsal özelliklerinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Literatürde aynı tür ağaçlarda, hatta aynı ağacın değişik bölümlerinden temin edilen odun örneklerinde yapılan analizlerde farklı boyutsal, fiziksel, mekanik ve kimyasal özelliklerin spesifik olduğu belirtilmektedir. Odun yapısındaki bu değişimlerin gözlenmesinde ağacın yaşı, genetik özellikleri, coğrafik şartlar ve çevre faktörleri gibi birçok etmen oldukça önemlidir (Bozkurt, 2000).



Şekil 1.3: Karaçam (*P. nigra*) türüne ait gövde, yaprak ve kozalak görsel (Fotograf: Öznur ÇAKAL,2021)

1.3.4 Karaçam (*P. nigra*) Kimyasal Özellikleri

Karaçam odun ana bileşenleri ve çözünürlük değerlerine ait bazı literatür sonuçları (%) Tablo 1.3'te verilmiştir.

Tablo 1.3: Karaçam odun ana bileşenleri ve çözünürlük değerlerine ait literatür sonuçları (%)

Kaynak	Holoselüloz	Selüloz	Lignin	Sıcak su	Soğuk su	%1 NaOH
Alkan, Ç. (2004)	65,7	45,6	25,7	2,96	4,64	15,1
Ateş, S. (2004)	72,3	43,5*	26,4	3,17	2,02	13,0
Akyürek, Ş.(2019)	64,6	48,2	34,3	8,68	7,42	19,7
Olgun, Ç. (2019)	71,5	47,3*	22,9	6,71	5,69	4,62

*: α -selüloz değeri.

Tablo 1.3’de görüldüğü gibi karaçam odununa ait selüloz değerleri ortalama %45’in üzerinde olurken lignin değeri ebe karaçamında %34 tespit edilmiştir. Tanvıverdi. H. (2004) tarafından yapılan çalışmada klason lignini %27 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada asit hidrolizi ile UV-VIS bulunan asit çözünür lignin miktarı ise %2,37 olmuştur. Uçar ve Balaban (2003) karaçam odunundaki polisakkaritlere yönelik çalışmalarında %49,2 glukoz, %5 ksiloz, %203 galaktoz, %3 arabinoz ve %14,7 mannoz tespit etmişlerdir.

Hafizoğlu ve Usta (2005) tarafından yapılan çalışmada karaçam diri ve öz odunu kimyasal yapısı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar göre selüloz miktarı diri odunda %57,9, öz odunda ise %55,7 olurken, lignin miktarı ise sırasıyla %28,2 ve %27,9 bulunmuştur. Çözünürlük değerleri ise soğuk su diri odunda %2, öz odunda %3, sıcak su diri odunda %3,2, öz odunda %4,7, diri odunda %1 NaOH çözünürlüğü %10,8, öz odunda %12,2 tespit edilmiştir.

1.4 Odun Kusurları

Genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak odunda bazı yapısal kusurlar meydana gelebilir. Oluşan bu anomaliler odun özellikleri üzerinde değişiklik oluşturabilirler ve bunun sonucunda kullanım alanlarını kısıtlayıcı sonuçlar ortaya çıkartabilirler. Bu nedenle odunda oluşabilecek kusurlar istenilmeyen durumlardır. Bu olumsuz yönlerin aksine dekoratif amaçlı yeni kullanım alanları da ortaya çıkabilir (Merev N. ders notları, 2003). Odun kusurları Tablo 1.4’de sınıflandırılmıştır. (Berkel, 1970 ve Aytuğ, 1979).

Tablo 1.4: Odun kusurları. (Berkel, 1970 ve Aytuğ, 1979)

Odun Kusurları	Çeşit
Ağaç gövdesinde şekil kusurları	-Gövde eğriliği -Çatallı ve çok özlü gövde -Konik gövde
Anatomik yapı ile ilgili kusurlar	-Oluklu gövde -Eksantrik gövde -Özde düzensiz giriş -Yıllık halka düzensizlikleri -Lif kusurları -Kuş gözü ve urlar -Reçine keseleri -Reaksiyon odunu -Yalancı özodunu -Ay halkası -Budaklılık
Dış koşullarla oluşan kusurlar	-Çevre çatlağı -Öz çatlağı -Halka çatlağı -Don çatlağı -Bitkisel ve hayvansal zararlılar -Çevre kirliliği kusurları
Bitkisel ve hayvansal zararlılar	-Mantarlar ve böcekler

Odun kusurları gruplandırılmasında farklı sistematiikler kullanılabilmektedir. Tablo 1.4’de belirtilen gruplandırma ve odun kusurlarının açıklanmasında kullanılan ana başlıklar bu duruma bir örnek oluşturmaktadır.

Bir ağaç kusuru olarak karşımıza çıkan budaklar, bu bölümde daha detaylı ele alınmaktadır.

1.4.1 Budaklar

Tez çalışmasının temel konusunu oluşturan budaklar, çürüklükten sonra kaliteyi etkileyen en önemli odun kusurudur. Kelime anlamı olarak budak, ağacın dal olacak sürgünü olarak nitelendirilmektedir. Ağaç gövdesi içine gömülmüş dalın dip kısmıdır ve her yıl oluşan yıllık halkalar tarafından dalların dip kısımları yani budaklar odun dokusu içine gömülmektedir (Suvi P. vd., 2006).

Budak oluşum sürecinde başka bir ifade ile dalların gövde içerisine gömülmesi sürecinde, ağaç bu kısımları iyileştirmek amacıyla reçine, tanen ve diğer boyalı maddelerle zenginleşmektedir. Bu nedenle budaklar sert, koyu renkli ve mantar zararlılarına karşı daha mukavemetlidirler. Ayrıca, bir ağaç kusuru olarak tanımlansa da budaklar, ağaç içi koruyucu ajanların sentezlendiği mükemmel nitelikli bir bölümdür (Valette vd., 2017).

Budaklar, görüntüleri, renkleri, şekilleri, dokuları ve boyutlarına göre farklı şekillerde sınıflandırılırlar. Yu-Hua Gu vd. (2010) göre budaklar; sağlıklı budaklar, ölü budaklar, siyah budaklar, çürümüş budaklar ve küçük budaklar olarak 5 sınıfa ayrılır. Bunlardan sağlıklı budaklar zararsız olup, daire şeklindedir ve açık bir renge sahiptir. Ölü budaklar ise koyu renklidir. Zararlı olan çürümüş budaklar, koyu renklerinin yanında kararmış bir iç alana sahiptirler. Çapları 7 mm’den büyük olmayan budaklara da küçük budaklar denilmektedir.

Berkel, A. (1970)’e göre ise budaklar 4 gruba ayrılmaktadır. Kaynamış budaklar, Düşen budaklar, çürümüş budaklar ve su sürgünleri. Kaynamış budaklar diğer bir deyişle beyaz budaklar, yaşayan bir dalın zamanla gövde odunu içerisinde kalarak oluşturduğu budaklardır. Düşen budaklar ise siyah budak olarak adlandırılır ve ölü dal çıkıntılarının çap artımı sırasında gövde içine gömülmesi ile oluşur. Düşen budaklar kalite üzerine olumsuz etkiye sahiptir. En fazla Gökmar, Ladin ve Melez’de görülür. Çürük budaklar, çürümüş dalların gövde içerisinde kalmasıyla oluşurlar. Işık azlığı nedeniyle açılmayan

sürgünlerin, şartların değişmesiyle açılmasıyla gövde içinde kalarak su sürgünü budaklarını oluştururlar. Bunlar, grup halinde bulunurlar. Günümüzde, farklı teknolojilerle (mikrodalga, X-ray ışınları vb.) budakların tespiti yapılmaktadır.

Son yıllarda, ağaç ve kâğıt endüstrisinde sıklıkla atılan ağaç budaklarının polifenol üretimi için zengin bir hammadde olduğu bulunmuştur. Kavak budak ağacındaki ana polifenoller yapılan çalışmalar ile bilinmektedir. Budak ağacındaki polifenoller, gıda ve ilaç endüstrileri için büyük bir potansiyel doğal antioksidan kaynağı oluşturmaktadır (Neacsu vd.,2007).

Sert ağaç kullanımı, son yıllarda Avrupa ahşap sektörünün temel endüstriyel ve araştırma zorluklarından biri olmuştur (Vek, 2013).

Endüstriyel yönden birçok önemli ağaç türünün budak odununun hidrofilik özelliklerinin antioksidan nitelikleri farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Bunların başında lipid-peroksidasyon inhibisyonu ve peroksil tutucu kapasite testleri gelmektedir. Sonuçlar, kabuklu hidrofilik ekstraktların antioksidan özellikleri ve budak odunu ekstraktlarından izole edilen saf liganlar ve flavonoidler ile karşılaştırılmıştır. Birkaç ağaç türünden elde edilen düğüm özleri, kabuk özütlerinden daha güçlü antioksidanlardı; bu, aynı zamanda güçlü antioksidanlar olarak da sınıflandırılabilir. Ek olarak, odun özütlerinin çoğunun antioksidan özellikleri, saf bileşiklerden daha güçlüdür. Budak zengin bir doğal antioksidan kaynağı olduğu sonucuna varılmıştır (Nisula, 2018).

İskoç çamındaki (*Pinus sylvestris* L.) budaklara yönelik Willför ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada budakta bulunan ekstraktların ağacı fungal etki, peletasyon ya da mekanik darbelere karşı bir savunma mekanizması olarak üretilen fenolik bileşik kökenli stilbenlerin sentezlenerek ağacın kendini korumaya aldığı saptanmıştır. Ayrıca, ağacın coğrafi konumu ve yaşına bağlı olarak çıkarımsal varyasyonlar ve canlı veya ölü dallı budaklar incelenmiştir. Toplam GC-elüsyonlu hidrofilik ekstrakt miktarı (aseton-su ekstresi, 95:5 v v-1) kuru odunun en fazla %10'u kadardır. Bu materyalin oligolignanlardan (sesqui-, di- ve sesterlignans) oluştuğu öne sürülmüştür. İskoç çamı budaklarının hidrofilik özütlerindeki yüksek molar kütle (HMM) materyali gibi GC içermeyen bileşiklerin karakterizasyonu, tıbbi uygulama potansiyelleri açısından önemlidir.

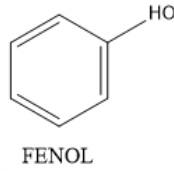
Büyük lipofilik kısmının çıkarıldığı bir etanol özütü, bir prostat kanseri modelinde (Yatkin ve diğerleri 2014) ve yağ dokusu iltihabını ve kilo alımını azaltmada (Polari ve diğerleri 2015) etkili olduğu belirlenmiştir. Bu biyolojik aktiviteden sorumlu bileşikler pinosilvin ve pinosilvin monometil eter (stilbenler) ve nortrakelojenin ve matairesinoldür (lignanlar) (Yatkin ve diğerleri 2014). Bu bileşikler birlikte özütün %22'sini oluşturdu. Ekstredeki diğer GC-yıkayıcı bileşik grupları, modifiye edilmemiş ve oksitlenmiş veya hidroksile reçine asitleridir (RA'lar), bu ekstraktın diğer %22'sini oluşturmaktadır (Yatkin ve ark. 2014). Uzun bir GC kolonundan [silil türevleri olarak yaklaşık 600 Da'ya kadar bir molar kütle (MM) sahip] ayırtıran bileşikler, ekstrakt ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturmakta bu da ekstraktın diğer yarısının HMM bileşiklerinden oluştuğunu göstermektedir (Willför, 2017).

Aynı ekstrakt içindeki HMM materyali bu çalışmada karakterize edildi. Çam özlerindeki GC elüsyonlu bileşiklerden daha büyük moleküllerin tanımlanması açısından yalnızca birkaç çalışma yayınlanmıştır. Uzun yağda, yağ asidi (FA) dimerleri ve RA dimerleri ve trimerler, jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) (Chang 1968) ile ayrıldı. Uzun yağ ziftinde, GC tarafından ayırtılmayan yüksek oranda asit bulundu (Holmbom ve Erä 1978). Bu fraksiyonun, kısmen ester bağları ile bağlanan FA ve RA dimerlerinden oluştuğu öne sürüldü.

Mevcut çalışmada, bir İskoç çamı KnW-EtOH özütü parçalara ayrıldı ve esas olarak HMM malzemesi içeren parçalar, birkaç analitik yöntemle, yani bir buharlaşmalı ışık saçılım detektörüne (HPSEC-ELSD) birleştirilmiş yüksek performanslı boyut dışlama kromatografisi analizi ile karakterize edildi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) - ve direkt infüzyon-elektrosprey iyonizasyon-iyon tutucu kütle spektrometresi (MS) (ESI-IT-MS), direkt infüzyon- ESI-dört kutuplu uçuş süresi MS (ESI-QTOF-MS), GC-MS (Py-GC MS) ile birleştirilmiş piroliz, GC-MS (THM-GC-MS) ile termal yardımcı hidroliz ve metilasyon, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve GC-MS.

1.5 Fenolik Bileşikler

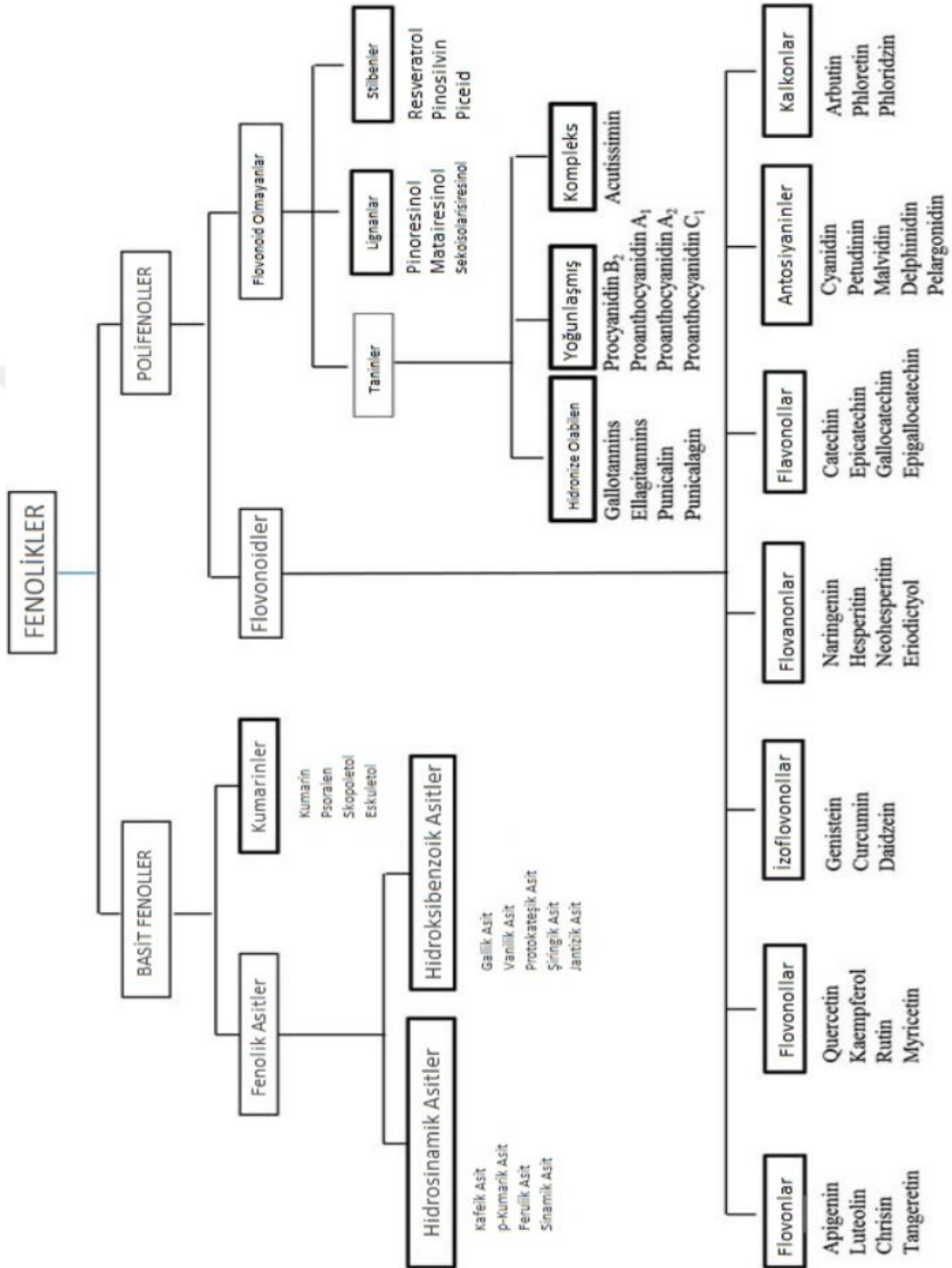
Yapısında bir fenol gurubu bulunan, diğer bir ifade ile aromatik halkasında bir hidroksil grubu ihtiva eden sekonder maddelere fenolik bileşikler veya polifenoller denilmektedir (Şekil 1.4). Fenolik maddeler, bitkisel kaynaklı besinlerin rengine etki eden ve özellikle ağızda buruk bir tat bırakan, meyve ve sebzelerde çok az miktarda bulunan bir madde grubudur.



Şekil 1.4: Bir fenol ünitesine ait kimyasal yapı.

Kimyasal açıdan heterojenlik gösteren bitkisel fenoller, yaklaşık olarak 10.000 kadar bileşiğin yer aldığı bir gruptur. Bazı maddeler suda çözünürken bir kısmı da organik çözücülerde çözünmektedir. Ayrıca, çözünmeyen polifenoller de bulunmaktadır. Bileşiklerin çoğu herbivor ve patojenlere karşı savunma mekanizmasına sahiptir. Fenolik bileşiklerin diğer üyeleri ise aynı ortamı paylaşan rakip bitkilerin büyüme ve gelişimlerini engelleme; polen, meyve ve tohumların yayılmasını sağlayan canlıları çekme veya mekanik destek verme gibi görevlere sahiptirler. Odunsu bitkilerde, ekstraktif maddeler altında yer alan fenolikler, genellikle öz odun ve kabuk kısmında daha fazla bulunurken, diri odunda çok az miktardadır. Mekanik darbelere, fungal saldırılar ve çevresel stres koşullarına (UV radyasyon, patojen vb.) karşı korunma mekanizmasının sonucunda oluşan sekonder metabolitlerdir. (Scheffer ve Cowling, 1966; Sjöström, 1993).

Fenolik Bileşiklerin gruplandırılması Şekil 1.5’de verilmektedir.



Şekil 1.5: Fenolik Bileşiklerin gruplandırılması. (Çizim: Öznur ÇAKAL,2020)

Bioaktif maddeler arasında önemli bir grubu oluşturan fenoller bu özellikleri nedeniyle son yıllarda sıklıkla çalışılmaktadır. Anti-enflamatuar, antimikrobial, antialerjik, antidiyabetik, antiviral vb. özelliklere sahiptirler. Farmakolojinin yanı sıra gıda, kozmetik, paketlenme ve tekstil gibi endüstrilerde kullanılmaktadır (Keşmer, 2020).

Düzenli bir diyet ile fenolik bileşiklerin kanser (özellikle göğüs, cilt, yemek borusu kanserleri), alzheimer, diyabet (Tip-2) gibi ciddi hastalıklara karşı etkili oldukları ifade edilmiştir. Ayrıca, kardiyovasküler hastalıklarda özellikle meyve, sebze ve tahıla dayalı diyet yapanlarda koruyucu oldukları, LDL-kolesterolü düşürdüğü ve damarlarda antiplak potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Huang vd., 2010; Albuquerque vd., 2020).

Gıda endüstrisinde sentetik katkı maddesi kullanımına gelen kısıtlamalar, sektörü doğal bioaktif maddelere yönlendirmiştir. Fenoller bu açıdan son derece zengin maddelerdir. Bu bileşikler peroksit parçalayıcı, singlet oksijen oluşumunu engelleyici ya da azaltıcı, serbest radikal giderici, metal şelatlayıcı özelliklerinin yanında enzim inhibitörü ve sinerjist etki mekanizmalarıyla gıdaları kimyasal ve mikrobiyolojik bozulmalara karşı koruyarak raf ömrünü uzatma gibi özelliklere de sahiptirler. (Nichenametla vd., 2006; Meral vd, 2012).

Kozmetik endüstrisinde de gıda da olduğu gibi doğal katkı maddelerine ilgi artmıştır. Fenolik bileşikler, sahip oldukları kromoforik yapılar nedeniyle ultraviyole ışınlarını absorbe ederek güneş ışınlarının cilde nüfuz etmesini engellemektedirler. Quersetin, resveratrol ve hidrosinamik asit gibi fenolik maddelerin 7-30 arasında değişen güneş koruma faktörüne sahip oldukları ifade edilmiştir. Ayrıca, vücut kremine katılan bir fenolik bileşiğin kırılgılığı azalttığı ve cildi beyazlattığı belirtilmiştir (Albuquerque vd. 2020).

Fenolik bileşiklerin kullanıldığı diğer bir sektörde tekstil alanıdır. Tekstil endüstrisinde kullanılan kimyasallar su kirliliğine sebep olabilmektedir. Fenolik bileşiklerin biyobozunur doğal boyalar şeklinde kullanımı tekstil sektöründe büyük ilgi yaratmıştır. Ayrıca sentetik boyaların neden olduğu alerjik durumlarda engellenmektedir. Meşe kabuğu bu anlamda kullanılan bir materyaldir (Albuquerque vd. 2020).

1.5.1 Lignanlar

Lignanlar, bitkilerde bulunan büyük bir polifenol grubudur. Bu grupta iki yüzden fazla bileşik tanımlanmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda, iki karakteristik fenilpropan kimyasal bileşiminde olup oksidasyon derceleri ve ikame türlerinde fazlasıyla çeşitlilik mevcuttur.

Bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri yine yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Lignanların insanlarda çeşitli farmakolojik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Macrae vd., 1983).

Budakların, yani ağaç gövdelerinin içindeki dal tabanlarının genellikle %5-10 (a / a) lignan içerdiğini ortaya çıkarmıştır (Holmbom vd., 2003).

Bitkisel lignanlar fenilalaninden dimerizasyon ile elde edilmiş folifenolik maddelerdir. Bitkilerdeki lignan ve neolignanların çoğu optik olarak aktiftir ve bitki savunması ve insan sağlığında önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptirler. Yan zincirleri oluşturan yapıların çeşitliliği ve aromatik halkaları ve nedeniyle birçok yapısal lignan türü vardır. Lignanlar, yan zincir tiplerine göre furanofuranlar (veya furofuranlar), tetrahidrofuran, dibenzilbütanlar, dibenzilbütanol ktonlar, ariltetrahidron ftalenler, arilnaftalen ve diğerleri olarak gruplandırılmaktadırlar (Rahman vd., 2007)

Lignan bakımından zengin gıdaların tüketiminin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri fazladır. Bitkilerden sağlanan lignanların çoğu, bağırsak mikroflorası tarafından üst kısımda dönüştürülmektedir. Kalın bağırsaktan enterolakton ve enterodiol, memeli veya enterolignanlar olarak adlandırılmaktadır. Bu bileşiklerin, özellikle kronik hastalıklarda etkileri araştırma konusu olmaktadır. Kanıtlar, bu hastalıklar ile mücadelede lif ve lignan bakımından zengin tam tahıllı besinlerin, fasulye, meyvelerin, kuruyemişlerin ve çeşitli tohumların ana koruyucu grupta olan besin türlerini işaret etmektedir. Bağırsak mikroflorası, sigara, antibiyotikler ve obezite vücutta dolaşan lignan seviyelerini etkilemektedir. Deneysel kanıtlar, birçok kanser türünde keten tohumu veya saf lignanların etkili olduğunu öne sürmektedir (Adlercreutz, 2007).

1.5.2 Flavonoidler

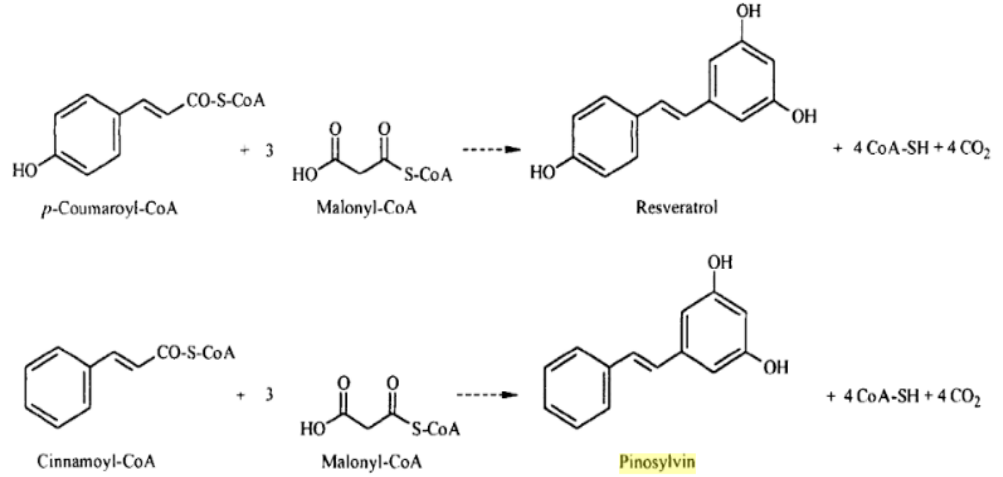
Kimyasal olarak, flavonoidler, iki fenil halkası (A ve B) ve bir heterosiklik halkadan (C) oluşan 15 karbonlu bir iskeletin genel yapısına sahiptir. Bu karbon yapısı C6-C3-C6 olarak kısaltılabilir. IUPAC terminolojisine göre, 3-fenilkromen-4-on (3-fenil-1,4- benzopirron) yapısından türetilmiş izoflavonoidler ve 4-fenilkumarin (4-fenil-1,2- benzopirron) yapısından türetilen neoflavonoidler olmak üzere iki türevi bulunmaktadır (Panche vd., 2016).

Doğal bir madde grubu olan flavonoidler, değişken fenolik yapıya sahiptirler. Meyvelerde, sebzelerde, tahıllarda, ağaç kabuğunda, köklerde, saplarda, çiçeklerde, çayda ve şarapta bulunmaktadır. Bu doğal ürünler, sağlık üzerindeki faydalı etkileriyle bilinmektedir. Flavonoidler olarak adlandırılan bileşenleri izole etmek için farklı metotlar uygulanmaktadır. Flavonoidler günümüzde çeşitli nutrasötik, farmasötik, tıbbi ve kozmetik uygulamalarda vazgeçilmez bir bileşen olarak kabul edilmektedir. Kanseri, Alzheimer hastalığı (AD), ateroskleroz gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili çeşitli olumlu biyokimyasal ve antioksidan etkilere sahiptirler. Anahtar hücresel enzim fonksiyonlarını modüle etme kapasiteleriyle birleşme özellikleri yapılarına antioksidatif, antiinflamatuvar, anti-mutajenik ve anti kanserojen özellikler yönünden katkı sağlamaktadır. Ayrıca ksantin oksidaz (XO), siklo-oksijenaz (COX), lipoksijenaz ve fosfoinositid 3-kinaz gibi çeşitli enzimler için güçlü inhibitörler oldukları bilinmektedir (Panche vd.,2016).

1.5.3 Stilbenler

Yunanca “stilbos” olan ve parlayan anlamına gelen stilbenler 1,2-difenilethen'nin iki izomeri olarak tanımlanır. Kapalı formülleri $C_{14}H_{12}$ 'dir. Stilben'ler, düzlemsel trans-form ve düzlemsel olmayan cis-formu olmak üzere iki konfigürasyonu mevcuttur. Trans-izomeri daha kararlı ve bitkide baskındır. Dokular, ancak ısıya veya UV ışığına maruz kaldıklarında ara dönüşüm meydana gelmektedir. (E)-Stilben, yoğunlaştırılmış yapısal formül $C_6H_5CH = CHC_6H_5$ ile temsil edilen organik bir bileşiktir. Bir diaryleten olarak sınıflandırılmış, karbon-karbon çift bağının her bir ucunda bir fenil grubu ikamesi olan bir merkezi etilen parçasına sahiptir. Diaryleten, bir karbon-karbon çift bağının her bir ucuna bağlanmış aromatik gruplara sahip bir bileşik sınıfının genel adıdır.

Stilbenlerin omurgası, C6-C2-C6, üç molekül malonyl-CoA bir molekül p-coumaroyl-CoA sentezinden meydana gelir. Şekil 1.6’da pinosilyvinin sentezindeki basamaklar gösterilmiştir (Loman ve Snowdon, 1969).



Şekil 1.6: Pinosilvin sentezine ait reaksiyon zinciri. (Nisula ,2003)

1920’li yıllarda, çam özodunundan sülfite yöntemiyle kâğıt hamuru elde edilememesi üzerine bunun yüksek reçine miktarından kaynaklandığı düşünülmüş ancak, 1927-1928 yıllarında Hägglund öz odunda var olan bir maddenin bu olaya neden olacağını belirtmiştir. Bu madde aseton ve alkol ile ekstrakte olurken, benzen ve dietil eter ile ekstrakte olmamaktaydı. Hägglund, aseton reçinesi üzerinde yaptığı çalışmalar sonucunda bunun bir madde karışımı olduğunu ancak yağ veya reçine asitleri içermediğini keşfetti. Üç yıl sonra, Erdtman, bu madde karışımını, Sarıçam (*Pinus sylvestris*) kuru özodunundan %0,5-1,0 oranında iki in aktif madde karışımı olarak izole etmeyi başardı. Bu iki maddeyi “ pinosylvin” ve “ pinosylvin monomethyl ether” olarak adlandırdı. Daha sonra yine çamda pinosylvin dimethyl ether, dihydropinosylvin (dihydropinosylvin) ve dihydropinosylvin monomethyl ether tespit edildi.

1944 yılında Erdtman ve Rennerfelt yaptıkları çalışmalarında dalın öz odununda %3 stilben bulmuşlardır. Kökler %4,9’luk bir konsantrasyonda stilben içermektedir. 1951 yılında Lindstedt ve 1952 yılında Erdtman ve Misiorny yaptıkları çalışmalarda, ilk olarak stilbenlerin kambiyumda oluştuğu ve yaz odununun iç parانشim hücrelerinin özışınlarında bulunduğunu keşfettiler. Ancak sonraki çalışmalar stilbenlerin ölen parانشim hücrelerinde

oluştüğunu ve özodundan diri odun geçişlerine doğru yöneldiklerini ortaya koydu. Stilbenlerin hücredeki son konumları kesin olarak bilinmemektedir (Bachelor vd., 1969)

1968 yılında, Hillis ve Inoue budaklardaki ilk stilben analizini yapmışlardır. %0,2 pinosilvini ve %0,1 pinosilvin monometil eteri *P. radiata*'nın budaklarından izole ettiler. Daha sonra Willför (2002) *P. sylvestris* türünün budaklarında %1–7 oranında stilben bulmuştur. Yaşayan budakların ölü budaklara oranla daha fazla stilben içerdiğini bildirmişlerdir.

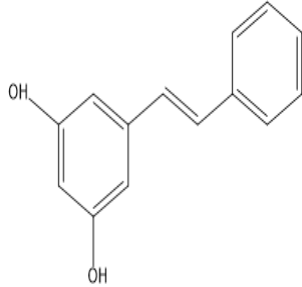
Picea Abies türünde bulunan stilbenleri “*Antrodia sinuosa*; *Antrodia xantha*; *Coniophora puteana*; *Fomitopsis pinicola*; *Gloeophyllum sepiarium*; *Phlebiopsis gigantea*; *Serpulalacrymans*; *Serpula himantoides*” mantarlarına karşı etkili olduğu belirtilmiştir (Valette vd.,2017).

Fıstıkçamı diri ve öz odunu da yapılan analizlerde stilbenlerin bulunduğu ve antifungal özellik gösterdiği ifade edilmiştir (Angelisa vd.,2018).

Kambiyumun mekanik hasarı, kabuk veya diri odunun mantar penetrasyonu, stilbenlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum sadece hücrelerin yavaşça canlılığını yitirdiği zaman dilimlerinde gözlenmektedir. Stilben oluşumu normal olarak büyüme mevsiminin geç döneminde ve kış mevsiminde gözlenmektedir. Bu nedenle hızlı bir hücre ölümü stilben oluşumu için yeterli zaman sağlayamaz. Yapılan araştırmalar stilben yoğunluğu ve sentezinin özodun ve diri odunda farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Diri odun stilbenleri, “fitoaleksinler” olarak adlandırılır. Çünkü mikroorganizmalara karşı aktif bir savunma önlemi olarak oluşmuşlardır. Diğer taraftan, öz odun stilbenleri, yaralanmalarda ya da mantar enfeksiyonlarından önce oluşur ve bu nedenle fitoaleksindir (Nisula, 2018). Şekil 1.7’de odunda en çok bulunan stilbenler gösterilmiştir.

KAPALI FORMÜLÜ : $C_{14}H_{12}O_2$

AÇIK FORMÜLÜ :

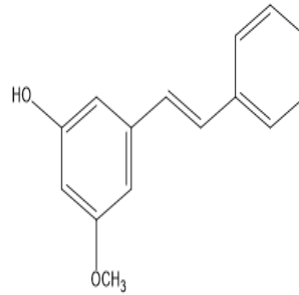


IUPAC : 3,5-dihidroksistilbene

Pinoslyvine

KAPALI FORMÜLÜ : $C_{15}H_{14}O_2$

AÇIK FORMÜLÜ :

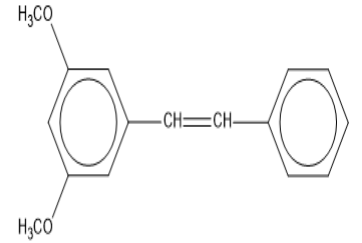


IUPAC : 3-hidroksi-5-metoksistilbene

Pinoslyvine monometil eter

KAPALI FORMÜLÜ : $C_{16}H_{16}O_2$

AÇIK FORMÜLÜ :



IUPAC : 3,5-Dimetoksistilbene

Pinosylvine Dimethyl Ether

Şekil 1.7: Odunda yaygın olarak bulunan stilbenler (Nisula, 2018)

Stilbenler, gövde boyunca oldukça düzgün bir şekilde dağılmıştır. Biraz daha yüksek konsantrasyonlar toprağa yakın ve tepede meydana gelirken, en düşük konsantrasyonlar ortada, dalsız kısımda bulunur. *Pinus sylvestris*'de yapılan çalışmalarda stilbenin ağacın boyuna ve enine olmak üzere iki farklı şekilde dağıldığını, enine eğilimlerde, özodunda %0,6-1,1 oranında stilben olduğu ortaya konulmuştur. Bu yoğunluk özodunda içten dışa doğru artmaktadır (Şekil 1.12) (Nisula, 2018).

Stilbenin enine kesitte dağılımı Şekil 1.8’de belirtilmiştir.



Şekil 1.8: Stilbenin enine kesitte dağılımı

Stilben içeriğinin ağaç yaşı, ağaç boyu, taç genişliği, gövde çapı veya iklim koşulları ile bağlantılı olmadığı ancak miktar olarak yan yana büyüyen ağaçlarda farklılıklar olduğu belirtilmiştir. İsveç çam ağacındaki stilben içeriği incelendiğinde stilben miktarının güney kısımlarında en yüksek olduğunu saptanmıştır. En düşük içerik merkezi kısımlarda bulunurken, kuzey kısımları tüm ülke için ortalama değerin altındadır. Diğer yandan, İspanyol çamları, iki kat daha fazla stilben içerirler (Nisula, 2018).

Ladin türlerinin kabuğunda da yüksek yoğunlukta stilbene glikozidler bulunur. *P. nigra*, *P. resinosa* ve *P. taeda*'nın öz odunları stilben yönünden en zengin iki türdür. Toplam stilben yoğunluğu %2'den fazlayken öz odununda %1'den fazla bulunur. *P. elliotii*, *P. strobus* ve *P. sylvestris* gibi türlerde %0,1 ila %0,8 arasındadır. Konsantrasyon her zaman özodunda daha yüksektir. Diriodunda stilben yoğunluğu eser miktardadır. *P. sibirica* ve *P. Strobilus*'un budakları stilben yönünden zengindir. Sırasıyla %9 -12 ve %8–15 oranındaydı. *P. nigra*, *P. resinosa* ve *P. Sylvestris* % 3–6, *P. Banksiana*, *P. Elliottii*'nin *P. taeda* ve *P. Wallichiana* budaklarında % 1-2 oranındaydı. *P. Contorta*, *P. Gerardiana*, *P. Pinaster*, *P. radiata* ve *P. Roxburghii* çalışılan türler arasında en düşük stilben oranına sahip gruptur (Nisula, 2018).

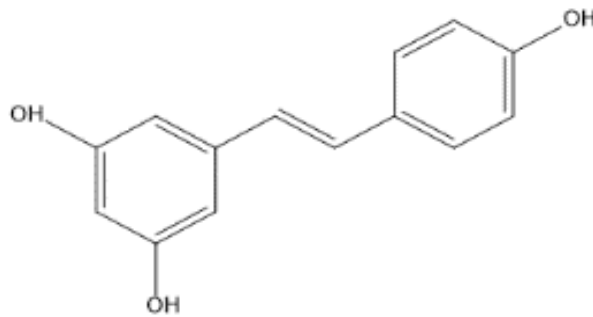
Stilbene glikozidlerin; mikroorganizmalar, böcek ve hayvanlar tarafından yapılan saldırılara karşı direnci sağlamak için var olduklarına inanılır. Aslında, polifenollerin antimikrobik etkileri büyük ölçüde bilinmektedir. Stilbenlerin mantar önleyici etkileri de çeşitli çalışmalarda ele alınmıştır (Nisula, 2018).

Stilbenler, floresan, fosfor esansı, fotokrom, fotokimyasal ve fotofiziksel gibi benzersiz özellikler gösterir. Bu nedenle, türevler, boyalar, optik parlaticılar, fosforlar, sintilatörler ve pH göstergeleri olarak kullanılmaktadırlar. Pamuk ve selüloz için ticari stilben boyaları çoğunlukla, 4-nitrotoluen-2-sülfonik asitten üretilmiştir, doğal stilben kullanılmamıştır (Nisula, 2018).

Diğer bir popüler stilben ise üzümde bulunan ‘‘Resveratrol’’dur. Resveratrol, 3,4,5-Trihydroxy-trans-stilbene, 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl) ethenyl]-1,3-benzenediol kimyasal açılımı sahip olan; üzüm, kırmızı şarap, yer fıstığı, asma yaprağı, keçiboynuzu ve yabanmersini gibi türlerde yoğun olarak bulunan bulunan polifenolik bir bileşiktir (Şekil 1.9). 1976’da Langcake ve Pryce adlı araştırmacılar tarafından Resveratrolün keşfi ve ilk çalışmalar asma yaprağında (*Vitis Vinifera*) başlatılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise Japonya’da Kojo-kon olarak bilinen tıbbi bitkinin (*Poligonum Capsidatum*) köklerinde de çok miktarda resveratrol tespit edilmistir. İlk kez 1992 yılında Siemann ve Creasy adlı araştırmacılar tarafında Resveratrolün şarapta bulunduğunu kanıtlamıştır. Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan çalışmalarda da yaşamı uzatan ilaç olarak lanse edilmesinden sonra popülerliği iyice artan resveratrolün farklı organ ve dokularda etkili olduğu saptanmıştır. Resveratrolün etkileri araştırıldığında; antikanser aktivite, yaşamı uzatıcı etki, kalbi koruyucu etki, antioksidan aktivite ve damar gevşetici etki gibi etkileri olduğu gözlenmiştir (Ergin ve Yaylal, 2013).

KAPALI FORMÜLÜ : $C_{14}H_{12}O_3$

AÇIK FORMÜLÜ :



IUPAC : 3,5,4'-Trihydroxystilbene

Şekil 1.9: Resveratrol’a ait kimyasal yapı

1.5.3.1 Stilbenlerin Kullanım Alanları

Bitki gelişimini olumsuz yönde etkileyecek sorunlar karşısında bir korunma mekanizması geliştirmiştir. En basit yapıları canlılarda bile kendinden olanı tanıma, yabancıyı ayırt edebilme özelliği vardır. Gelişmiş bitki organizmalarında korunma mekanizması üst düzey ve kusursuz denilebilecek kadar ihtişamlı düzenlenmiştir. Ağacın kendini mekanik darbe ya da virölens faktörlere karşı korumak amacıyla reçine salgıladığı en çok bilinen korunma yöntemidir. Bitkinin oluşabilecek olumsuz etkiler karşısında geliştirdiği savunma mekanizmalarından biri de “stilben” sentezlemesidir (Nisula, 2018).

Stilbene glikozidlerin; mikroorganizmalar, böcek ve hayvanlar tarafından yapılan saldırılara karşı direnci sağlamak için var olduklarına inanılır. Aslında, polifenollerin antimikrobik etkileri büyük ölçüde bilinmektedir. Stilbenlerin mantar önleyici etkileri de çeşitli çalışmalarda ele alınmıştır (Nisula, 2018).

Stilbenler, floresan, fosfor esansı, fotokrom, fotokimyasal ve fotofiziksel gibi benzersiz özellikler gösterir. Bu nedenle, türevler, boyalar, optik parlaticılar, fosforlar, sintilatörler ve pH göstergeleri olarak kullanılmaktadırlar. Pamuk ve selüloz için ticari stilben boyaları çoğunlukla, 4-nitrotoluen-2-sülfonik asitten üretilmiştir, doğal stilben kullanılmamıştır (Nisula, 2018).

Stilbenlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanılan geleneksel yöntemler, silika jel kolon kromatografisi ve HPLC ‘dir. Bu yöntemler çeşitli ön işlemler ve yüksek miktarda organik çözücü ihtiyacı duymaktadır. Yüksek hızlı karşı akım kromatografisi alternatif olarak kullanılmaktadır (Chi vd.,2014).

1.5.4 Tanenler

Tanenler; kolza, bakla, çay ve sorgumda gibi bitkilerden elde edilen, açık sarı-kahverengi toz, pul ya da süngersi bir kütle halindeki biçimsiz (amorfo) polifenolik bileşiklerlerdir. Tanenler genellikle bitkilerin kök, odun, kabuk, yaprak ve meyvelerinde bulunmaktadır. Tanenlerin başlıca kullanım alanlarını dericilik ve boyacılık oluşturmaktadır (Scalbert, 1991).

Bunların yanı sıra şarap ve biranın berraklaştırılmasında, petrol kuyularındaki sondaj çamurunun akışkanlığının artırılmasında ve buhar kazanlarının çeperlerinde birikinti oluşumunun engellenmesinde kullanılır. Tıpta, bademcik, faranjit ve azı deri hastalıkları tedavisinde damarları ve mukozayı büzücü etkilerinden dolayı etken maddesi olarak kullanılmaktadırlar (Scalbert, 1991).

Tanenler kimyasal açıdan, hidroliz olabilen tanenler ve kondanse tanenler olmak üzere iki ana grupta incelenir. Birinci grupta yer alan tanenler bir asit ya da enzim eşliğinde hidroliz olarak gallik asit, pirokateşik asit ve şeker gibi, suda çözünebilir bileşikler verir. Bu tür suda az, alkol ve asetonunda iyi çözünmektedirler. En iyi bilinen hidroliz olabilen tanenlerden biri gallotanenlerdir. Çok daha geniş bir grup olan kondanse tanenler ise hidroliz olamazlar. Bunlar ısı karşısında kuvvetli asitlerle ya da bazı yükseltgeyici maddelerle flobafen denen koyu kırmızı renkli çözünmeye yatkınlığı olmayan bileşiklerini oluştururlar (Scalbert, 1991).

Tanenler, ayrıca tripsin ile a-amilazların sindirimdeki aktivitesini, substratlarla kompleks teşkil ederek önlerler veya onlara bağlanarak protein ve nişasta sindirimini aksamasına yol açarlar. Tanenler vitamin B ile de kompleks oluşturarak emilimini önlerler. (Scalbert, 1991)

Ticari ölçüde elde edildiği en mühim kaynak mazi meşesidir. Tannik asit çayda da mevcuttur. Meşe palamudunda da bol miktarda bulunan tanenler aynı zamanda; antiseptik bileşiklerdir. Tannik asit, bitkinin sıcak suyla ekstrakte edilmesiyle (çayın demlenmesi gibi) suya çekilir. Bundan sonra çözelti buharlaştırmaya tabi tutulur ve katı halde tanen (veya tannik asit) elde edilir. Sentetik tannik asitler egzama tedavisi kapsamında çeşitli preparatlar içinde bulunurlar (Nisula, 2018).

Tanenler, çözültiden jelatin gibi proteinleri çökeltme yetenekleriyle diğer doğal fenolik bileşiklerin çoğundan farklı olan suda çözünür polifenollerdir. Bu özellik (bazen burukluk olarak da adlandırılır), hayvan derilerinin tabaklanmasında geçmiş ve şimdiki kullanımlarının sebebidir. Tanenler genellikle hem otsu hem de odunsu türlerin çok çeşitli yüksek bitki türlerinde bulunur. Neredeyse her bitki parçası olabilen belirli organlarda veya dokularda büyük miktarlarda (genellikle kuru ağırlığın %10'undan fazla) birikebilirler: ağaç kabuğu, odun, yapraklar, meyveler veya kökler. Tanenler, yapılarına göre

proantosiyenidiler (yoğunlaştırılmış tanenler), hidrolize edilebilir tanenler. Hidrolize edilebilir tanenler, fenolik asitlerin esterleridir ve genellikle glikoz olan bir polioldür (Scalbert, 1991).

Fenolik asitler ya galotanninler içinde gallik asittir, ör. 3 veya elajitanninlerdeki gallik asidin oksidasyonundan türeyen diğer fenolik asitler, ör. 4. Tanin M'ler, proantosiyenidlerdeki flavanol birimlerinin sayısına, galloil esterlerdeki galloil kalıntılarının sayısına veya ellagitanninlerin nihai dimerizasyonuna veya polimerizasyonuna göre büyük ölçüde değişir (genellikle 500 ile 3000 arasında) (Scalbert, 1991).

1.5.4.1 Hidrolize Tanenler

Hidrolize olabilen tanenler, merkezde karbonhidrat genellikle D-glukoz ve fenolik gruplarla esterleşmiş hidroksil grupları içermektedirler. Sıcak su, zayıf asit, zayıf baz, tannaz gibi enzimler tarafından hidrolize edilerek karbonhidrat ve fenolik asite dönüşmektedirler (Aydın ve Üstün, 2007).

1.5.4.2 Kondanse Tanenler

Hidrolize olmayan bu tanen grubu proantosiyenidinler olarak da anlandırılmaktadırlar. Yem bitkisi olarak kullanılan yapılarda en yaygın olarak bulunan tanen grubudur. Bu grupta üyeleri merkezde karbonhidrat taşımamaktadırlar. Hidrolizle parçalanmayan dayanıklı C-C bağlı flavonoid ünitelerin oligamer veya polimerleridir. Antosiyenidin pigmentleri; meyvelere, çiçeklere ve yapraklara pembe, kırmızı, mavi ve menekşe rengi kazandırmaktayken meyvelere ve meyve türlerinden yapılan şaraplara astenjan etki oluşturarak buruk bir tat vermektedir (Aydın ve Üstün, 2007).

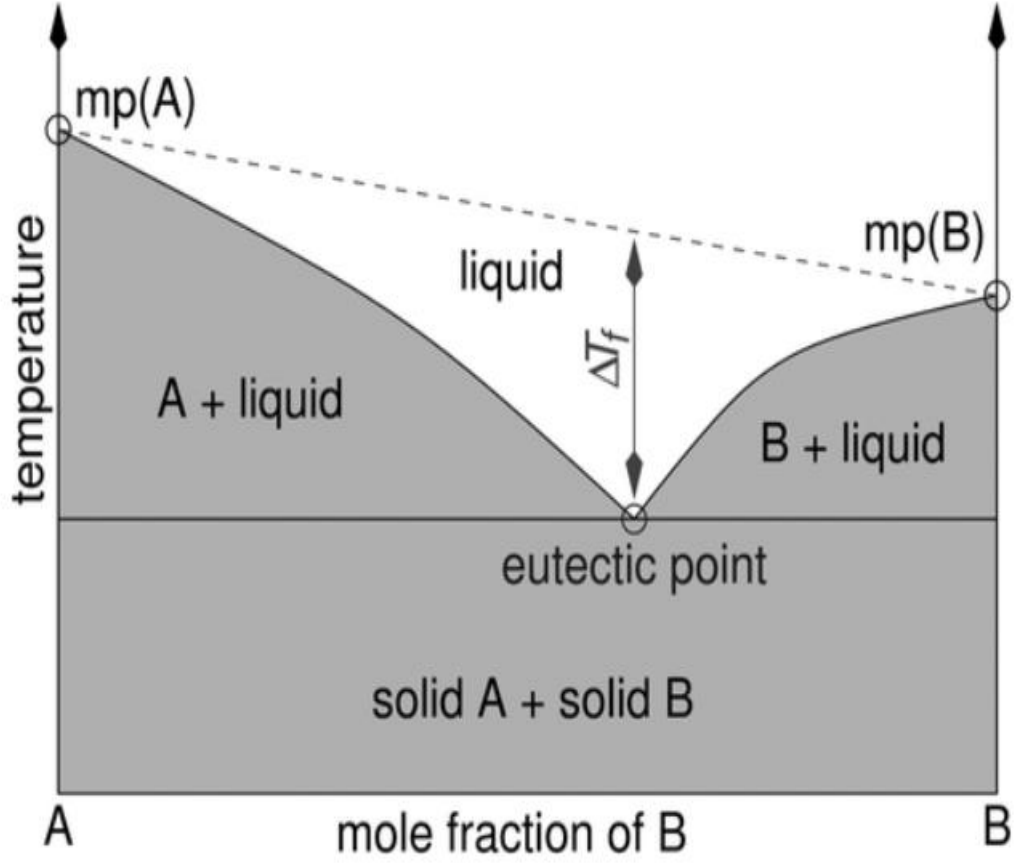
1.6 Derin Ötektik Çözücüler

Çevre dostu yani yeşil kimyanın özellikle de son dönemde üzerinde durduğu konulardan biri de çözücülerdir. Toksik özellikleri bilinen ve onaylanmış çözücüler yerine çevre dostu alternatif çözücüler geliştirilmektedir. İyonik sıvılar bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

açısından son yıllarda tercih edilse de maliyetli oluşları kullanımlarında negatif bir durum oluşturmaktadır. Derin Ötektik Çözücüler (DÖÇ) iyonik çözücülere alternatif oluşturmuşlardır. Ötektik nokta sözlük anlamı itibari ile faz diyagramı üzerinde mümkün olan maksimum sayıda fazın bir arada dengede olduğu nokta. Bu noktaya ulaşıldığında, fazlardan biri ortadan kalkana kadar sıcaklık sabit kalır. Bir sistem için ötektik noktanın yeri değişmezdir (sabittir). Kristalleşen en son sıvı damlasının veya oluşacak ilk sıvı damlasının bileşimi olarak da tanımlanabilir. Derin ötektik çözücüler (DÖÇ), doğal, organik maddelerden oluşan, biyo-bozunur, yanıcı olmayan, uçucu olmayan, zehirli olmayan, çevreye dost, hazırlanması kolay, kokusuz, renksiz ve kullanıldıktan sonra kolayca geri dönüşümü yapılabilen masum çözücülerdir (Dios, 2013).

Bu alternatif çözücülere ait ilk bulgu ve çalışmalar Abbott ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. DÖÇ'ler düşük örgü enerjisine sahip olmalarından dolayı düşük erime noktalarına sahip büyük, simetrik olmayan iyonlar içermektedirler. 2003 yılında yaptıkları çalışmada herhangi bir detaya yer vermezken 2004 yılında yaptıkları çalışmada DÖÇ hazırlarken kuaterner amonyum tuzu olarak kolin klorür, hidrojen bağı donörü olarak çeşitli karboksilik asit türevlerini kullandıklarını bildirmişlerdir. Yapılan deney ve gözlemlerde öncelikle kolin klorür etanol içerisinde yeniden kristallendirilip, süzülüp kurutulmuştur. Sıra karboksilik asit türevlerine gelindiğinde ise kullanımdan önce vakumda kurutulmuştur. Daha sonra belirli stokiometrik oranlarda alınan iki bileşen homojen ve renksiz karışım haline gelinceye kadar 100 °C'ye ısıtılmıştır (Abbott vd.,2014).

İki Bileşenli bir faz diyagramında ötektik noktanın gösterimi Şekil 1.10'da yapılmaktadır.



Şekil 1.10: İki Bileşenli bir faz diyagramında ötektik noktanın gösterimi. (Abbott vd.,2014)

2007 yılında ise yine aynı yöntemle DÖÇ hazırlamak için Tabloda belirtilen dört farklı kombinasyonu önermişlerdir (Abbott vd., 2003).

DÖÇ hazırlamak için önerilen dört farklı kombinasyonu Tablo 1.5'te verilmektedir (Abbott, 2003).

Tablo 1.5: DÖÇ hazırlamak için önerilen dört farklı kombinasyon (Abbott vd., 2003).

Seçenek	Örnek
1. Metal Tuzu+ Organik Tuz	$ZnCl_2$ + Kolin Klorür
2. Organik Tuz + Hidrojen Beğ Donörü	Kolin klorür + Üre
3. Metal Hidrat Tuzu + Organik Tuz	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ + Kolin klorür
4. Metal Hidrat Tuzu + Hidrojen Beğ Donörü	$ZnCl_2$ + Üre

Klasik olarak, bitki matrislerindeki polifenoller ve diğer biyoaktif bileşenler, etanol, metanol ve aseton gibi organik çözücülerle ekstrakte edilmektedir. Bu organik çözücüler; güçlü uçuculuk, yüksek toksisite, zayıf biyolojik bozunabilirlik, yanıcılık ve yüksek maliyet gibi çeşitli doğal dezavantajlar sergilemektedirler. Yeşil çözücü olarak hayatımıza dahil olan yeni iyonik sıvı analogları olarak derin ötektik çözücüler (DÖÇ'ler), hidrojen bağı alıcıları (HBA'lar) ve hidrojen bağı vericileri (HBD'ler) arasındaki hidrojen bağı etkileşimi ile oluşturulmaktadır (Wu, 2020).

DÖÇ'ler, diğer organik çözücülerle karşılaştırıldığında yalnızca çevre dostu, kararlı, daha az uçucu ve çevrede kolay bozunmama gibi özelliklerinin yanında aynı zamanda kolay sentez ve yüksek verimlilik avantajlarına da sahiptirler (Wu, 2020).

Bu nedenle DÖÇ'ler, biyoaktif bileşenlerin tahıl gıdalardan ve tıbbi ürünlerden verimli bir şekilde izole edildiğinden dolayı yeşil çözücüler olarak nitelendirilebilirler (Wu, 2020).

Y.Q. Ma vd. (2018), kolin klorür ve laktik asit (1:2) ile sentezlenen DÖÇ'in, *Camellia oleifera* çiçeklerinden farklı polaritelere sahip dört flavonoid ekstraksiyonunda mükemmel kapasitelerde geri elde edilebileceğini bildirmişlerdir (Ma vd.,2018).

Öztürk ve ark. (2018), gliserol ve etilen glikol ile sentezlenen kolin klorür bazlı DÖÇ'ün, portakal kabuğundan farklı polaritelere sahip anti-oksidatif fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda geleneksel çözücülerle karşılaştırıldığında daha yüksek verimlilikte geri kazanıldıklarını yaptıkları çalışmalarla doğrulamışlardır (Wu, 2020).

Organik çözücülerle diğer ekstraksiyon teknolojisi (katı-sıvı ekstraksiyon, karıştırma yardımcı ekstraksiyon ve enzimler destekli ekstraksiyon) ile karşılaştırıldığında, DÖÇ tabanlı ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) yalnızca solvent, işçilik ve enerji tüketimini büyük ölçüde azaltmaktadır. Bunun yanında akustik kavitasyon ile bitki hücre duvarlarının yapısını tahrip edebilmekte ve biyoaktif bileşenlerin geri kazanımını artırabilmektedirler (Nadeem vd., 2018) (Bindes vd.,2019).

Yapılan çalışmalar gösteriyor ki, yüksek sayıda ve oranda fenolik bileşiğin geri kazanılmasında DÖÇ'lerin hazırlanmasında molar oran çok büyük bir etkiye sahiptir. Tablo 1.6'da bazı DÖÇ'lerin hangi molar oranlarda hazırlanması gerektiği bildirilmektedir (Wu, 2020).

Tablo 1.6: DÖÇ çeşitleri ve Molar Derişim Oranları (Wu, 2020)

Numara	Çözücü	Hidrojen	Bağı	Oran
		Alıcısı	Hidrojen Bağı Vericisi	
1	ChCl-MA	Kolin Klorür	Malik Asit	1:1
2	ChCl-Gly	Kolin Klorür	Gliserol	1:1
3	ChCl-OA	Kolin Klorür	Oksalik Asit	1:1
4	ChCl-Xyl-1	Kolin Klorür	Ksilitol	1:1
5	ChCl-Xyl-2	Kolin Klorür	Ksilitol	1:2
6	ChCl-Lev	Kolin Klorür	Levunilik Asit	1:2
7	ChCl-EGly	Kolin Klorür	Etilen Glikol	1:2
8	Bet-Lev	Betaine	Levunilik Asit	1:2
9	Bet-Gly	Betaine	Gliserol	1:2
10	Gly-CC	Sitrik Asit	Gliserol	1:2
11	Pro-Lev	L-Proline	Levunilik Asit	1:2
12	Pro-Gly	L-Proline	Gliserol	2:5
13	Pro-LA	L-Proline	Laktik Asit	1:1

Derin Ötektik Çözücüler ve Kullanılan Kimyasallar

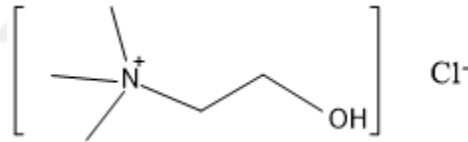
Kolin Klorür (C₅H₁₄ClNO)

Besi amaçlı kullanılan uluslararası onaylı bir katkı maddesidir. Kolin klorür B-kompleks vitamini olarak da sınıflandırılmaktadır (Abbott,2010).

Kolin (genellikle klorit şeklinde) B vitamini kategorilerindendir. Çoğu hayvan tarafından sinirlerden kaslara impulsların iletimini etkileyen asitil kolinin öncüsü olarak kullanılır (Abbott,2010).

Molekül ağırlığı 139,6 g/mol'dür. Kolin klorür kolin katyonu ve klor anyonuna sahip biyobozunur organik kuaternar amonyum tuzudur (Abbott,2010).

Kolin klorür kimyasal yapısı Şekil 1.11 gösterilmektedir.



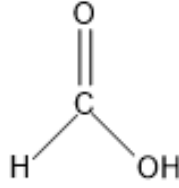
Şekil 1.11: Kolin klorür kimyasal yapısı

Formik Asit (HCOOH)

Formik asit, korboksilik asitlerin ilk üyesidir ve dolayısıyla tek karbonludur. Metanoik asit olarak da bilinir. Formik asit, karbonil karbonuna bağlı alkil grubu içermemesiyle en basit karboksilli asit özelliği taşır. Hem karbonil hem de karboksilik asit özelliğine sahiptir (Ishii vd., 1987).

Molekül ağırlığı 46,0254 g/mol, yoğunluğu 1,22 g/ml (sıvı), Asitlik (pK_a): 3,75, erime noktası 8,4 °C olan metanoik asit su, metanol, etanol, eter, aseton gibi çözücülerde çok iyi çözünen bir organik asittir (Ishii vd., 1987).

Formik asit kimyasal yapısı Şekil 1.12’de gösterilmektedir.



Şekil 1.12: Formik asit kimyasal yapısı

Etilen Glikol ((CH₂OH)₂)

Bir diol türü olan Etilen glikol (CH₂OH)₂ polyester elyaf üretiminde hammadde olarak ve antifiriz formülasyonları olmak üzere öncelikli iki amaç için kullanılır. Kokusuz, renksiz olup orta düzeyde toksiktir (Demir, 2007).

Kimyasal formülü C₂H₆O₂, molekül kütlesi 67,07 g.mol⁻¹, yoğunluk 1,1132 g/cm³, erime noktası -12,9°C, kaynama noktası 197,3°C olan renksiz bir sıvıdır (Demir, 2007).

Etilen glikol kimyasal yapısı Şekil 1.13’de yer almaktadır.



Şekil 1.13: Etilen glikol kimyasal yapısı

Üre (H₂N-CO-NH₂)

Kimyasal formülü H₂N-CO-NH₂ olan üre organik bir bileşiktir. Karbonik asidin amidi olan üre aynı zamanda karbamik asidin de amidi olmasından dolayı karbamid olarak da adlandırılmaktadır (Zhang ve Schreiner, 2009).

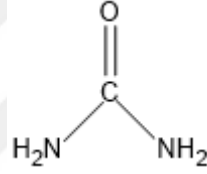
1982 yılında Wöhler tarafından sentezlenmesi ile organik bileşikler sentetik olarak da elde edilebileceği kanıtlanmıştır. Bu reaksiyonda, KCN ile PbO₂ karışımı ısıtılarak KCNO elde edilir. KCNO nun amonyum sülfat ile muamelesi sonucu hazırlanan amonyum siyanatın kızıdırılmasıyla da üre elde edilir (Zhang ve Schreiner, 2009).

Üre 132 °C'de eriyen rombik prizmalar veya iğne şeklinde renksiz kristaller verir. Su ve alkolde iyi çözünür. Kloroform, eterde veya etil asetatta çözünmemektedir. 132 °C'nin üstünde amonyak, siyanür asidi gibi ürünler vererek bozunur (Zhang ve Schreiner, 2009).

Üre; özellikle gübre, hayvan yemi, ilaç endüstrisi ve plastik yapımı gibi endüstriyel faaliyetlerde kullanılmaktadır.

Molekül kütlesi 60,06 g.mol⁻¹, yoğunluğu 1,32 g/cm³, görünümü beyaz katı halinde olan organik bir maddedir.

Üre kimyasal yapısı Şekil 1.14'de gösterilmektedir.



Şekil 1.14: Üre kimyasal yapısı

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Karaçam Gövde Odunu ve Budaklardaki Stilbenlerin DÖÇ'ler ile Geri Kazanılması ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Son yıllarda, bitki polifenollerine olan ilgi sağlık alanında kullanımlarının artmasıyla artmıştır. Stilbenler, polifenollerin en önemli grubu olup, resveratrol çeşitli bakteri ve dermatofitik mantarlara karşı antimikrobial özellikte olması nedeniyle bu grupta en çok çalışılan madde olmuştur. Bu gruptaki diğer bir madde antimikrobial aktivite ve murin hepatik karsinom hücre hattına karşı sitotoksositeye sahip pinosylvindir.

Gerek yapraklı gerekse İYA'larda bulunan budaklar ve öz odunu kısmı fenoller açısından zengin olup budaklar bu noktada öne çıkmaktadır. İYA budaklarında lignanlar, oligolignanlar ve stilbenler bulunur. Özellikle çam türlerinde pinosylvindir (PS) ve pinosylvinemonometileter (PSMME) bulunmaktadır. Budaklar, içerdikleri yüksek ekstraktif madde ile zift sorununa neden oldukları için kâğıt fabrikalarında istenmezler ve atık olarak değerlendirilirler.

Stilbenler ve lignanlar gibi polifenollerin ekstraksiyonlarında solvent çözünürlüğü, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi verim üzerine etkili faktörlerdir.

Gıda uygulamalarında, ayrıştırılan maddenin saflığı oldukça önemlidir. Örn.Odunsu maddelerden saf PS ayırmak için klorlu çözücüler e.g dichloromethane kullanılmaktadır (Välímää et al. 2007; Plumed-Ferrer et al. 2013). Endüstriyel boyutta ise klorsuz çözücüler kullanılmalıdır.

Bu çalışmada sikloheksan en yüksek PSMME verirken, etOH:su (95:5) en yüksek PS miktarını vermiştir. Sıcak su ekstraksiyonunda ise PS ve PSMME verimi düşüktür (Poljanšek et al.2019).

Kusur olarak nitelendirilen budaklar yoğunluğa daha yüksek ve koyu renkli liflere sahiptir. Bu nedenle sadece kâğıt fabrikalarında değil, diğer orman endüstri dallarında istenmezler. Öz odununa göre budaklardaki ekstraktif madde miktarı daha fazladır. Anderegg and Rowe (1974) Parana çamının (*Araucaria angustifolia*) budaklarından ekonomik açıdan önemli bir reçinenin %30'una kadar elde edilebileceğini bildirmiştir. Willför ve ark.

(2003a, b, 2004a, b,c) tarafından yapılan çalışmalarda özellikle İYA budaklarında özodununa göre 100 kat daha fazla lignan tespit edilirken, oligolignanlar, flavonoidler ve stilbenlerde bulunmuştur.

Yapraklı ağaç budaklarındaki ekstraktif madde miktarı ise İYA budaklarına göre daha düşük olmasına rağmen kendi özodununa göre daha yüksektir.

12 farklı ağaç türüne (Göknar, ladin, sarıçam, douglas göknarı, larix, kızılğöğ, kiraz, kayın, meşe, dışbudak, gürgen, akasya) ait budak ve özodunuda yapılan çalışmada akasya hariç diğer bütün türlerde ekstraktif madde miktarı özoduna oranla daha yüksek bulunmuştur. Budaklar, terpenler, lignanalar, stilbenler, flavanoidler ve şeker türevleri içerir. İYA budakları daha fazla lignan içerirken, YA budaklarında flavanoidler, tanenler ve şeker gurupları ön plana çıkmaktadır. Budaklardaki lignanlar hydroxymatairesinol, secoisolariciresinol ve nortrachelogenindir. Stilbenler ise sadece sarıçam'da PS ve PSMME olarak bulunmuştur. Flavanoidler ise dihydrosquaricetin, catechin ve taxifolinindir.

15 İYA olmak üzere 23 ağaç türüne ait budakların kimyasal yapıları incelenmiştir. İYA'lar YA lara göre daha fazla ekstraktif içermektedir. İYA en önemli maddeler lignanlar, stilbenler, flavanoidler ve terpenlerdir. Gallic asit ve flavanoidler YA larda bulunmuştur (Benkeder vd., 2015).

Dalların kırılmasından sonra bu kısımlara mikroorganizmaların saldırmasını engellemek amacıyla anti microbial ve fungusit özellikteki madde gurupları saygılanmaktadır. Malterud et al. (1985) *Salix caprea*'da mikroplara ve mantara karşı etkili 6 flavanoid (dihydrokaempferol, naringenin, taxifolin, prunin, and catechin) tespit etmiştir (Välimaa vd., 2007).

Antimikrobial etkinin yanında stilbenlerin ayrıca tümörlü hücreler üzerinde sitotoksit ve apoptoz etkileri vardır. Bir stilben türü olan resveratrol farklı bakteri ve cilt mantarlarına karşı antimikrobial özellikleri dolayısıyla son yıllarda dikkat çekmektedir. Resveratrol ayrıca yapılan çalışmalarda kanser önleyici olarak da ifade edilmektedir (Välimaa vd., 2007).

Önemli ölçüde flavanoid içeren budak ekstraktları önemli bir antimikrobial etkinlik

göstermemiştir. *Eucalyptus globulus* budakları içerdikleri tanenler nedeniyle antimikrobial etkinlik göstermişlerdir. Farklı çam türlerine ait budaklarında ekstrelerinin antimikrobial ve sitotoksik etki göstermektedir. Bu durum pinosylvinin varlığı ile açıklanmaktadır.

P. strobus, *P. resinosa* ve *P. sylvestris* budaklarındaki PS ve PSMME miktarı %38 bulunmuştur. *P. sibirica* ise %28. Sonuç olarak, saf pinosilvin ve pinosilvin ekstraktı antimikrobiyal ve sitotoksik ajan potansiyeline sahiptir (Välímää vd., 2007).

Sarıçam ve ladin budakları daha fazla fenolik bileşik içermektedir. Budaktaki fenolik madde miktarı gövde odununa göre 50-100 kat daha fazladır.

İğne yapraklı ağaçlardaki budaklarda hidrofilik bileşikler genellikle lignanların serbest aglyconlarını, oligolignanları, stilbenleri ve flavanoidleri içerir. Örneğin, ladin budaklarına ait hidrofiliklerde yarıdan fazlası lignanları gerisi ise oligolignanları içermektedir. Lignanlardan, hydroxymatairesinol önemli bir in vitro antioksidanttır (Wilföör vd., 2003).

13 farklı ağaç türüne ait budakların antioksidant özellikleri incelenmiş ve sentetik antioksidant olan BHA (IC₅₀ 198 µg/L) oranlanmıştır. Sadece *Thuja occidentalis* ve *Pseudotsuga menziesii* ekstraktlarının antioksidant potansiyelleri düşük bulunmuştur. *Pinus contorta*, *Abies sibirica* ve *Abies balsamea* ait budak odunlarının ekstraktlarının antioksidant potansiyelleri Trolox (IC₅₀ 5.0 µg/L) eş değeri bulunmuştur (Wilföör vd., 2003).

Ekstraktifler, çok geniş kimyasal madde grupları içerirler. Sınıflandırmak istediğimizde lipofilik ve hidrofilik maddeler ya da polar ve apolar çözücülerde çözünenler olarak gruplandırabiliriz. Yapılan çalışmalarda iğne yapraklı ağaçların budaklarının canlı yaşayan oduna göre daha fazla fenolik madde özellikle flavonoid, lignan ve stilbene içerdiğini ortaya koymuştur (Vek vd., 2020).

Çam türlerinin en önemli fenolik ekstraktif madde grubu stilbenlerdir (pinosylvin and pinosylvin monomethyl ether). Pinosylvinler çam öz odununun çürüklüğe dayanımını belirlemede öne çıkan maddelerdir. Pinosylvin, pinosylvin monomethyl ether'e göre antibakteriyel ve antifungal özelliği daha iyidir. Pinosylvin ve türevlerinin sayılı farmakolojik özellikleri olduğu ve biomedikal ve gıda uygulamalarında bir potansiyele sahip olduğu ortaya konulmuştur (Vek vd., 2020).

Yapılan çalışmalarda, sarıçamın içeriğinde bulunan pinosylvin ve PSMME'in odunu tahrip eden mantarlara karşı antiseptik ve fungusit etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur. Son yıllarda, pinosylvinin mantarların gelişimini durdurması ve ağacı mantar saldırılarına karşı koruması yönünde çalışmalar artmıştır. PS ve PSMME'in ozon tedavisi ile stresi azalttığı ve antibakteriyel etkileri artırdığı bildirilmiştir. Çam türlerine ait budak ekstratlarının kâğıt yapımında doğal biosit olarak kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır (Hovelstad vd.,2006).

Bu çalışmada Norveç'te yetişen sarıçam ve ladin örneklerine ait stilben içerikleri ve miktarları araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Sarıçam ve Ladin özodunu ve budaklarda belirlenen stilben miktarları (%). (Hovelstad vd.,2006).

Sarıçam (87 yaş)	Özodun (% w/w)	Budak (% w/w)
0 m	2,03	-
3,5 m	1,71	2,06
5 m	1,27	8,35
Sarıçam (34 yaş)		
0 m	0,27	-
3,5 m	0,23	2,55
Ladin (27 yaş)		
0 m	0	-
3,5 m	0	0

Stilbenler, bitki polifenollerinin bir sınıfı olup, geniş biyolojik aktiviteleri ve karmaşık yapıları nedeniyle özellikle ilaç endüstrisi tarafından ilgi odağıdır. Ancak, bitki dünyasında geniş bir yayılıma sahip değildir bu nedenle stilben araştırmaları bazı bitki türlerinde yapılmaktadır. Analitik ve spektroskopik tekniklerdeki gelişmeler, özellikle 1990'dan stilbenlerin karmaşık yapılarının aydınlatılmasında önemli bir adım olmuştur (Shen vd.,2009).

Stilbenler yapısal olarak 1,2-diphenylethylene şeklinde karakterize edilir ve monomerik ve oligomerik stilbenler olarak iki grupta karakterize edilebilirler. Oligomerik stilbenlerde

yine kendi içlerinde farklı gruplara ayrılmaktadırlar (resveratol, isorhapontigenin, piceatanol vb.) (Shen vd.,2009).

Sanayi atığı olarak değerlendirilen çam budakları, potansiyel pinosylvin kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Pinosilvinler antifungal, antimicrobial ve antioksidant özellik göstermektedir. Sarıçam özodununun kahverengi çürüklük mantarı *Coniophora puteana* karşı dayanımı üzerinde pinosilvin miktarının belirgin etkisi vardır. Ayrıca, *Trametes versicolor* ve *Phanerochaete chrysosporium* beyaz çürüklük mantarları ve *Neolentinus lepideus*, *Gloeophyllum trabeum*, *Postia placenta* kahverengi çürüklük mantarlarına karşı yapılan deneylerde, pinosilvinlerin beyaz çürüklük mantarlarını engellediği kahverengi çürüklük mantarlarını ise az miktarda etkili olduğu ifade edilmiştir (Vek vd., 2020).

Açık alanda, ahşap kazıklarla yapılan testlerde ise mantar testlerinde belirgin bir etkinliğin olmadığı görülmüştür (Vek vd., 2020).

Budaklardaki lignanların, stilbenlerin ve reçine asitlerin antioksidant etkileri bulunurken, öz odunundaki stilbenler antifungal etki göstermektedir (Vek vd., 2020).

Yapılan bir çalışmada Viljem Vek vd., (2020) sarıçam budaklarının beyaz ve kahverengi çürüklük mantarlarına karşı iyi bir koruyucu etkiye sahip oldukları görülmüştür.

Abies balsamea ve *A. alba*, diri odun ve budak odunlarından buhar destilasyonu ile elde edilen yağların kimyasal yapıları incelendiğinde, budaklarda oksijenli diterpenler ile birlikte epi-13-manoyl oxide ve Manool bulunmuştur. Her iki göknar türünde de budaklarda büyük miktarlarda oksijenli diterpenler diri odundan daha fazla bulunmuştur (Sekine vd., 2013).

Vücudun istilacı patojenlere karşı öncelikli savunmasını nötrofiller gerçekleştirmektedir. Nötrofil fonksiyonunu inhibe eden bazı ilaçlar ve doğal malzemeler bulunmaktadır. Trans-resveratrol bu maddelerden biridir. Jancinova vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada, pinosilvinin antioksidantların konsantrasyonunu düşürerek nötrofillerin açığa çıkmasını sağladığı ifade edilmiştir. Gerçekleşen bu inhibasyonun protein kinase C nin eşliğinde ve nötrofillerde reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla gerçekleşmiştir. Oral olarak alınan pinosilvin farelerde nötrofil oranını azaltırken, kandaki oksidant konsantrasyonunu

azaltmıştır. Pinosilvinin, nötrofil aktivitesinde etkili bir inhibitör olarak sınıflandırılabilceğı ve kalıcı inflamasyon ile ilişkili patolojik durumlarda tamalayıcı tıpta kullanım potansiyeli olduğı ifade edilmiştir (Jancinova vd., 2012).

Budaklarda bulunan yüksek molekül ağırlıklı maddeler, tıbbi uygulamalarda önemli bir potansiyele sahiptir. Smends, vd. (2017) yılında sarıçam budaklarının etanol ekstraktındaki büyük molekül ağırlıklı maddelerin tespitine yönelik yapılan çalışmada, ekstraktın çoğunlukla reçine ve yağ asidi oligomerlerini içerdığı, ayrıca sterol ve stilben oligomerlerinde bulunduğunu tespit edilmiştir. En önemli reçine asidi dehydroabietic asittir.

Kayın (*Fagus sylvatica L.*) ağacında bulunan budaklarda yapılan çalışmada, hidrofilik bileşiklerin lipofilik bileşiklere göre 3-5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Budaklarda yağ asitleri kısmen daha fazladır. Reaksiyon bölgesinde ve renkli kısımda steroller daha fazladır. Hidrofilik bileşikler ise çözünebilen şekerler, asitler ve katechin gibi fenolik maddelerden oluşmaktadır. Fenolik maddeler ve katechin budaklarda belirgin şekilde fazladır.

Kahverengi çürüklük mantarları oldukça yıkıcı mantarlardır ve yıkımın ilk basamağında serbest radikaller oluştururlar. Her ne kadar bir çok odun ekstraktı antioksidant etki gösterebilir, radikal oluşumuna dayalı bozunmadan odunu koruma özellikleri pek çalışılmamıştır. Sarıçam öz odunu ve budaklarının radikal oluşumuna dayalı bozunma etkinliğini incelendiğinde, diri oduna göre öz odunu ve budaklarda antioksidant etkinliğin belirgin şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir. Fenton reaktifi ile degradasyonda ise, sadece budakların kütle kaybını azalttığı belirtilmiştir. Antioksidant etkinlikleri kahverengi çürüklüğü önlemek için yeterli olsada, diğer biyolojik etkinliği henüz net değildir.

Pinus banksiana Lamb. ve *Picea sitchensis* türlerinin budaklarında 1) insanlardaki Jurkat T hücrelerinin canlılık ve antioksidant özelliklerine etkileri 2) Kültür hücrelerinin oksidatif stresine karşı sitoprotektif ve genoprotektif etkilerinin araştırılması, 3) konkanavalin A (ConA) ile indüklenen interlökin-2 (IL-2) üretimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve her iki türe ait budakların güçlü antioksidant özelliğe sahip olduğu bulunmuştur. Her iki türünde fenolik bileşikler aynı olmakla birlikte, çam türüne ait budakların, 30 mg/mL

konsantrasyonda ConA kaynaklı IL-2 üretimini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur.

Salix caprea ait gövde odunu ve budaklara ait fenolik bileşikler incelenmiş ve vanillic acid, 3-p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, sinapylaldehyde, dihidrokaempferol, catechin, naringenin, galocatechin, dihydromyrcetin ve taxifolin bulunmuştur. Budaklar aynı ağacın gövde odununa göre daha yüksek miktarlarda flavonoid içermektedir (Pohjamo vd., 2003).

Picea abies (L.) H. Karst budaklarına ait hidrofilik ekstraktında bulunan önemli lignin 7-hydroxymatairesinol'dur. Ayrıca, 7S – ve 7R -todolactol A, 7'-hydroxylariciresinol ve 9'-hydroxylariciresinol'un iki stereoisomeri bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında 7 S- and 7 R –isoliovil'de tespit edilmiştir. Bu lignanlara ilave olarak, yapısı aydınlatılmamış lignanlarda bulunmaktadır (Smeds vd.,2012).

Populus tremula budaklarından elde edilen aseton ekstraktında iki yeni bileşik elde edilmiştir. (E) ve (Z) p-coumarate 1-O-rutinoze. Bu yeni fenil disakkaritler, ciddi ORAC değeri göstermişlerdir (11.7 µM Trolox değeri) (Neacsu vd., 2007).

Sarıçam budaklarından elde edilen stilbenler (methyl pinosylvin and pinosylvin) ve lignanlarca (matairesinol ve nortrachelogenin) zengin ekstraktif, PC-3M-luc2 prostat kanser hücreleri invitro ve ortotopik ksenograft karşı etkinlikleri denenmiştir. Budak ekstraktı 40 µM konsantrasyonda in vitro antiproliferatif ve proapoptotik etkinlik göstermiştir. Ayrıca, ekstraktan türetilen stilbenoidler, tümör nekroz faktörünü artırmıştır. Sonuç olarak, çam budak ekstraktının erken klinik prostat kanseri modelinde antikanserojenik etkinlik gösterdiği ve TRAIL'e karşı kemosenesitizör olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Yatkin vd., 2014).

Lignanlar ve stilbenler polifenollere ait küçük bileşiklerdir. Bitki dünyasında yaygın olarak bulunmakta ve günlük diyetimiz içinde de ortalama birkaç milligram olarak tüketilmektedir. Diğer fenolik bileşiklerle karşılaştırıldığında oldukça az miktardadır. Buna rağmen gerek stilbenler gerekse lignanlar sağlık açısından özellikle antikanser özellikleri ve metabolizmaya verdikleri enerji bakımından önemli faydaları bulunmaktadır. Son yıllarda, odundan sentezlenen küçük moleküller özellikle biokimyasallar için önemlidir. Lignanlar, flavanoidler ve stilbenlerlerden oluşan fenolik maddeler farmakoloji, nutrasötik ve gıda endüstrisinde ilgi çeken maddeler olmuştur. Özellikle antioksidant ve

antikanser özellikleri birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (Polari, 2015).

Acetylsalicylic asit (aspirin) en eski farmakolojik kullanım alanı bulan ve söğüt ağacı kabuğundan elde edilen maddedir. Diğer bir örnek sıtma tedavisinde kullanılan ve 17 yüzyılda avrupaya getirilen quinine'dir. *Taxus brevifolia* kabuğundan ayrıştırılan ve farmakolojik kullanım alanı yeni bir madde olan paclitaxel göğüs ve yumurtalık kanserleri gibi kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Polari, 2015).

Stilbenler C6-C2-C6' yapısına sahiptir, monolignanlara benzer dimer yapılar oluştururlar (Polari, 2015).

Melez (*Larix decidua* Mill.) türüne ait diri odun, öz odun, sağlam budak ve ölü budak örneklerine ait sıralı ekstraksiyon sonrasında aşağıda tabloda verilen madde grupları tespit edilmiştir (Wagner vd.,2020).

Tablo 2.2: Melez türüne ait farklı noktalardan alınan örneklerin aseton/su ekstrak içeriği (Wagner vd., 2020).

Madde grupları	Diri-Öz odun karışımı	Sağlam budak	Ölü budak
Karboksilik asit	0,03	0,14	0,01
Fenolik asit	0,12	1,66	0,08
Şeker	0,21	0,47	0,04
Yağ asitleri	0,14	0,48	0,04
Reçine asitleri	0,08	0,18	0,01
Polifenoller	2,72	23,7	1,30
Steroller	0,01	0,23	0,01

Tablo 2.2'de görüldüğü gibi sağlam budaklarda özellikle polifenolik maddeler odun karışımına göre 10 kat daha fazla bulunmuştur. Benzer şekilde steroller ve fenolik asitlerde ölü budak ve odun karışımına göre sağlam budaklarda daha fazladır.

Sarıçam öz odunu ve budak öz odunu ekstraktiflerinin hücre boyutunda dağılımını inceleyen bu çalışmada, Tablo 2.3'de belirtilen veriler elde edilmiştir (Belta vd., 2017).

Tablo 2.3: Sarıçam diri odun, dış öz odun, orta öz odun ve budaklarda bulunan ekstraktifler (mg/g kuru odun).

Madde grupları	Diri odun (mg/g)	Dış öz odun (mg/g)	Orta öz odun (mg/g)	Budak (mg/g)
Gravimetrik verim	28,7	74,6	228,9	420
Pinosilvine	-	7,3	12,3	66,1
Reçine asitleri	1,0	42	178,6	285,7
Yağ asitleri	0,8	3,7	3,7	2,5
Diğerleri	2,7	1,5	0,9	14,8

Budaklardaki verim belirgin şekilde en yüksektir. Aynı şekilde reçine asitleri ve pinosilvine de en yüksek sarıçam budak kısmında bulunmuştur. Aynı çalışmada hücre boyutunda pinosylvin, hücre çeperi, hücrelerin birleşme yerlerinde (köşe) ve traheid lümenlerinde bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Çalışmada Türkiye’de önemli bir çam türü olan Karaçam (*P.nigra*) odun örneği kullanılmıştır. Deney numuneleri (Şekil 3.1) Bartın ili Ulus Orman İşletme Müdürlüğü Abdipaşa Şefliği Meşcere Haritası 49 nolu bölmeden temin edilmiştir.

Kesimi yapılan örnekler, analizlere hazırlanmak üzere Ağustos 2018’de Bartın Üniversitesi Orman Endüstri Mühendisliği Analitik Laboratuvarına getirilmiştir. Budakları belirlenen numuneler (Şekil 3.1) analizlere kadar kimyasal özelliklerinin bozulmaması için derin dondurucularda bekletilmiştir.



Şekil 3.1: Karaçam numunesi (Fotoğraf : Öznur ÇAKAL,2018)

Çalışma da 3 farklı DÖÇ kullanılmıştır (Şekil 3.2). Hazırlanan DÖÇ’ler ve mol oranları Tablo 3.1’de verilmiştir. Önceki çalışmalardan elde edilen veriler en uygun mol oranının bütün örnekler için 1:2 olduğu göstermiştir (Corroto vd.,2020). DÖÇ çözeltisi hazırlarken mol oranları dikkate alınarak aşağıda verilen örneğe göre hazırlanmıştır.

Örnek; CH:Üre (1:2 molar) = 1x139,6 g kolin klorür ve molekül 62,07 g/mol olan üreden 2x62,07 g alınmıştır.

Örneğin; CH:Üre (1:2 molar) = 1x139,6 g kolin klorür ve molekül 62,07 g/mol olan üreden 2x62,07 g alınmıştır.

Tablo 3.1: Deneylerde kullanılan DÖÇ çözeltileri ve mol oranları

HBA	HBD	Mol oranı (v/v)	DÖÇ	Kısaltma
Kolin klorür	Formik asit	1:2	Kolin klörür-Formik asit	DÖÇ-1
	Etilen glikol	1:2	Kolin klörür- Etilen glikol	DÖÇ-2
	Üre	1:2	Kolin klörür- Üre	DÖÇ-3

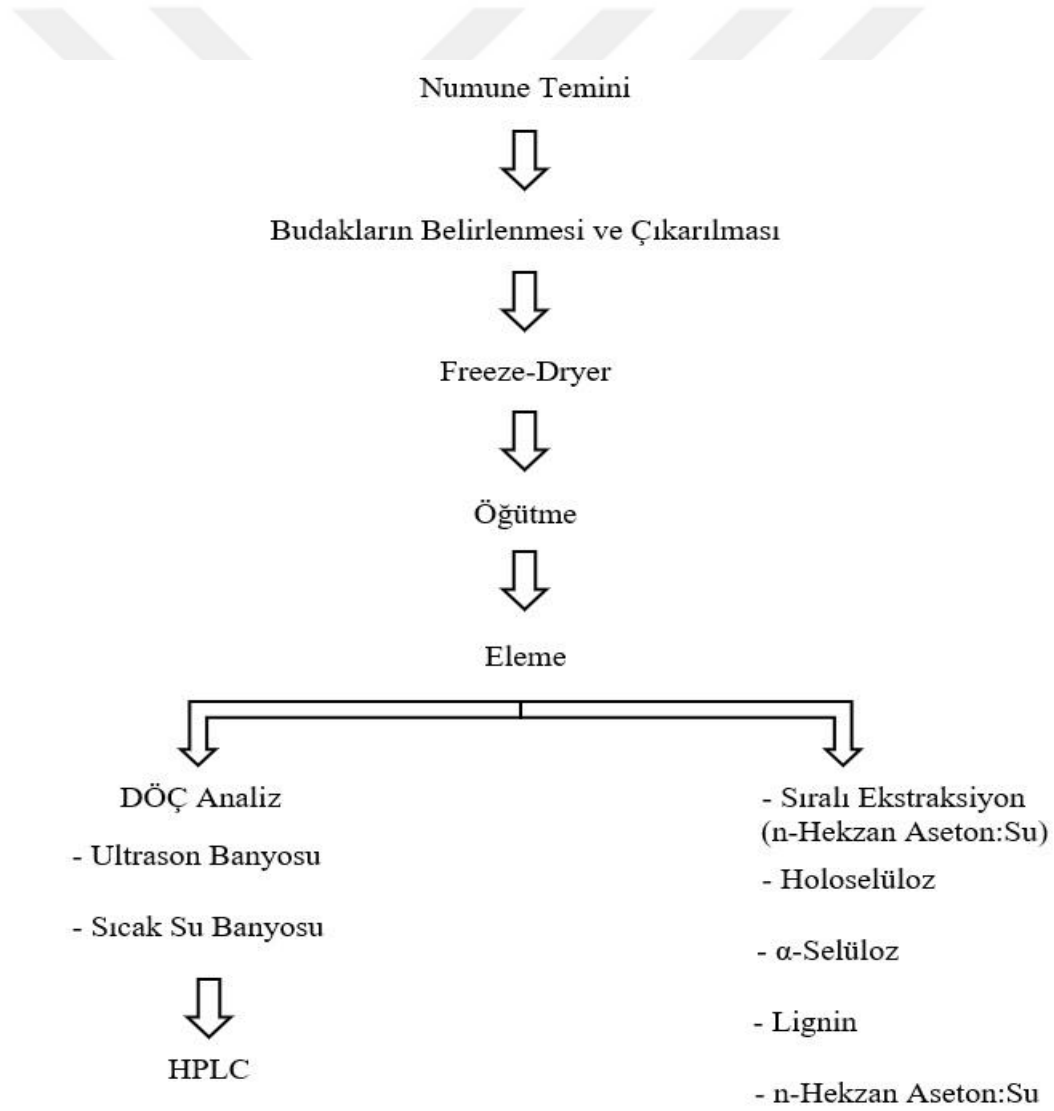


Şekil 3.2: Deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmış DÖÇ karışımları

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) standart olarak Sigma 56297 kodlu %97'lik (HPLC)'lik Pinoslyvin (PS) ve Abo Akademi Üniversitesi Organik kimya laboratuvarında temin edilen %99'luk Pinosylvinmonometileter (PSMME) kullanılmıştır.

3.2 Metot

Çalışma kapsamında örnekler öncelikle kimyasal analizler için hazırlanmıştır. Daha sonra, sırasıyla odun ana bileşenlerinin belirlenmesi ve ekstraksiyon deneyleri yapılmıştır. Ekstraksiyon deneyleri, organik çözücüler ve derin ötektik çözücüler (DÖÇ) olmak üzere iki farklı tip çözücü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra örnekler HPLC’de analiz edilmiş ve Box-Benchen optimizasyon yöntemiyle karaçam budaklarından stilben eldesi için uygun koşullar belirlenmiştir (Şekil 3.3). DÖÇ’ler ile muamelede ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı, örnek ve çözücü miktarı (Katı:sıvı oranı) ve su miktarı gibi faktörlerin etkisi incelenmiştir. Oluşturulan deney şablonu Tablo 3.2’de verilmiştir. Her bir deney 3 tekrar yapılmış olup toplam 864 deney yapılmıştır.



Şekil 3.3: Karaçam budaklarına ait deney akış şeması

Tablo 3.2: Karaçam budaklarına uygulanan deney şablonu

Yöntem	DÖÇ	Molar Oranı	Su Miktarı (%)			Katı:sıvı Oranı (g/mL)			Ekstraksiyon Süresi (dak.)		Ekstraksiyon Sıcaklığı (°C)	
Ultrason	ChCl:Formik asit	1:2	10	20	30	10	20	40	30	60	60	70
	ChCl:Üre	1:2	10	20	30	10	20	40	30	60	60	70
	ChCl:Et-gly	1:2	10	20	30	10	20	40	30	60	60	70
Sıcak-Su Banyosu	ChCl:Formik asit	1:2	10	20	30	10	20	40	30	60	60	70
	ChCl:Üre	1:2	10	20	30	10	20	40	30	60	60	70
	ChCl:Et-gly	1:2	10	20	30	10	20	40	30	60	60	70

3.2.1 Odun Ana Bileşenlerinin Belirlenmesi

TAPPI 257 cm-02 göre kabuk bölgelerinden temizlenen karaçam numunelerinin (Şekil 3.4) budak ve odun kısımları öncelikli olarak birbirinden ayrılmıştır. Daha sonra kibrit çöpü boyutuna getirilen budak örnekleri Freeze-dryer da rutubet miktarı istenilen seviyeye gelene kadar kurutma işlemine tabi tutulmuştur. Wiley tipi değirmende öğütülen örnekler sarsıntılı elekten elenerek 60 meshte kalan kısım kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4: Gövde odunun budak bölümlerinden ayrılması.(Fotoğraf : Öznur ÇAKAL,2018)

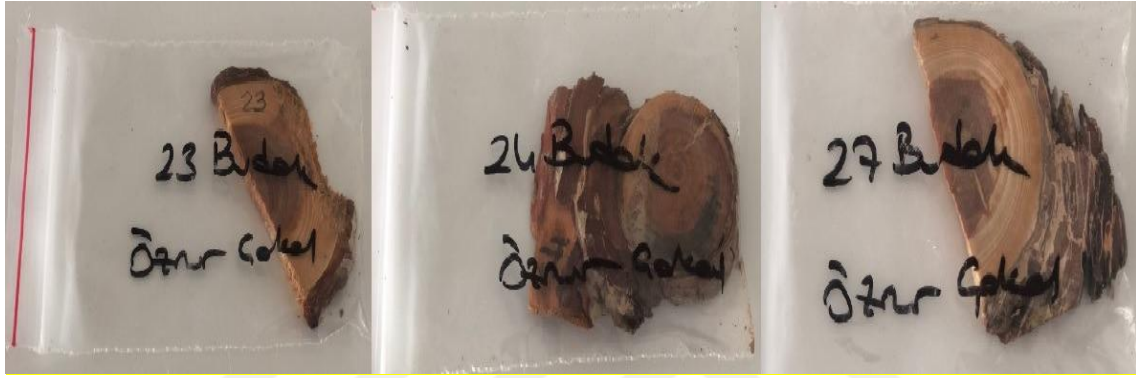


Şekil 3.5: Odun ve budak örneklerine ait kibrit çöpü eldesi ve öğütme işlemi
(Fotoğraf : Öznur ÇAKAL,2018)

3.2.2 Yaş Halkası Sayımı

Budak odunlarında yıllık halka sınırlarının net olarak görülmesi ve yıllık halka sayımı yapılabilmesi için öncelikle odun enine kesitleri 400 ve 800 kum numaralı zımpara kâğıtları ile zımparalanmıştır. Yıllık halka sayımında halkaların çok dar olduğu yerlerde büyütme gücü x10 veya x20 luplar kullanılmıştır.

Yaş halka sayımı yapılan örneklere ait görüntüler Şekil 3.6’de verilmiştir.



Şekil 3.6: Budak-23, 24, 27 yaş halkası sayımı (Fotoğraf: Öznur ÇAKAL,2019)

3.2.3 Kimyasal Analizler

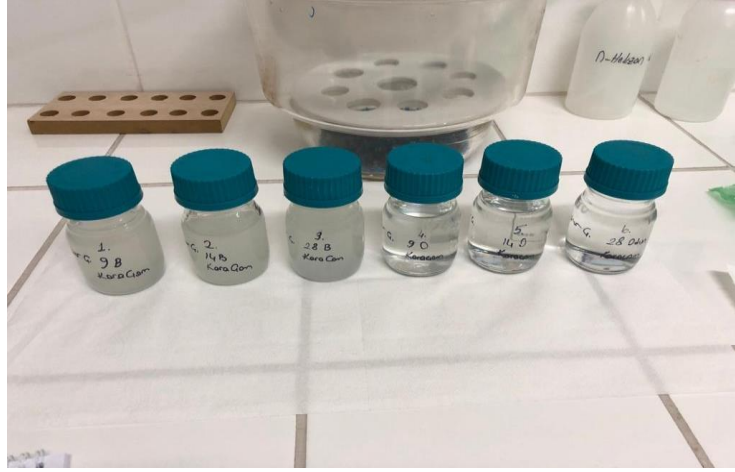
Bu bölümde budak örneklerine uygulanan geleneksel kimyasal analizler ve DÖÇ uygulamaları ele alınmıştır.

3.2.3.1 Odun Ana Bileşenlerinin Belirlenmesi

Karaçam gövde kısımlarından elde edilen budaklar ve aynı diskteki odun kısımlarına ait holoselüloz (Klorit -Wise ve Jahn 1952), α -selüloz (Rowell,2005) ve lignin (TAPPI T 222 om-02) değerleri ilgili standartlara göre tespit edilmiştir.

3.2.3.2 Çözünürlük Değerlerinin Belirlenmesi

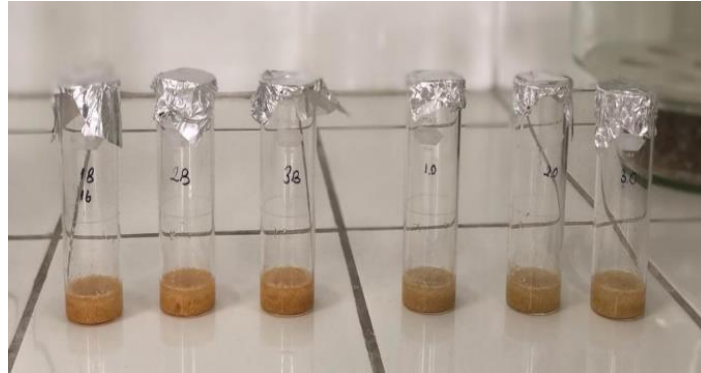
Odun ana bileşenlerini tespit etmeden önce örnekler sırasıyla n-hekzan ve aseton:su (95:5 v/v) çözücülerıyla soxhelette ekstrakte edilmişlerdir. Çözünürlük değerleri gravimetrik olarak hesaplanırken ayrıca GC/MS ve HPLC’de analiz edilmiştir (Şekil 3.7).



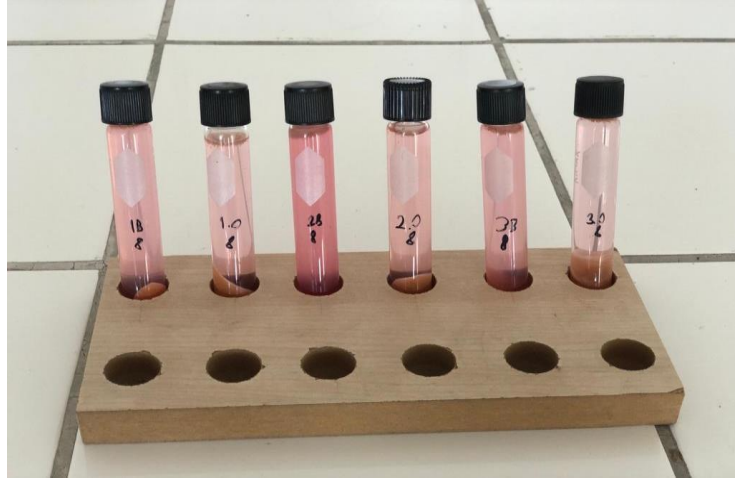
Şekil 3.7: Soxhlet Ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlar (Fotograf: Öznur ÇAKAL, 2018)

3.2.3.3 Ultrason Banyosunda Ekstraksiyon

1 g budak örneği tartılarak cam tüpler içerisine konulmuş ve üzerine DÖÇ çözültisi ilave edilmiştir. JEIOTECH marka ultrason banyosunda Tablo 3.2’de belirtilen süre ve sıcaklıklarda deneyler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8). Ekstraksiyon sonrası örnekler HETTİCH Rotofix 32A marka santrifüjde faz farkının oluşabilmesi ve berrak bir ekstrat eldesi amacıyla muamele edilmiş ve DÖÇ kısmı ayrılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.8: Ultrason banyosu öncesi Karaçam budak numunesi ve DÖÇ karışımı (Fotograf: Öznur ÇAKAL, 2020)



Şekil 3.9: Santrifüj işlemi ile katı-sıvı faz farkı elde edilen DÖÇ çözeltisi (Fotograf: Öznur ÇAKAL, 2020)

3.2.3.4 Sıcak Su Banyosunda Ekstraksiyon

Tartılan 1 g budak örneği ve DÖÇ çözeltisi cam tüpler içerisine konularak sıcaklık ve süre ayarı yapılabilen MEMMERT WNB-22 marka sıcak su banyosunda Tablo 3.2’de belirtilen süre ve sıcaklıklarda ekstrakte edilmiştir. Süre sonunda soğumaya bırakılan örnekler, bölüm 3.2.3.3’de belirtildiği gibi santrifüjlenmiştir.

3.2.4 Kalitatif ve Kantitatif Analizler

Elde edilen n-hekzan ve aseton:su (95:5 v/v) örnekleri kalitatif analizler öncesi Pyridine: trimetil klorosilan: N, O-bis(trimetil silil) trifloroasetamid ile silillendirilmiştir (Kılıç vd. 2011). Örnekler daha sonra Shimadzu marka GCMS-QP2010 GC-MS cihazında TRB-5MS kolon kullanılarak analiz edilmiştir. Sıcaklık programı 120⁰C başlayan ve 6C⁰/min artışla 310 ⁰C olarak kullanılmıştır.

DÖÇ çözeltisindeki PS ve PSMME ait kantitatif analizler ise Shimadzu marka HPLC’de gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi öncesinde çözelti çapı 25 mm, gözenek büyüklüğü 0.45 µm, tipi RC Rejenere Selüloz, Non-Steril filtrelerden süzölmüştür (Şekil: 3.10).



Şekil 3.10: DÖÇ çözeltisi için filtreleme işlemi (Fotograf: Öznur ÇAKAL, 2020)

HPLC analiz koşulları; Inertsil ODS-4 (5 μ m, 250mm x 4,6mm ID) tipi kolon, mobil fazlar ultra saf su (A), Metanol (B); Akış hızı: 0,8 ml/dk, Sıcaklık: 35° C; Dedektör: DAD dedektör-280 nm; Enjeksiyon hacmi: 20 μ l. Kullanılan gradient programı Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3: HPLC-DAD Cihaz Analiz Şartları

Kolon	ODS4 (5 µm, 250 mm x 4,6 mm i.d)			
Mobil Faz A	Ultra Saf Su			
Mobil Faz B	Metanol			
Kolon Fırın Sıcaklığı	35°C			
Dedektör	SPD-M20A DAD Dedektör			
Dedektör Dalga Boyu	280 nm			
Enjeksiyon Hacmi	20 µL			
Analiz Süresi	85 dk			
Gradient Programı	Zaman (dk)	Akış (ml/dk)	% Çözücü A	% Çözücü B
	0.01	1.00	98.00	2.00
	3.00	1.00	98.00	2.00
	6.00	1.00	95.00	5.00
	8.00	1.00	94.00	6.00
	12.00	1.00	90.00	10.00
	13.00	1.00	90.00	10.00
	18.00	1.00	75.00	25.00
	25.00	1.00	70.00	30.00
	30.00	1.00	60.00	40.00
	36.00	1.00	58.00	42.00
	41.00	1.00	46.00	54.00
	46.00	1.00	45.00	55.00
	56.00	1.00	44.00	56.00
	60.00	1.00	35.00	65.00
	63.00	1.00	25.00	75.00
	65.00	1.00	15.00	85.00
	70.00	1.00	5.00	95.00
	72.00	1.00	5.00	95.00
	73.00	1.00	0.00	100.00
	78.00	1.00	0.00	100.00
	80.00	1.00	20.00	80.00
	82.00	1.00	50.00	50.00
	85.00	1.00	98.00	2.00

3.2.5 Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmanın temel amacı, her bir bağımlı değişken için su, sıvı-katı, süre, sıcaklık, yöntem ve DÖÇ değişkenlerinin etkilerini test etme ve optimal seviyeleri belirlemektir. Çalışmada her bir bağımlı değişken için varyans analizi sonuçları (ANOVA), regresyon katsayıları sonuçları, üç boyutlu grafiksel gösterimler ve optimum düzey sonuçları verilmiştir.

Deneysel tasarım yönteminde faktörlerin etkileri sayısal olarak hesaplanmış ve bu sayısal değerler varyans analizi (ANOVA) incelenerek değerlerin anlamlı olup olmadığı yani faktörün deney sonucunda etkili olup olmadığı tespit edilmiştir.

Deneysel sonucunda elde edilen PS ve PSMME değerlerinin ortalamalarından oluşturduğumuz tablolar ile SPSS paket programında SSB ve USB yöntemleri için veriler ayrı ayrı girilerek veri setleri ayarlanmıştır. Bu ayarlanan veri setlerinin herbirine PS ve PSMME bağımlı değişkene bağlı olarak Sıcaklık, Süre, Katı Sıvı Oranı ve Su Miktarlarının etkileri Faktöriyel Varyans Analizi testi ile belirlenmiştir. Katı Sıvı Oranında 3 farklı değişken ve Su Miktarında 4 farklı değişken olduğundan bunların PS ve PSMME üzerindeki Çoklu karşılaştırmalarında Tukey testini tercih edilmiştir. Sıcaklık ve Sürede 2 farklı değişken olduğundan Faktöriyel varyans analizinde p değerinin 0,05'ten küçük çıkması anlamlılık için yeterli olduğundan tekrardan Tukey testi yapılmamıştır. Box-Behnken deney tasarımı çalışmalarında da çok değişkenli varyasyon analizi sonuçları ile çok yakın benzerlikler göstermektedir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

4.1 Karaçam Odun Ana Bileşenlerine Ait Bulgular

Karaçam (*P. Nigra*) odun ve budak örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi holoselüloz miktarı budak odununda % 75,6 iken normal odunda % 76,4, alfa-selüloz miktarı budak odununda % 47,9, normal odunda % 48,9, lignin miktarı budak odununda % 25,8, normal odunda % 27,5 olarak belirlenmiştir. Odun ana bileşenleri (selüloz ve lignin) odun kısmında budağa göre kısmen daha yüksek miktarda bulunmuştur. Ancak, n-hekzan ve aseton:su karışımı ile yapılan odun yan bileşenlerini tespit için kullanılan sıralı ekstraksiyon sonuçları ise budak odununda % 14,3-25,7 iken gövde odunda bu oran % 3,5-6,53 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler literatürle karşılaştırıldığında, karaçam odununa ait sonuçlar benzerlik göstermiştir.

Tablo 4.1: Karaçam (*P. nigra*) numunesine ait kimyasal analiz sonuçları (%)

Deneyler	Karaçam (Tespit)		Karaçam (Alkan,2004)	Karaçam (Sarıusta 2007)	
	Odun	Budak	Odun	Basınç Odunu	Normal Odun
Holoselüloz	76,4±1,3	75,6±0,6	65,7±1,88	69,84	71,53
α-selüloz	48,9±0,3	47,9±0,2	45,6±0,6	46,45	50,41
Lignin	27,5±0,4	25,8±0,2	25,8±0,02	31,8	26,74
Sıralı Ekstraksiyon	3,5-6,53	14,3-25,7	-	-	-

4.2 Çözünürlük Değerlerine Ait Bulgular

Soxhlet cihazında yapılan sıralı ekstraksiyonda kullanılan organik çözücülerden hekzan ve aseton-su örnekleri Bölüm 3.2.4’de belirtilen kalitatif ve kantitatif analiz şartları uygulanarak hem kimyasal kompozisyonu hem de PS ve PSMME miktarları belirlemede kullanılmıştır. Tablo 4.2’de n-hekzan ekstraktına ait GC-MS sonuçlarında görülmektedir. PSMME’in ekstrakt içerisinde tespit edilmesi üzerine sililasyona ihtiyaç duyulmadan ve DÖÇ çözeltileri ile karşılaştırma yapabilmek adına aseton ekstraktı GC-MS’de analiz edilmemiştir. n-hekzan ekstraktında en yüksek miktar % 22,8 ile palustic asit olurken, bunu levopimaric asit takip etmiştir. Yağ asitlerinin oranı ise sadece %10,5’dir.

Tablo 4.2 ve Tablo 4.3’te n-hekzan ve aseton:su ekstraktına ait GC-MS analiz sonuçları yer almaktadır. Her iki tablo incelendiğinde PSMME ‘in gerek aseton:su gerekse n-hekzan örneklerinde %9,07 ile %7,89 oranlarında tespit edildiği görülmektedir. Ancak, her iki örnekte de PS tespit edilememiştir. Abietic asit, palustic asit ve levopimaric asit diğer önemli bileşikler olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.2: Karaçam budaklarına ait n-hekzan ekstraktına ait GC-MS analiz sonuçları.

RT	Bileşik	%
21.374	pimaral	1.24
21.540	18:3	0.61
21.896	18:2	3.89
21.998	18:1	5.99
22.304	pimarol	0.71
23.545	PSMME	7.89
23.826	pimaric acid	10.66
24.072	sandrocopimaric acid	2.81
24.307	isopimaric acid	4.31
24.747	palustic acid	22.88
25.106	levopimaric acid	18.26
25.197	dehydroabietic acid	5.21
25.739	abietic acid	15.54

Tablo 4.3: Karaçam budaklarına ait aseton:su ekstraktına ait GC-MS analiz sonuçları.

RT	Bileşik	%
20,165	18:2	1,96
20,238	18:1	3,13
20,586	pimarol	0,38
21,551	PSMME	9,07
21,825	pimaric asit	6,54
22,049	sandrocopimaric asit	1,48
22,241	isopimaric asit	2,28
22,557	palustric asit	18,58
22,866	levopimaric asit	12,31
22,966	dehydroabietik asit	7,93
23,414	abietik acit	20,36
24,735	Neoabietik	15,98

DÖÇ örneklerinin sililasyonunda yaşanan sorunlar, örneklerin içindeki su ilaveleri ve 2 hedef madde (PS ve PSMME) olması nedeniyle tez çalışmaları HPLC cihazında devam etmiştir. Öncelikle kontrol örneği olarak değerlendirilen n-hekzan ve aseton:su örnekleri HPLC enjekte edilmiş elde edilen sonuçlar ppm olarak Tablo 4.4’de verilmiştir. n-hekzan ekstraktında PSMME 195 ppm olarak tespit edilirken PS tespit edilememiştir. Bu sonuç GC-MS sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Tablo 4.4: Karaçam budaklarına ait sıralı ekstraksiyon HPLC sonuçları (ppm = mg/L)

Bileşikler	Hekzan ekstraktı	Aseton:su ekstraktı
PS	-	46,3±0,5
PSMME	195±1	75,3±0,9

Wilför vd. (2003) yaptıkları çalışmada, büyük miktarlarda fenolik stilbenler %1-7 (a/a), lignanlar %0,4 3 (a/a), gövde odununda ise yaklaşık %1 (a/a) stilben içerdiği saptanmıştır. Ayrıca lignan içeriğine rastlanmamıştır. Gövde öz odunu olmayan genç ağaçlarda, budaklardaki stilben içeriği, gövdedekinin 200 katına kadar çıkmıştır. Budaklardaki fenolik bileşik içeriğinde bazı ağaç içi ve ağaç yanında farklı varyasyonlar görülmüştür. Gövde içinde aynı seviyede, dış dalda ise belirgin olarak azaldığı görülmüştür.

4.3 Derin Ötektik Çözücülere (DÖÇ) Ait Bulgular

Üç farklı derin ötektik çözücü ve iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen Pinosilvin (PS) ve Pinosilvinmonometileter (PSMME) değerleri bu bölümde ayrı ayrı ele alınmıştır.

4.3.1 Karaçam Budaklarından Farklı DÖÇ'lerle Elde Edilen PS Bulguları

Kolin klorür bazlı formik asit, etilen glikol ve üre kullanılarak yapılan ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen ortalama PS değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verilmiştir. Tablo değerlerinde bazı standart sapma değerlerinin yüksek çıkması farklı büyüklüklerde budakların karıştırılarak hammadde olarak kullanılmasından ve bazı budak örneklerine sınır normal odun örneklerinin karışmasından kaynaklandığı kanaatindeyiz. Ayrıca Willför vd. (2003) göre stilben konsantrasyonu ağacın kendi içinde budakların bulunduğu yere göre değişiklik göstermektedir.

Tablo 4.5: Sıcak su banyosunda Karaçam budaklarından elde edilen PS değerleri
(Kuru örnek) (ppm)

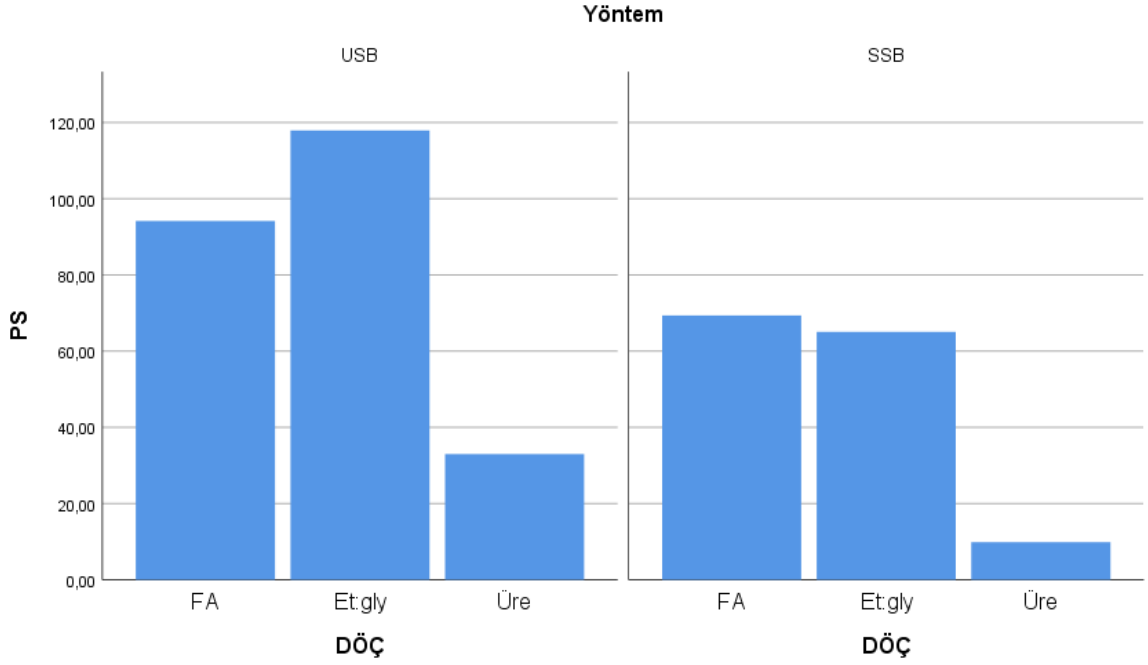
DÖÇ	Su Miktarı (%)	Katı:Sıvı Oranı(mg/mL)	Sıcaklık (°C)			
			60°C		70°C	
			Süre (dak.)			
			30	60	30	60
ChCl:FA	0	10	89,1±6,2	45,1±36,2	86,0±7,9	48,0±12,2
		20	51,8±4,0	54,2±11,0	50,6±3,7	42,5±2,5
		40	33,9±3,1	32,7±3,5	24,6±3,2	29,7±3,2
	10	10	149,2±24,7	149,6±19,8	168,0±34,4	115,6±5,9
		20	44,5±6,0	68,5±5,9	47,7±30,2	69,6±12,0
		40	33,3±8,4	35,5±7,0	35,0±8,1	32,5±5,4
	20	10	139,3±6,0	162,4±5,9	134,0±30,2	120,9±12,0
		20	64,2±3,3	67,9±10,9	73,0±10,6	80,2±5,7
		40	21,6±6	17,4±2	14,9±1,5	17,5±4,7
	30	10	145,7±1,7	154,3±2,8	156,2±3	142,4±1,6
		20	34,1±2,7	41,5±6,9	22±3,9	26,2±2,5
		40	20,7±0,9	37,4±2,7	35,0±7,9	63,0±3,5
ChCl:Et-gly	0	10	29,7±7,7	30,9±3,1	52,3±7,3	68±3,8
		20	8,30±2,6	9,1±1,3	11,8±1,7	13,6±2,3
		40	10,3±1	8,5±0,8	9,4±1,5	8,2±1,1
	10	10	13,5±0,6	8,1±0,7	117±4,3	130±2,5
		20	9,7±1,4	7,9±0,1	54,2±7,8	51,2±3,9
		40	13±2,6	18,1±1,7	11,5±1,3	17,4±0,8
	20	10	152±4,1	154±15	161±11,3	148±15
		20	37±9	41±11	28±1,9	36±6,3
		40	15±2,1	11,6±0,6	14,9±2	11,6±1
	30	10	158±6,3	144±3,8	152±4,0	156±10
		20	57±9,4	15±3	15±2,1	39,1±3,9
		40	10,8±0,7	9,7±2,6	11±0,4	12±2,1
ChCl:Üre	10	10	12,8±0,04	12,6±0,30	12,2±0,57	11,8±0,23
		20	8,3±1,6	6,1±1,2	12,6±0,3	14,9±2,2
	20	10	11,3±1,0	12,1±0,0	13,1±0,1	11,9±1,0
		20	12,9±0	11,0±0,6	11,7±0,2	6,7±0,1
	30	10	13,65±3,9	0	0	12,24±0,2
		20	6,6±0,5	6,1±0,1	6,3±0,7	10± 0,8

Tablo 4.6: Ultrason su banyosunda Karaçam budaklarından elde edilen PS değerleri (ppm)

DÖÇ	Su Miktarı (%)	Katı:Sıvı Oranı(mg/ml)	Sıcaklık (°C)			
			60°C		70°C	
			Süre (dk.)			
			30	60	30	60
ChCl:FA	0	10	210,9±0,4	209,4±0,1	183,4±9,7	86,2±9,8
		20	19,1±1,7	21,5±1,7	20,8±0,1	103,2±2,9
		40	18,7±6	27,1±5,6	49,3±2,5	42,3±4,5
	10	10	206,7±11,3	181,9±11	5,8±1,5	15,1±8,1
		20	89,3±0,78	95,6±0,51	88,0±0,42	88,2±0,87
		40	41,2±3,3	31,1±3,8	43,7±1,9	48,7±0,14
	20	10	247,7±5,7	198,4±9,9	222,5±9,1	229±8,2
		20	93,2±2,3	72,3±4,8	102,5±5,5	84,3±4,9
		40	50,6±2,5	51,0±1,6	49,6±2,3	42,1±0,8
	30	10	229,4±1,6	159,5±5,13	137,5±8,1	139,9±0,1
		20	88,2±3,66	72,6±5,8	83,4±2	85,4±3,8
		40	46,5±2	41,5±4,7	22,8±6,3	41,8±6,9
ChCl:Et-glc	0	10	195,4±15,7	196,6±15,6	209,7±4,2	212±9
		20	36,3±2,1	63,8±4,4	101,5±5,3	69,1±24,5
		40	49,6±1,0	48,7±1,7	44,8±5,4	48,2±3,7
	10	10	281,1±6,3	231,3±15,7	229,4±18	270,4±21
		20	15,4±0,7	11,6±0,7	99±7,0	107±0,8
		40	42,2±5,7	44,2±5,8	36±2,1	51,9±1,8
	20	10	106,4±2,8	97±2,8	239±16,4	262,3±5,5
		20	114,2±5,9	115,6±3,8	111,6±13	117,5±11
		40	57,2±9,6	55,4±2,4	54,7±5,9	56±3,5
	30	10	238,1±7,3	109±1,4	229,7±5,1	229,8±8,6
		20	126,3±3,0	131,8±4,0	136,6±4,6	128,9±4,6
		40	66,4±3,6	59,2±3,2	52,6±1,3	69,4±1,2
ChCl:Üre	10	10	29,9±0	30,0±0,2	29,5±0,5	35,9±0,2
		20	31,1±0,6	32,3±1,6	31,9±1,1	33,6±0,6
		40	31,2±0,5	29,1±0,3	28,0±0,8	35,9±0,1
	20	10	35,5±0,4	36,7±0,9	36,3±0,8	36,0±0,5
		20	34,5±2,2	32,8±1,1	34,2±0,7	34,7±0,6
		40	36,5±0,1	32,9±0,9	33,1±0,3	33,2±2,2
	30	10	31,5±0,1	32,2±0,2	31,8±1,1	30,3±1,3
		20	35,6±0,6	34,8±1,3	31,7±0,7	29,3±0,2
		40	34,2±1,9	37,2±0,4	37,8±0,7	32,4±3,0

Tablo 4.5’te görüldüğü gibi ChCl:Üre çözücüsü ile yapılan deneylerde susuz çalışmak (% 0) oldukça düşük sonuçlar vermiştir. Benzer sonuçlar Tablo 4.6’da de görülmektedir.

Karaçam budaklarından elde edilen PS değerlerinin ortalamaları Şekil 4.1’de belirtilmektedir.



Şekil 4.1: Karaçam budaklarından elde edilen PS değerlerinin ortalamaları

PS’ye ait ortalama değerler incelendiğinde (Şekil 4.1) USB ekstraksiyonu için Et-gly, SSB ekstraksiyonu için ise ChCl:FA DÖÇ çözeltisinin daha verimli sonuçlar verdiği görülmektedir.

4.3.1.1 Karaçam Budaklarından Chl:Et-glc kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Tablo 4.7 değerlendirildiğinde anlamlılık düzeyleri Su Miktarı, Katı Sıvı Oranı, Su Miktarı-Katı Sıvı Oranı, Su Miktarı-Sıcaklık ve Katı Sıvı Oranı-Sıcaklık gibi bağımsız değişkenlerin p-değerleri 0.05’den küçük bulunmuştur. Bu durum PS üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 4.7: Chl:Et-glc kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	P
Düzeltilmiş Model	130934,117 ^a	24	5455,588	22,627	0
Kesişim	110323,36	1	110323,36	457,555	0
Su Miktarı	17630,982	3	5876,994	24,374	0
Katı Sıvı Oranı	79007,57	2	39503,785	163,838	0
Süre	0,213	1	0,213	0,001	0,977
Sıcaklık	2652,213	1	2652,213	11	0,003
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	22490,455	6	3748,409	15,546	0
Su Miktarı * Süre	106,848	3	35,616	0,148	0,93
Su Miktarı * Sıcaklık	5783,658	3	1927,886	7,996	0,001
Katı Sıvı Oranı * Süre	4,543	2	2,271	0,009	0,991
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	3007,38	2	1503,69	6,236	0,007
Süre * Sıcaklık	250,253	1	250,253	1,038	0,319
Hata	5545,64	23	241,115		
Toplam	246803,12	48			
Düzeltilmiş Toplam	136479,76	47			
a. $R^2 = 0,959$ (Düzeltilmiş $R^2 = 0,917$)					

Tablo 4.7 ve Tablo 4.8’de PS maddesi için sıcak su banyosunda Chl:Et-glc kullanılarak yapılan ekstraksiyon için su miktarı ve katı-sıvı oranı çoklu karşılaştırmaları verilmiştir. Anlamlılık düzeylerini göre su miktarının %0 ya da %10 olması %20 ve %30 olmasına göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmaktadır (Tablo 4.7). Yapılan Tukey testinde ortalama farklar incelediğinde %10 su miktarının değer su miktarlarına (%0, %20 ve %30)’na göre daha anlamlı bir fark yarattığı görülmektedir. Bilindiği gibi su miktarı DÖÇ’lerde viskoziteyi artırmakta bu da ekstraksiyonun etkinliğini olumlu yönde etkilemektedir. % 10 oranında su katılması ChCl:Et:glc çözücüsünün PS’yi çözmesinde % 0,%20 ve %30 göre istatistiksel olarak daha etkili olmuştur.

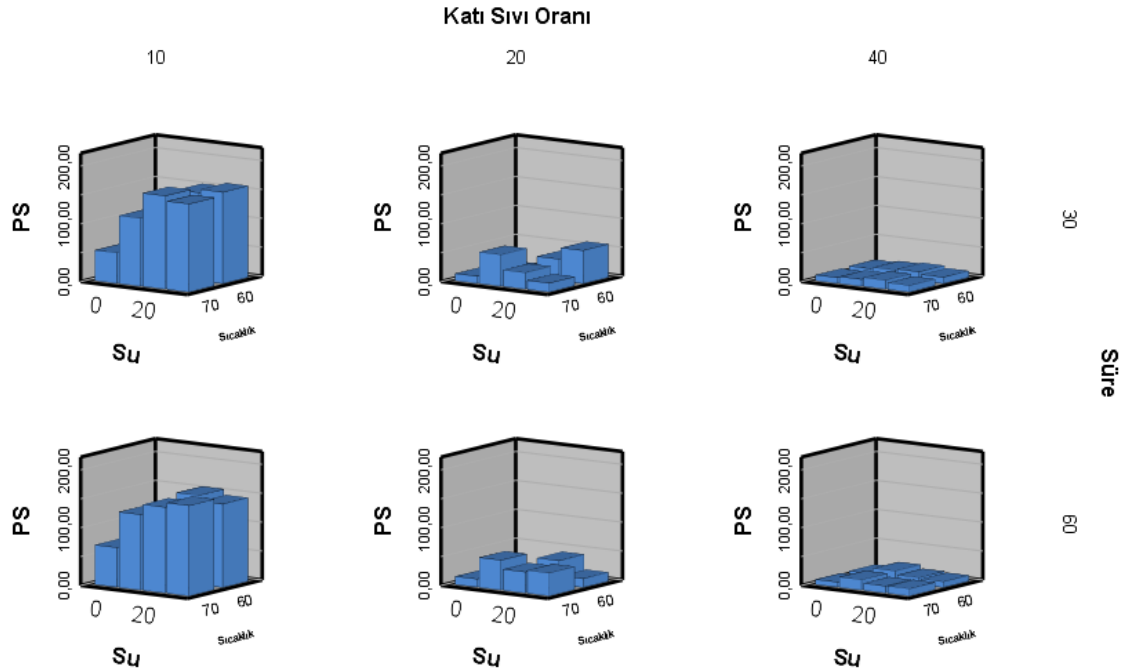
Tablo 4.8: Su Miktarının SSB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi.

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	0	10	-15,9417	6,33923	0,084
		20	-45,8333*	6,33923	0
		30	-43,2917*	6,33923	0
	10	0	15,9417	6,33923	0,084
		20	-29,8917*	6,33923	0,001
		30	-27,3500*	6,33923	0,001
	20	0	45,8333*	6,33923	0
		10	29,8917*	6,33923	0,001
		30	2,5417	6,33923	0,978
	30	0	43,2917*	6,33923	0
		10	27,3500*	6,33923	0,001
		20	-2,5417	6,33923	0,978
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 241,115.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					

Katı-sıvı oranı için yapılan Tukey testinde %95 güven aralığında anlamlı farklılıklar görülmüştür (Tablo 4.8). Sıcak su banyosunda ChCl:Et-glc için %10 katı sıvı oranının en iyi olduğu görülmüştür. 1 g örneğe 10 mL DÖÇ çözeltisi kullanılan örneklerde PS daha fazla miktarda ekstrakte edilmiştir.

Tablo 4.9: Katı-Sıvı oranının SSB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	77,5500*	5,48993	0
		40	92,5938*	5,48993	0
	20	10	-77,5500*	5,48993	0
		40	15,0437*	5,48993	0,03
	40	10	-92,5937*	5,48993	0
		20	-15,0437*	5,48993	0,03
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 241,115.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					



Şekil 4.2: SSB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PS değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi

Şekil 4.2 incelendiğinde, SSB’de kolin klorürü ve etilen glikol ile yapılan deneylerde ekstraksiyon süresinin PS miktarı üzerinde istatistiksel olarak etkili olmadığı, ekstraksiyon sıcaklığının ise genel olarak 70°C ‘de PS değerlerini etkilediği görülmektedir.

4.3.1.2 Karaçam Budaklarından ChCl:FA kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Çalışmada kullanılan diğer bir DÖÇ türü de kolin klorür:formik asit’tir. Asidik DÖÇ çözeltilerinin budaklardaki PS miktarına etkisi Tablo 4.10’da verilen varyans analiz ile ortaya konulmuştur. Su Miktarı, Katı Sıvı Oranı, Su Miktarı-Katı Sıvı Oranı, Su Miktarı-Sıcaklık ve Katı Sıvı Oranı-Sıcaklık gibi bağımsız değişkenlerin p-değerleri 0.05’den küçük bulunmuştur. Bu durum PS üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 4.10: ChCl:FA kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	104783,646 ^a	24	4365,985	30,388	0
Kesişim	230880,02	1	230880,02	1606,95	0
Su Miktarı	6824,928	3	2274,976	15,834	0
Katı Sıvı Oranı	79198,103	2	39599,051	275,613	0
Süre	8,168	1	8,168	0,057	0,814
Sıcaklık	72,03	1	72,03	0,501	0,486
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	15923,854	6	2653,976	18,472	0
Su Miktarı * Süre	829,091	3	276,364	1,924	0,154
Su Miktarı * Sıcaklık	91,345	3	30,448	0,212	0,887
Katı Sıvı Oranı * Süre	1417,134	2	708,567	4,932	0,017
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	218,911	2	109,456	0,762	0,478
Süre * Sıcaklık	200,083	1	200,083	1,393	0,25
Hata	3304,553	23	143,676		
Toplam	338968,22	48			
Düzeltilmiş Toplam	108088,2	47			
a. R ² = 0,969 (Düzeltilmiş R ² = 0,938)					

Tablo 4.11 incelendiğinde su miktarının %10, %20 ve %30 olması %0 olmasına göre istatistiksel olarak %95 güven aralığında anlamlı bir fark yaratmaktadır. Bu noktadan hareketle kolin klorür bazlı DÖÇ çözeltilerinde formik asit gibi asidik bir HBA (elektron alıcı) kullanıldığında susuz çalışmak (%0 su miktarı) PS verimi açısından iyi sonuçlar vermektedir.

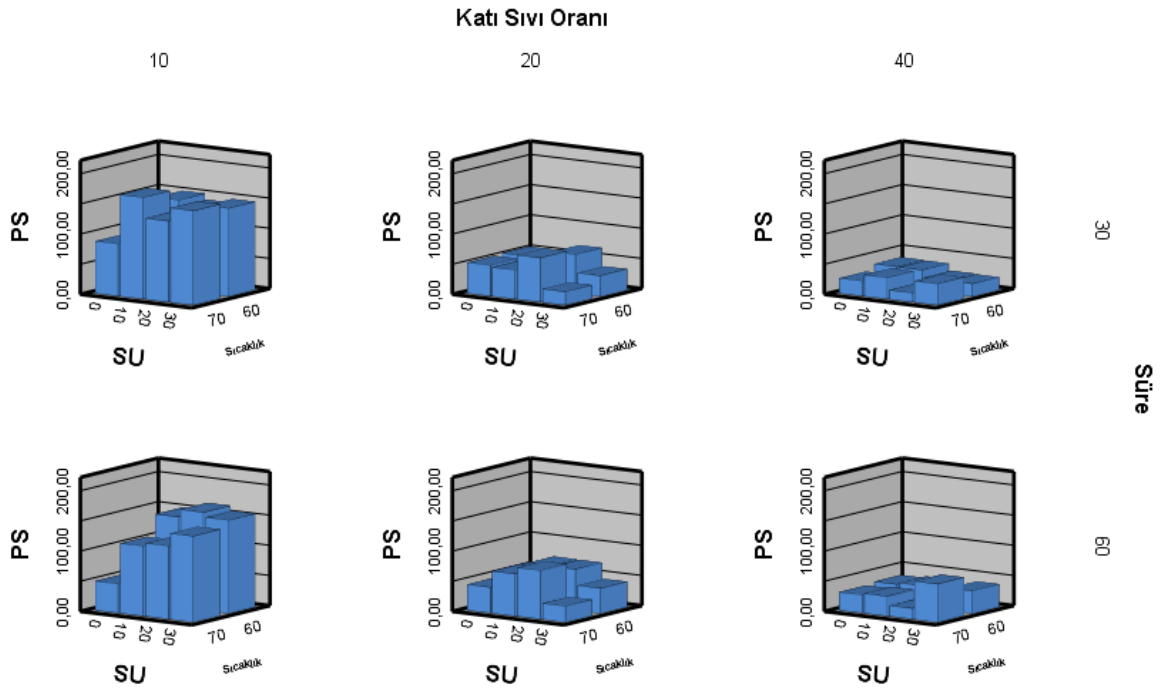
Tablo 4.11: Su Miktarının SSB’da ChCl:FA ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	0	10	-30,0667*	4,89347	0
		20	-27,0917*	4,89347	0
		30	-24,1917*	4,89347	0
	10	0	30,0667*	4,89347	0
		20	2,975	4,89347	0,929
		30	5,875	4,89347	0,633
	20	0	27,0917*	4,89347	0
		10	-2,975	4,89347	0,929
		30	2,9	4,89347	0,933
	30	0	24,1917*	4,89347	0
		10	-5,875	4,89347	0,633
		20	-2,9	4,89347	0,933
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 143,676.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					

ChCl:FA kullanılarak SSB’da yapılan ekstraksiyonda PS miktarına katı-sıvı oranının etkisi yapılan Tukey testi ile ortaya konulmuştur (Tablo 4.12). Anlamlılık düzeyleri incelendiğinde %95 güven aralığında bütün değerler 0,05’den küçük çıkmıştır. Katı-sıvı oranları kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmıştır. Tablo 4.12 incelendiğinde %10’luk katı-sıvı oranının %20-40 göre daha verimli sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu durum kolin klorürü bazlı etilen glikol DÖÇ çözeltisi ile benzerlik göstermektedir.

Tablo 4.12: Katı-Sıvı oranının SSB’da ChCl:FA ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	72,9563*	4,23787	0
		40	95,0688*	4,23787	0
	20	10	-72,9562*	4,23787	0
		40	22,1125*	4,23787	0
	40	10	-95,0687*	4,23787	0
		20	-22,1125*	4,23787	0
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 143,676.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					



Şekil 4.3: SSB’de ChCl:FA ile elde edilen PS değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi.

Şekil 4.3 incelendiğinde, SSB’de kolin klorürü ve formik asit ile yapılan deneylerde ekstraksiyon süresinin ve sıcaklığının PS miktarı üzerinde istatistiksel olarak etkili olmadığı, görülmektedir.

4.3.1.3 Karaçam Budaklarından ChCl:Üre kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Üçüncü DÖÇ çözeltisi olarak kullanılan kolin klorür:üre çözeltisine ait varyans analizi Tablo 4.13’de verilmiştir. % 95 güven aralığında anlamlılık düzeylerinin hiçbirisi 0,05’den küçük çıkmadığı için SSB’de ChCl:Üre DÖÇ çözeltisinin PS miktarı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır. Bu nedenle bağımlı değişkenlere Tukey testi uygulanmamıştır.

Tablo 4.13: ChCl:Üre kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	189,398 ^a	14	13,528	0,648	0,775
Kesişim	2324,41	1	2324,41	111,294	0
Su Miktarı	106,67	2	53,335	2,554	0,132
Katı Sıvı Oranı	5,217	1	5,217	0,25	0,629
Süre	1,876	1	1,876	0,09	0,771
Sıcaklık	3,596	1	3,596	0,172	0,688
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	8,803	2	4,401	0,211	0,814
Su Miktarı * Süre	6,556	2	3,278	0,157	0,857
Su Miktarı * Sıcaklık	16,76	2	8,38	0,401	0,681
Katı Sıvı Oranı * Süre	0,149	1	0,149	0,007	0,935
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	5,714	1	5,714	0,274	0,614
Süre * Sıcaklık	34,058	1	34,058	1,631	0,234
Hata	187,967	9	20,885		
Toplam	2701,77	24			
Düzeltilmiş Toplam	377,365	23			

a. $R^2 = 0,502$ (Düzeltilmiş $R^2 = -0,273$)

4.3.1.4 Karaçam Budaklarından ChCl:Et-glc kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Tablo 4.14 değerlendirildiğinde anlamlılık düzeyleri Su Miktarı, Katı Sıvı Oranı, Su Miktarı-Katı Sıvı Oranı, Su Miktarı-Sıcaklık ve Katı Sıvı Oranı-Sıcaklık gibi bağımsız değişkenlerin p-değerleri 0.05'den küçük bulunmuştur. Bu durum PS üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 4.14: ChCl:Et-glc kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS miktarına ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	259550,987 ^a	24	10814,624	9,541	0
Kesişim	667384,75	1	667384,75	588,795	0
Su Miktarı	3893,182	3	1297,727	1,145	0,352
Katı Sıvı Oranı	210454,41	2	105227,2	92,836	0
Süre	155,88	1	155,88	0,138	0,714
Sıcaklık	9472,51	1	9472,51	8,357	0,008
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	24347,827	6	4057,971	3,58	0,012
Su Miktarı * Süre	1126,882	3	375,627	0,331	0,803
Su Miktarı * Sıcaklık	2019,236	3	673,079	0,594	0,625
Katı Sıvı Oranı * Süre	805,73	2	402,865	0,355	0,705
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	6052,22	2	3026,11	2,67	0,091
Süre * Sıcaklık	1223,11	1	1223,11	1,079	0,31
Hata	26069,933	23	1133,475		
Toplam	953005,67	48			
Düzeltilmiş Toplam	285620,92	47			
a. $R^2 = 0,909$ (Düzeltilmiş $R^2 = 0,813$)					

Tablo 4.15 ve Tablo 4.16'da PS maddesi için ultrason banyosunda ChCl:Et-glc kullanılarak yapılan ekstraksiyon için su miktarı ve katı-sıvı oranı çoklu karşılaştırmaları verilmiştir. Anlamlılık düzeylerini incelediğimizde su miktarı istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmektedir (Tablo 4.15).

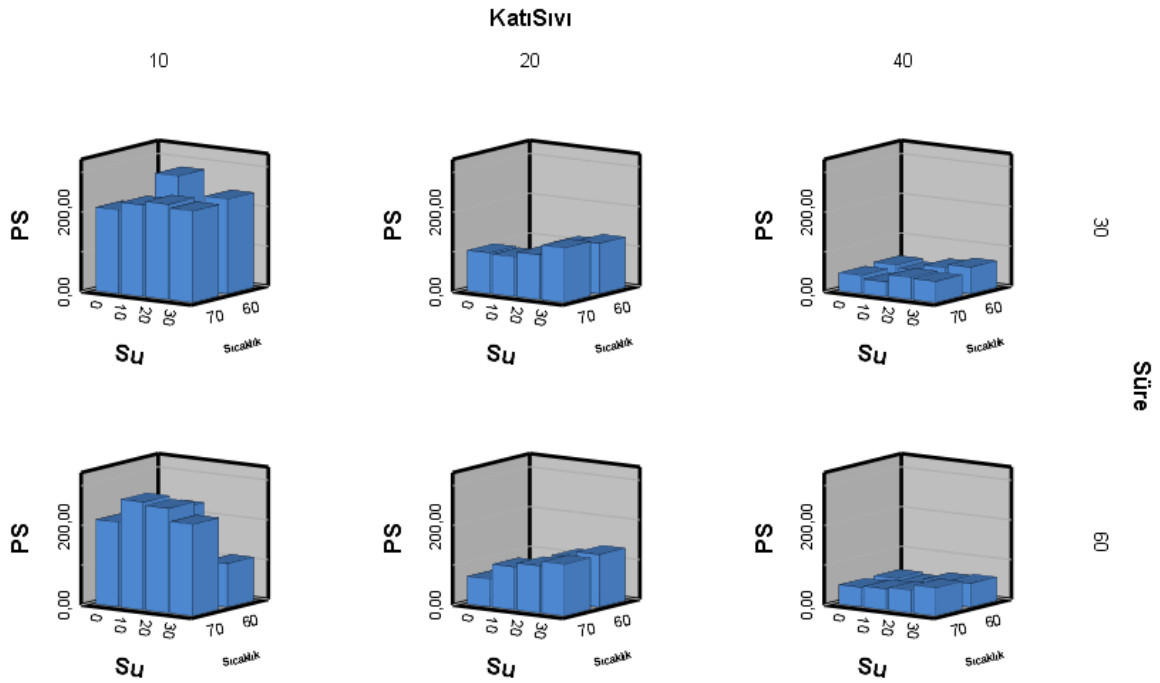
Tablo 4.15: USB'de Et:gly için Su Miktarının çoklu karşılaştırılması

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	0	10	-11,9833	13,7446	0,819
		20	-9,2667	13,7446	0,906
		30	-25,175	13,7446	0,285
	10	0	11,9833	13,7446	0,819
		20	2,7167	13,7446	0,997
		30	-13,1917	13,7446	0,773
	20	0	9,2667	13,7446	0,906
		10	-2,7167	13,7446	0,997
		30	-15,9083	13,7446	0,659
	30	0	25,175	13,7446	0,285
		10	13,1917	13,7446	0,773
		20	15,9083	13,7446	0,659
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 1133,475.					

Tablo 4.16'da USB'da kolin klorür ve etilen glikol ile yapılan ekstraksiyonda katı-sıvı oranının PS miktarına etkisi %95 güven aralığında yapılan Tukey testi ile anlamlı farklılıklar göstermiştir. Ultrason banyosunda ChCl:Et:glc için %10 katı sıvı oranının en iyi olduğu görülmüştür. Bu durum SSB'da yapılan ekstraksiyonla benzerlik göstermektedir.

Tablo 4.16: Katı-Sıvı oranının USB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	115,6875*	11,9031	0
		40	156,2938*	11,9031	0
	20	10	-115,6875*	11,9031	0
		40	40,6063*	11,9031	0,007
	40	10	-156,2938*	11,9031	0
		20	-40,6063*	11,9031	0,007
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 1133,475.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					



Şekil 4.4: USB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PS değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi

Şekil 4.4 incelendiğinde USB’de kolin klorürü ve etilen glikol ile yapılan deneylerde ekstraksiyon süresinin PS miktarı üzerinde istatistiksel olarak etkili olmadığı, ekstraksiyon süresinin ise genel olarak 70°C ‘de PS değerlerini etkilediğini görülmektedir.

4.3.1.5 Karaçam Budaklarından ChCl:FA kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Ultrason banyosunda 2. DÖÇ ile yapılan çalışmada, asidik DÖÇ çözeltilerinin budaklardaki PS miktarına etkisi Tablo 4.17’de verilen varyans analiz ile ortaya konulmuştur. Su Miktarı, Katı Sıvı Oranı, Sıcaklık, Su Miktarı-Katı Sıvı Oranı ve Katı Sıvı Oranı-Sıcaklık gibi bağımsız değişkenlerin p-değerleri 0.05’den küçük bulunmuştur. Bu durum PS üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir. Süre, Su miktarı-Süre, Su miktarı-Sıcaklık, Katı sıvı oranı-Süre, Süre-Sıcaklık gibi bağımsız değişkenlerin p-değerleri ise 0.05’den büyük bulunmuştur. Bu bağımsız değişkenler istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamıştır.

Tablo 4.17: ChCl:FA kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	208524,357 ^a	24	8688,515	9,128	0
Kesişim	425426,19	1	425426,19	446,954	0
Su Miktarı	12951,324	3	4317,108	4,536	0,012
Katı Sıvı Oranı	135284,35	2	67642,174	71,065	0
Süre	695,402	1	695,402	0,731	0,402
Sıcaklık	4959,3	1	4959,3	5,21	0,032
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	23885,143	6	3980,857	4,182	0,005
Su Miktarı * Süre	369,471	3	123,157	0,129	0,942
Su Miktarı * Sıcaklık	7023,849	3	2341,283	2,46	0,088
Katı Sıvı Oranı * Süre	2548,376	2	1274,188	1,339	0,282
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	20158,138	2	10079,069	10,589	0,001
Süre * Sıcaklık	649,005	1	649,005	0,682	0,417
Hata	21892,181	23	951,834		
Toplam	655842,73	48			
Düzeltilmiş Toplam	230416,54	47			
a. $R^2 = 0,905$ (Düzeltilmiş $R^2 = 0,806$)					

Tablo 4.18 incelendiğinde su miktarının %20 olması %0 ve %10 olmasına göre istatistiksel olarak %95 güven aralığında anlamlı bir fark yaratmaktadır. Ultrason banyosu kullanıldığında formik asit gibi asidik bir HBA (elektron alıcı) ile PS verimini artırmak için %20 su kullanmanın daha iyi sonuç verdiğini ifade edebiliriz.

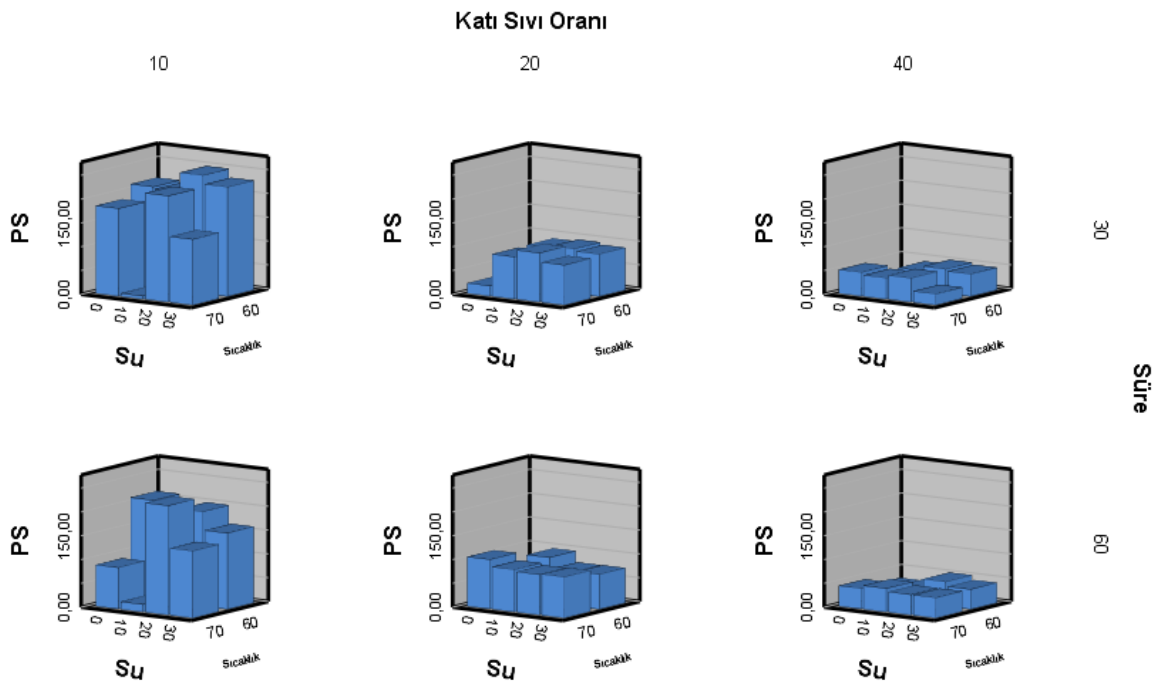
Tablo 4.18: Su Miktarının USB’da ChCl:FA ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	0	10	4,7167	12,5952	0,982
		20	-37,6083*	12,5952	0,031
		30	-13,05	12,5952	0,73
	10	0	-4,7167	12,5952	0,982
		20	-42,3250*	12,5952	0,013
		30	-17,7667	12,5952	0,506
	20	0	37,6083*	12,5952	0,031
		10	42,3250*	12,5952	0,013
		30	24,5583	12,5952	0,236
	30	0	13,05	12,5952	0,73
		10	17,7667	12,5952	0,506
		20	-24,5583	12,5952	0,236
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 951,834.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					

ChCl:FA kullanılarak USB’da yapılan ekstraksiyonda PS miktarına katı-sıvı oranının etkisi yapılan Tukey testi ile ortaya konulmuştur (Tablo 4.19). Anlamlılık düzeyleri incelendiğinde %95 güven aralığında bütün değerlerin 0,05’den küçük çıkmıştır. Katı-sıvı oranları kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmıştır. Tablo 4.19 incelendiğinde %10’luk katı-sıvı oranının %20-40 göre daha verimli sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu durum kolin klorür bazlı etilen glikol DÖÇ çözeltisi ile benzerlik göstermektedir.

Tablo 4.19: Katı-Sıvı oranının USB’da ChCl:FA ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	90,9812*	10,9078	0
		40	125,9562*	10,9078	0
	20	10	-90,9812*	10,9078	0
		40	34,9750*	10,9078	0,011
	40	10	-125,9562*	10,9078	0
		20	-34,9750*	10,9078	0,011
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 951,834.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					



Şekil 4.5: USB’de ChCl:FA ile elde edilen PS değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi.

Şekil 4.5 incelendiğinde ekstraksiyon süresinin PS miktarı üzerinde etkili olmadığı görülmektedir. Sıcaklığın ise %10 Katı Sıvı Oranında 60°C 'de diğer oranlarda 70°C 'de PS değerlerini etkilemektedir.

4.3.1.6 Karaçam Budaklarından ChCl:Üre kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Kolin klorür:üre çözeltilisine ait varyans analizi Tablo 4.20'de verilmiştir. %95 güven aralığında anlamlılık düzeyinde su miktarının 0,05'den küçük çıktığı, istatistiksel olarak PS miktarı üzerinde anlamlı bir fark yarattığı söylenebilir. Anlamlılık düzeyleri 0,05'den büyük çıkan katı- sıvı oranı, süre, sıcaklık, su miktarı- katı sıvı oranı, su miktarı- süre, su miktarı- sıcaklık, katı sıvı oranı- süre, katı sıvı oranı- sıcaklık ve süre- sıcaklık değişkenleri PS değeri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamıştır

Tablo 4.20: ChCl:Üre kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PS ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	163,784 ^a	19	8,62	1,96	0,09
Kesişim	39574,47	1	39574,47	8996,19	0
Su Miktarı	60,276	2	30,138	6,851	0,007
Katı Sıvı Oranı	1,684	2	0,842	0,191	0,828
Süre	0,694	1	0,694	0,158	0,696
Sıcaklık	0,16	1	0,16	0,036	0,851
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	45,639	4	11,41	2,594	0,076
Su Miktarı * Süre	23,176	2	11,588	2,634	0,103
Su Miktarı * Sıcaklık	22,86	2	11,43	2,598	0,105
Katı Sıvı Oranı * Süre	3,124	2	1,562	0,355	0,707
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	3,922	2	1,961	0,446	0,648
Süre * Sıcaklık	2,25	1	2,25	0,511	0,485
Hata	70,384	16	4,399		
Toplam	39808,64	36			
Düzeltilmiş Toplam	234,169	35			
a. $R^2 = 0,699$ (Düzeltilmiş $R^2 = 0,343$)					

Tablo 4.21 incelendiğinde su miktarının p değeri 0,05’den küçük çıkmıştır. Su miktarının %20 olmasının su miktarının %10 olması üzerinde anlamlı düzeyde farklılık belirttiğini söyleyebiliriz.

Tablo 4.21: Su Miktarının USB’da ChCl:Üre ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	-3,1667*	0,85625	0,005
		30	-1,7	0,85625	0,148
	20	10	3,1667*	0,85625	0,005
		30	1,4667	0,85625	0,231
	30	10	1,7	0,85625	0,148
		20	-1,4667	0,85625	0,231
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 4,399.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					

Tablo 4.22 incelendiğinde, p değerlerinin 0,05’den yüksek çıktığı ve katı sıvı oranının kendi üzerinde anlamlı bir farklılık belirtmedi görülmektedir.

Tablo 4.22: Katı Sıvı Oranının USB’da ChCl:Üre ile elde edilen PS’ye ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	-0,075	0,85625	0,996
		40	-0,4917	0,85625	0,836
	20	10	0,075	0,85625	0,996
		40	-0,4167	0,85625	0,879
	40	10	0,4917	0,85625	0,836
		20	0,4167	0,85625	0,879
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 4,399.					

4.3.2 Karaçam Budaklarından Farklı DÖÇ'lerle Elde Edilen PSMME Bulguları

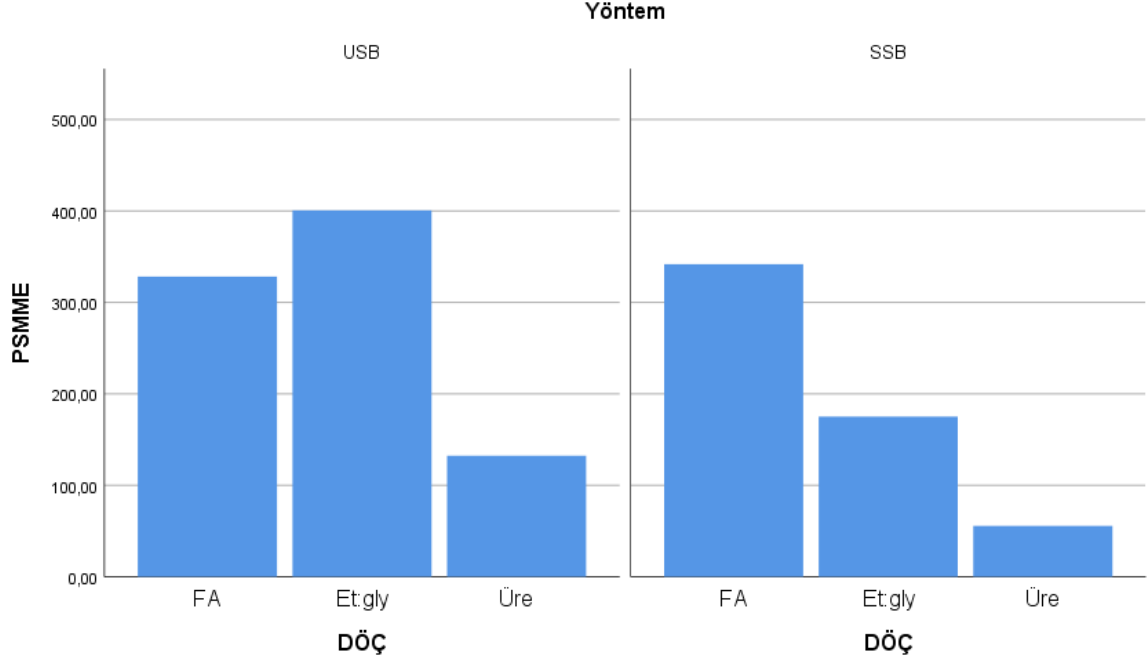
Kolin klorür bazlı formik asit, etilen glikol ve üre kullanılarak yapılan ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen ortalama PSMME değerleri ve standart sapmaları Tablo 4.23 ve Tablo 4.24'de verilmiştir. Tablo değerlerinde bazı standart sapma değerlerinin yüksek çıkması farklı büyüklüklerde budakların karıştırılarak hammadde olarak kullanılmasından ve bazı budak örneklerine sınır normal odun örneklerinden kaynaklandığı kanaatindeyiz.

Tablo 4.23: Sıcak su banyosunda Karaçam budaklarından elde edilen PSMME değerleri (ppm)

DÖÇ	Su Miktarı (%)	Katı:Sıvı Oranı(mg/mL)	Sıcaklık (°C)			
			60 °C		70 °C	
			Süre (dak.)			
			30	60	30	60
ChCl:FA	0	10	532,4±1,9	238,1±211,8	488,0±37,9	315,4±28,8
		20	382,0±22,5	402,6±58,6	370,8±18,3	343,9±19,9
		40	299,9±16,7	301,4±12,6	246,4±23,9	274,8±4,2
	10	10	543,7±36,8	536,2±29,9	541,9±37,2	486,3±1,8
		20	364,0±4,6	416,6±3,5	342,0±38,8	409,3±25,6
		40	277,5±24,9	255,5±10,8	208,1±7,3	86,8±16,5
	20	10	493,5±4,6	526,3±3,5	492,3±38,8	487,7±25,6
		20	393,6±11,4	414,4±31,2	416,3±32,2	432,4±23,6
		40	76,4±7,57	41,9±4,9	59,6±8,7	57,8±10
	30	10	473,6±13,5	496,8±7	506,9±0,1	489,5±8,8
		20	246,3±11,5	281,4±6,9	200,8±13,7	216,9±4,5
		40	77,7±6,1	371±9,1	263,5±7,6	227,6±11,8
ChCl:Et-glc	0	10	248,2±52	229,4±18	282,8±18	309,6±11
		20	89,1±21	92,7±13	103,6±12	103,6±17
		40	81,8±4,6	88,3±7,8	83,8±11	81,8±15
	10	10	116±0,7	84,1±2,1	404±12	435±14
		20	71,7±8,5	62,4±1,1	283±38,5	270,5±16,4
		40	58,9±10	84,8±0,8	54,7±7,5	80,6±1,1
	20	10	408,2±18	382,2±23	425±25	428,4±25
		20	152,2±1,3	252±20	143,5±8,3	162±4,8
		40	66,9±10	46,8±7,8	65,7±9,9	46,2±7,2
	30	10	433,8±20	0	362,9±15	398,7±18
		20	335,5±33	65,2±8,1	67,2±6,2	211,6±6,6
		40	37,4±1,9	36,5±9,3	37,6±2,6	44±7,3
ChCl:Üre	10	10	51,2±0,1	51,4±0,3	51,1±0,4	52,2±1,4
		20	70,3±13,2	71,4±8,0	72±0,5	71,9±14,3
	20	10	53,4±0,3	53,7±0,0	58,7±0,0	58,5±0,5
		20	54,6±0,0	71,0±0,1	65,8±0,8	41,3±3,0
	30	10	56,78±3,2	63,50±12,3	52,73±3,7	61,80±0,1
		20	38,7±0,3	35,7±0,4	35,1±0,4	42,5±0,9

Tablo 4.24: Ultrason banyosunda Karaçam budaklarından elde edilen PSMME değerleri
(ppm)

DÖÇ	Su Miktarı (%)	Katı:Sıvı Oranı(mg/mL)	Sıcaklık (°C)			
			60°C		70°C	
			Süre (dak.)			
			30	60	30	60
ChCl:FA	0	10	271±0,5	271±0,3	159±0,9	273±26
		20	112,8±14	155,3±1,1	133,5±8,4	388±0,3
		40	107,5±1,4	188,4±9,4	214,7±1,2	189±2,7
	10	10	486,4±19	473,6±4,3	3,4±2,5	7,5±4,1
		20	365,3±4,2	364,1±0,3	357,3±1,2	397,7±3,9
		40	304,5±17	251,9±1,8	324,9±7,6	346,6±3,9
	20	10	527,5±7,7	459,9±1,1	487±9,7	524,2±8,5
		20	393,2±4,7	355,5±1,7	401,5±8,5	405,2±3,4
		40	323,3±3,9	339,2±2,9	338,8±1,1	323,9±4,6
	30	10	489,4±4,3	428,4±6,5	393±5,5	411,9±9,9
		20	430,9±5,7	433,4±11	443,6±7,8	449,2±3,8
		40	322,2±6,6	353,8±29	280,5±2,5	295±13,2
ChCl:Et-glc	0	10	541,1±19,6	551,7±12,9	539,1±6,9	545,6±6,1
		20	364,1±6,4	436,3±16,4	456,5±8,8	404±35,8
		40	326,7±2,8	339,2±16,7	312±13,1	330±18,2
	10	10	622,8±13	612,6±7	605,9±19	648,6±7,8
		20	121,3±1,7	109,8±2,3	409,9±5,6	421,2±8,3
		40	243±16,6	281,5±5,34	222±10	271±10,9
	20	10	442±15	409,5±6,9	606,4±6,6	636±12,6
		20	406,1±3,3	392±20,9	401,3±4	403,2±14,5
		40	281,6±15,6	278,7±10,5	280,7±9,3	286,3±6,9
	30	10	508,9±5,2	437±12,7	479±19,4	489,1±17,6
		20	421,4±13,1	405,9±15	409,9±2,1	398,2±13,2
		40	296,4±5,4	279,7±10,5	256,3±3,2	304,8±1,7
ChCl:Üre	10	10	125±0	121,8±0,1	120,9±0,9	141,9±0
		20	125,3±3,7	123,6±1,6	125,2±2,0	123,0±0,1
		40	133,4±3,6	116,9±0,9	116,4±1,1	131,5±1,8
	20	10	138,1±2,0	141,4±1,0	141,2±0,3	135,6±0,6
		20	124,9±4,0	135,1±15,4	150,5±24,9	165,0±6,2
		40	130,6±2,3	132,0±0,5	132,1±0,9	130,6±0,9
	30	10	122,2±0,2	122,9±0,2	121,9±1,3	124,8±0,6
		20	173,4±1,7	150,8±7,1	124,3±0,8	128,9±1,4
		40	133,0±0,7	136,1±1,1	135,2±1,3	130,5±6,0



Şekil 4.6: Karaçam budaklarından elde edilen PSMME değerlerinin ortalamaları

Şekil 4.6’da SPSS paket programında kullandığımız PSMME değerlerinin ortalamaları grafik üzerinde gösterilmiştir. Grafığe göre USB’de en verimli DÖÇ seçiminin Et:gly olduğu görülmekte iken SSB’de ise en iyi DÖÇ seçiminin FA olduğu görülmektedir.

4.3.2.1 Karaçam Budaklarından ChCl:Et-gly kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Tablo 4.25 değerlendirildiğinde anlamlılık düzeyleri Katı Sıvı Oranı,sıcaklık, Su Miktarı-Sıcaklık ve Katı Sıvı Oranı-Sıcaklık gibi bağımsız değişkenlerin p-değerleri 0.05’den küçük bulunmuştur. Bu durum PSMME üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 4.25: ChCl:Et-glc kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	770967,190 ^a	24	32123,633	5,213	0
Kesişim	1473467,04	1	1473467,04	239,108	0
Su Miktarı	28038,087	3	9346,029	1,517	0,237
Katı Sıvı Oranı	498874,219	2	249437,109	40,478	0
Süre	3624,425	1	3624,425	0,588	0,451
Sıcaklık	38629,727	1	38629,727	6,269	0,02
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	52322,805	6	8720,467	1,415	0,251
Su Miktarı * Süre	19124,891	3	6374,964	1,035	0,396
Su Miktarı * Sıcaklık	58681,582	3	19560,527	3,174	0,043
Katı Sıvı Oranı * Süre	7134,37	2	3567,185	0,579	0,568
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	46382,454	2	23191,227	3,763	0,039
Süre * Sıcaklık	18154,63	1	18154,63	2,946	0,1
Hata	141734,118	23	6162,353		
Toplam	2386168,35	48			
Düzeltilmiş Toplam	912701,308	47			
a. $R^2 = 0,845$ (Düzeltilmiş $R^2 = 0,683$)					

Tablo 4.26 ve Tablo 4.27’de PSMME maddesi için sıcak su banyosunda ChCl:Et-glc kullanılarak yapılan ekstraksiyon için su miktarı ve katı-sıvı oranı çoklu karşılaştırmaları verilmiştir. Anlamlılık düzeylerini göre su miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı katı-sıvı oranlarının ise kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu görülmektedir.

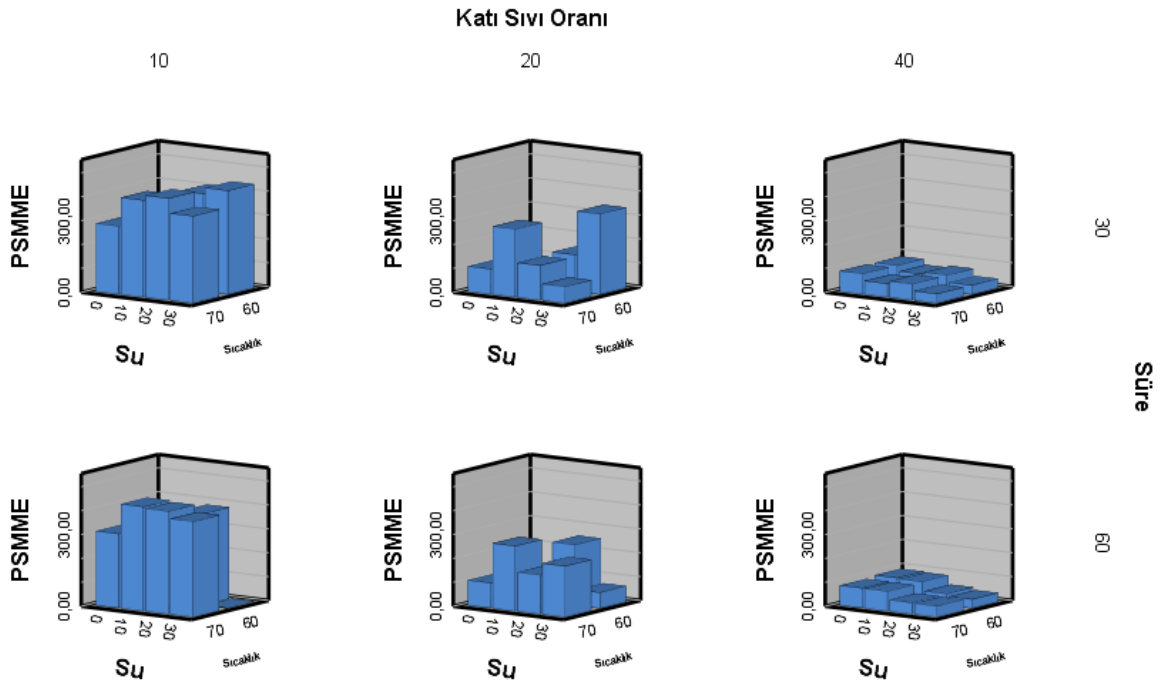
Tablo 4.26: Su Miktarının SSB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME’ye ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	0	10	-17,5833	32,04776	0,946
		20	-65,3667	32,04776	0,203
		30	-19,6417	32,04776	0,927
	10	0	17,5833	32,04776	0,946
		20	-47,7833	32,04776	0,459
		30	-2,0583	32,04776	1
	20	0	65,3667	32,04776	0,203
		10	47,7833	32,04776	0,459
		30	45,725	32,04776	0,496
	30	0	19,6417	32,04776	0,927
		10	2,0583	32,04776	1
		20	-45,725	32,04776	0,496
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 6162,353.					

Tablo 4.27’de görüldüğü gibi PSMME miktarının en yüksek olduğu koşul %10 katı-sıvı kullanımıdır. Bu durum PS miktarı içinde benzerlik göstermektedir. Sıcak su banyosunda ChCl:Et:glc ile muamele edildiğinde stilbenler için uygun katı-sıvı oranı 1:10 olarak ifade edilebilir.

Tablo 4.27: Katı-Sıvı oranının SSB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME’ye ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	155,1563*	27,75417	0
		40	247,0313*	27,75417	0
	20	10	-155,1562*	27,75417	0
		40	91,8750*	27,75417	0,008
	40	10	-247,0312*	27,75417	0
		20	-91,8750*	27,75417	0,008
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 6162,353.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					



Şekil 4.7: SSB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi

Şekil 4.7 incelendiğinde, ekstraksiyon süresinin PSMME üzerinde etkili olmadığı, sıcaklığın ise %10 Katı Sıvı Oranında 70° C ‘de diğer oranlarda 60° C ‘de PSMME değerlerini etkilediğini görülmektedir.

4.3.2.2 Karaçam Budaklarından ChCl:FA kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Çalışmada kullanılan diğer bir DÖÇ türü de kolin klorür:formik asit'tir. PSMME miktarına etkisi Tablo 4.28'de verilen varyans analiz ile ortaya konulmuştur. Katı Sıvı Oranı ve Su Miktarı-Katı Sıvı Oranının p-değerleri 0.05'den küçük bulunmuştur. Bu durum PSMME üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 4.28: ChCl:FA kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	926711,276 ^a	24	38612,97	10,803	0
Kesişim	5608117,69	1	5608117,69	1569,05	0
Su Miktarı	20765,034	3	6921,678	1,937	0,152
Katı Sıvı Oranı	641875,82	2	320937,91	89,793	0
Süre	719,201	1	719,201	0,201	0,658
Sıcaklık	4760,083	1	4760,083	1,332	0,26
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	205335,428	6	34222,571	9,575	0
Su Miktarı * Süre	24571,707	3	8190,569	2,292	0,105
Su Miktarı * Sıcaklık	5023,298	3	1674,433	0,468	0,707
Katı Sıvı Oranı * Süre	17938,752	2	8969,376	2,509	0,103
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	1877,032	2	938,516	0,263	0,771
Süre * Sıcaklık	3844,92	1	3844,92	1,076	0,31
Hata	82206,837	23	3574,21		
Toplam	6617035,8	48			
Düzeltilmiş Toplam	1008918,11	47			
a. $R^2 = 0,919$ (Düzeltilmiş $R^2 = 0,833$)					

Tablo 4.29 incelendiğinde Su Miktarının kendi içinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı yapılan Tukey testi ile ortaya konulmuştur.

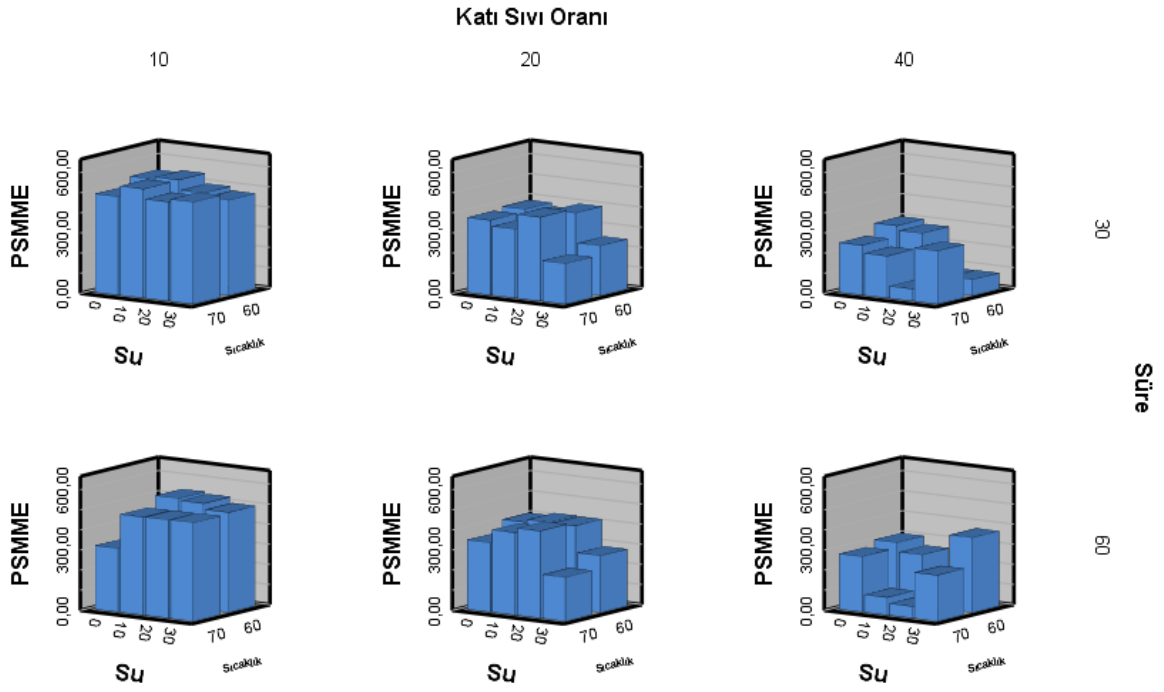
Tablo 4.29: Su Miktarının SSB’da ChCl:FA ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	0	10	-22,7083	24,407	0,789
		20	25,2583	24,407	0,731
		30	28,6333	24,407	0,649
	10	0	22,7083	24,407	0,789
		20	47,9667	24,407	0,23
		30	51,3417	24,407	0,182
	20	0	-25,2583	24,407	0,731
		10	-47,9667	24,407	0,23
		30	3,375	24,407	0,999
	30	0	-28,6333	24,407	0,649
		10	-51,3417	24,407	0,182
		20	-3,375	24,407	0,999
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 3574,210.					

Tablo 4.30 incelendiğinde, tüm p değerlerinin 0,05’den küçük olduğu görülmektedir. Bu durum Katı Sıvı oranlarının kendi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yarattığını göstermektedir. %10’luk katı-sıvı oranının %20-40 göre PSMME miktarında daha verimli sonuçlar verdiği görülmektedir.

Tablo 4.30: Katı-Sıvı oranının SSB’da ChCl:FA ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	125,9750*	21,1371	0
		40	282,7000*	21,1371	0
	20	10	-125,9750*	21,1371	0
		40	156,7250*	21,1371	0
	40	10	-282,7000*	21,1371	0
		20	-156,7250*	21,1371	0
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 3574,210.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					



Şekil 4.8: SSB’de ChCl:FA ile elde edilen PSMME değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi

Şekil 4.8 incelendiğinde ekstraksiyon süresinin ve sıcaklığın ortalama değerlerinin birbirine yakınlığından kaynaklı PSMME üzerinde etkili olmadığı yorumlanabilmektedir.

4.3.2.3 Karaçam Budaklarından ChCl:Üre kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Kolin klorür:üre çözeltilisine ait varyans analizi Tablo 4.31’de verilmiştir. %95 güven aralığında anlamlılık düzeylerinin su miktarı ve su miktarı- katı sıvı oranı 0,05’den küçük çıktığından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmaktadır. P-değeri 0,05’den büyük çıkan Katı Sıvı Oranı, Süre, Sıcaklık, Su Miktarı- Süre, Su Miktarı- Sıcaklık, Katı Sıvı Oranı- Süre, Katı Sıvı Oranı- Sıcaklık ve Süre- Sıcaklık PSMME değeri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamıştır.

Tablo 4.31: ChCl:Üre kullanılarak SSB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	2506,986 ^a	14	179,07	3,104	0,046
Kesişim	74293,867	1	74293,867	1287,615	0
Su Miktarı	711,537	2	355,768	6,166	0,021
Katı Sıvı Oranı	1,166	1	1,166	0,02	0,89
Süre	8,748	1	8,748	0,152	0,706
Sıcaklık	2,7	1	2,7	0,047	0,834
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	1658,852	2	829,426	14,375	0,002
Su Miktarı * Süre	50,867	2	25,434	0,441	0,657
Su Miktarı * Sıcaklık	7,984	2	3,992	0,069	0,934
Katı Sıvı Oranı * Süre	16,484	1	16,484	0,286	0,606
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	13,726	1	13,726	0,238	0,637
Süre * Sıcaklık	34,921	1	34,921	0,605	0,457
Hata	519,289	9	57,699		
Toplam	77320,141	24			
Düzeltilmiş Toplam	3026,275	23			
a. R ² = 0,828 (Düzeltilmiş R ² = 0,561)					

Tablo 4.32 incelendiğinde %10 Su Miktarının %30 Su Miktarına istatistiksel olarak anlamlı bir fark yarattığını söyleyebiliriz. ChCl:Üre karışımında % 10 su ilavesi PSMME miktarını artırmaktadır.

Tablo 4.32: Su Miktarının SSB’da ChCl:Üre ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	4,3125	3,79799	0,518
		30	13,0863*	3,79799	0,018
	20	10	-4,3125	3,79799	0,518
		30	8,7738	3,79799	0,105
	30	10	-13,0862*	3,79799	0,018
		20	-8,7737	3,79799	0,105
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 57,699.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					

4.3.2.4 Karaçam Budaklarından ChCl:Et-glc kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Tablo 4.33 değerlendirildiğinde anlamlılık düzeyleri Katı Sıvı Oranı, Sıcaklık ve Su Miktarı-Katı Sıvı Oranı, gibi bağımsız değişkenlerin p-değerleri 0.05’den küçük bulunmuştur. Bu durum PSMME üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 4.33: ChCl:Et-glc kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME miktarına ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	718969,883 ^a	24	29957,078	8,658	0
Kesişim	7701054,41	1	7701054,41	2225,748	0
Su Miktarı	15521,744	3	5173,915	1,495	0,242
Katı Sıvı Oranı	540365,922	2	270182,961	78,088	0
Süre	287,63	1	287,63	0,083	0,776
Sıcaklık	21155,402	1	21155,402	6,114	0,021
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	100202,132	6	16700,355	4,827	0,003
Su Miktarı * Süre	1571,281	3	523,76	0,151	0,928
Su Miktarı * Sıcaklık	21296,546	3	7098,849	2,052	0,135
Katı Sıvı Oranı * Süre	1204,887	2	602,443	0,174	0,841
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	16526,835	2	8263,418	2,388	0,114
Süre * Sıcaklık	837,505	1	837,505	0,242	0,627
Hata	79579,657	23	3459,985		
Toplam	8499603,95	48			
Düzeltilmiş Toplam	798549,54	47			
a. $R^2 = 0,900$ (Düzeltilmiş $R^2 = 0,796$)					

Tablo 4.34 incelendiğinde Su Miktarı değerlerinin kendi içinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülmektedir.

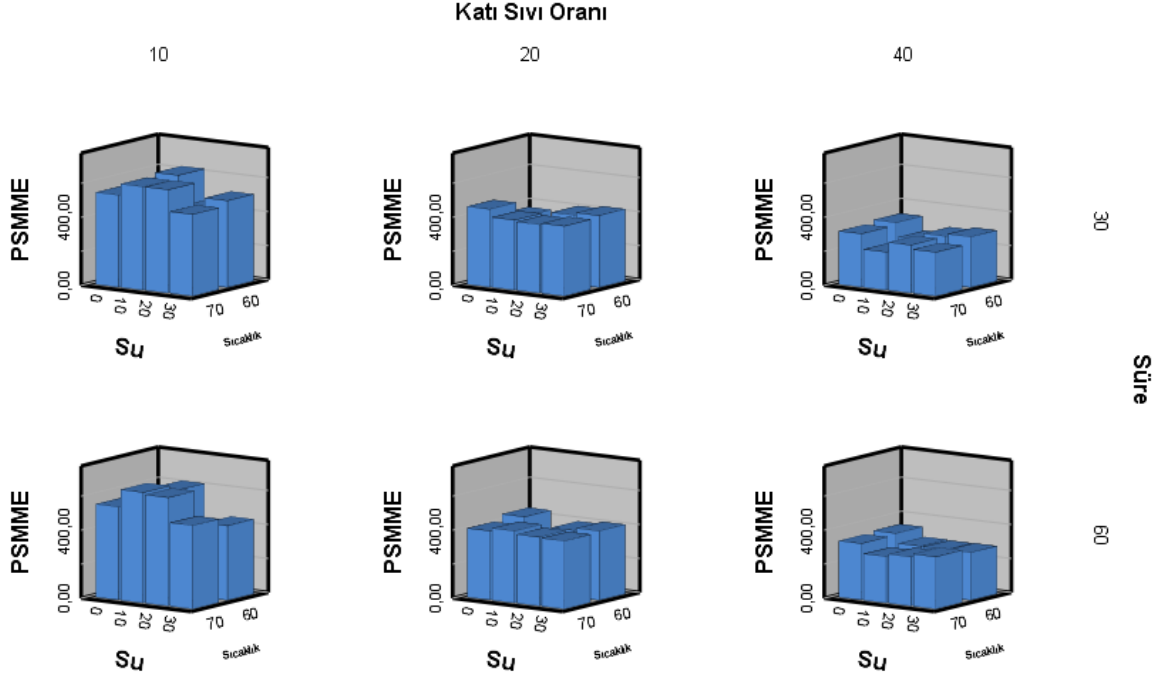
Tablo 4.34: Su miktarının USB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	0	10	48,0583	24,01383	0,217
		20	26,875	24,01383	0,682
		30	38,3083	24,01383	0,401
	10	0	-48,0583	24,01383	0,217
		20	-21,1833	24,01383	0,814
		30	-9,75	24,01383	0,977
	20	0	-26,875	24,01383	0,682
		10	21,1833	24,01383	0,814
		30	11,4333	24,01383	0,964
	30	0	-38,3083	24,01383	0,401
		10	9,75	24,01383	0,977
		20	-11,4333	24,01383	0,964
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 3459,985.					

Tablo 4.35’te USB’da kolin klorür ve etilen glükol ile yapılan ekstraksiyonda katı-sıvı oranının PSMME miktarına etkisi %95 güven aralığında yapılan Tukey testi ile anlamlı farklılıklar göstermiştir. %10 katı sıvı oranının ultrason banyosunda ChCl:Et:glc için en iyi olduğu görülmüştür. Bu durum SSB’da yapılan ekstraksiyonla benzerlik göstermektedir.

Tablo 4.35: Katı-Sıvı oranının USB’da ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME’ye ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	169,6375*	20,79659	0
		40	255,3375*	20,79659	0
	20	10	-169,6375*	20,79659	0
		40	85,7000*	20,79659	0,001
	40	10	-255,3375*	20,79659	0
		20	-85,7000*	20,79659	0,001
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 3459,985.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					



Şekil 4.9: USB’de ChCl:Et:glc ile elde edilen PSMME değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi

Şekil 4.9 incelendiğinde USB’de kolin klorürü ve etilen glikol ile yapılan deneylerde ekstraksiyon süresinin PSMME miktarı üzerinde istatistiksel olarak etkili olmadığı, ekstraksiyon süresinin ise genel olarak 70 °C’de PSMME değerlerini etkilediğini görülmektedir.

4.3.2.5 Karaçam Budaklarından ChCl:FA kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Ultrason banyosunda kolin klorür: Formik asit DÖÇ çözeltisi ile yapılan deneylerde budaklardaki PSMME miktarına etkisi Tablo 4.36’da verilen varyans analiz ile ortaya konulmuştur. Su Miktarı, Katı Sıvı Oranı ve Katı Sıvı Oranı-Sıcaklık gibi bağımsız değişkenlerin p-değerleri 0.05’den küçük bulunmuştur. Bu durum PSMME üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu ifade etmektedir.

Tablo 4.36: ChCl:FA kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	627097,693 ^a	24	26129,071	4,383	0
Kesişim	5172497,87	1	5172497,87	867,653	0
Su Miktarı	312927,867	3	104309,289	17,497	0
Katı Sıvı Oranı	52666,029	2	26333,014	4,417	0,024
Süre	3579,38	1	3579,38	0,6	0,446
Sıcaklık	9077,75	1	9077,75	1,523	0,23
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	88554,99	6	14759,165	2,476	0,054
Su Miktarı * Süre	14879,667	3	4959,889	0,832	0,49
Su Miktarı * Sıcaklık	54049,251	3	18016,417	3,022	0,05
Katı Sıvı Oranı * Süre	2824,363	2	1412,181	0,237	0,791
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	82608,765	2	41304,383	6,929	0,004
Süre * Sıcaklık	5929,63	1	5929,63	0,995	0,329
Hata	137114,051	23	5961,48		
Toplam	5936709,61	48			
Düzeltilmiş Toplam	764211,743	47			
a. R ² = 0,821 (Düzeltilmiş R ² = 0,633)					

Tablo 4.37 incelendiğinde su miktarının %20 olması %0 ve %10 olmasına göre istatistiksel olarak %95 güven aralığında anlamlı bir fark yaratmaktadır. Ultrason banyosu kullanıldığında formik asit gibi asidik bir HBA (elektron alıcı) ile PSMME verimini artırmak için %20 su kullanmanın daha iyi sonuç verdiğini ifade edebiliriz.

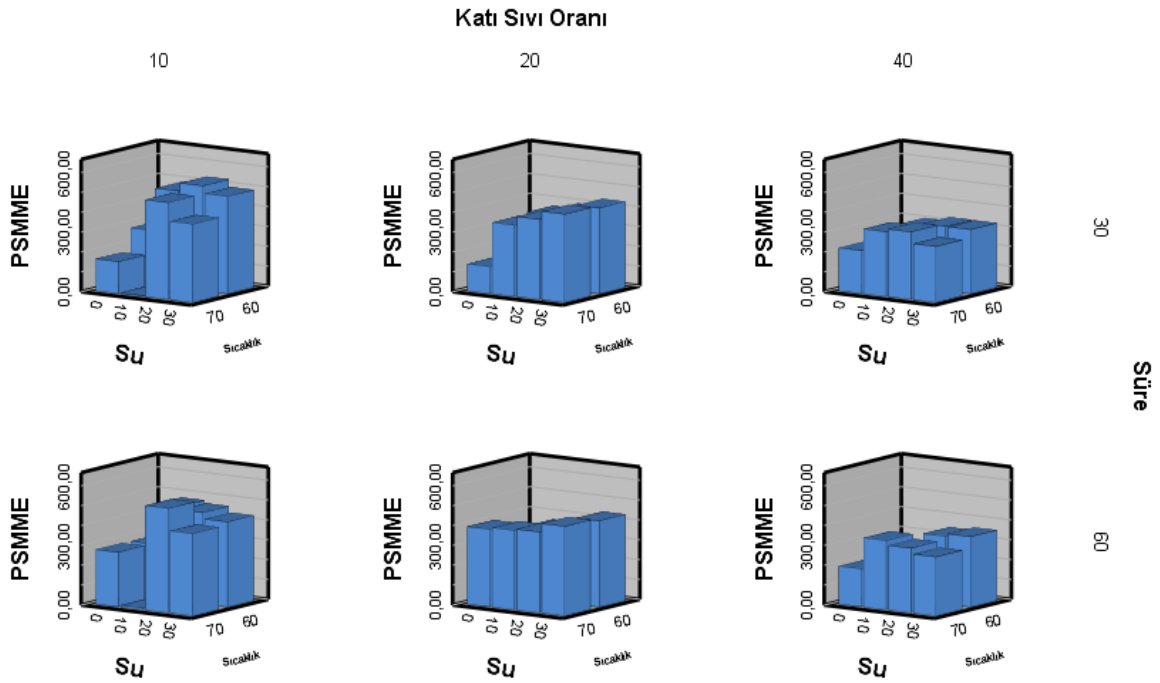
Tablo 4.37: Su Miktarının USB’da ChCl:FA ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	0	10	-101,6667*	31,52111	0,018
		20	-201,3333*	31,52111	0
		30	-189,0083*	31,52111	0
	10	0	101,6667*	31,52111	0,018
		20	-99,6667*	31,52111	0,021
		30	-87,3417*	31,52111	0,05
	20	0	201,3333*	31,52111	0
		10	99,6667*	31,52111	0,021
		30	12,325	31,52111	0,979
	30	0	189,0083*	31,52111	0
		10	87,3417*	31,52111	0,05
		20	-12,325	31,52111	0,979
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 5961,480.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					

ChCl:FA kullanılarak USB’da yapılan ekstraksiyonda PSMME miktarına katı-sıvı oranının etkisi yapılan Tukey testi ile ortaya konulmuştur (Tablo 4.38). %10’luk katı-sıvı oranının %40 göre daha verimli sonuçlar verdiği görülmektedir.

Tablo 4.38: Katı-Sıvı oranının USB’da ChCl:FA ile elde edilen PSMME’e ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I- J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	4,9812	27,2981	0,982
		40	72,6250*	27,2981	0,036
	20	10	-4,9812	27,2981	0,982
		40	67,6438	27,2981	0,053
	40	10	-72,6250*	27,2981	0,036
		20	-67,6438	27,2981	0,053
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 5961,480.					
*. Ortalama fark ,05 düzeyinde anlamlıdır.					



Şekil 4.10: USB’de ChCl:FA ile elde edilen PSMME değerine katı-sıvı oranı ve sürenin etkisi

Şekil 4.10 incelendiğinde ekstraksiyon süresinin ve sıcaklığın ortalama değerlerinin birbirine yakınlığından kaynaklı PSMME miktarı üzerinde etkili olmadığı yorumlanabilmektedir.

4.3.2.6 Karaçam Budaklarından CHCl_3 Üre kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Faktöriyel Varyans Analizi Testi Sonuçları

Çalışmada kullanılan 3. DÖÇ Kolin klorür:üre çözeltisine ait varyans analizi Tablo 4.39’da verilmiştir. %95 güven aralığında anlamlılık düzeyinde su miktarının 0,05’den küçük çıktığı, istatistiksel olarak PSMME miktarı üzerinde anlamlı bir fark yarattığı söylenebilir. Anlamlılık düzeyleri 0,05’den büyük çıkan katı- sıvı oranı, süre, sıcaklık, su miktarı- katı sıvı oranı, su miktarı- süre, su miktarı- sıcaklık, katı sıvı oranı- süre, katı sıvı oranı- sıcaklık ve süre- sıcaklık değişkenleri PS değeri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmamıştır.



Tablo 4.39: CHCl_3 Üre kullanılarak USB ekstraksiyonu ile elde edilen PSMME ait Varyans Analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Düzeltilmiş Model	3217,334 ^a	19	169,333	1,299	0,301
Kesişim	630965,44	1	630965,44	4840,963	0
Su Miktarı	994,591	2	497,295	3,815	0,044
Katı Sıvı Oranı	470,237	2	235,119	1,804	0,197
Süre	9,818	1	9,818	0,075	0,787
Sıcaklık	1,361	1	1,361	0,01	0,92
Su Miktarı * Katı Sıvı Oranı	790,448	4	197,612	1,516	0,245
Su Miktarı * Süre	65,977	2	32,989	0,253	0,779
Su Miktarı * Sıcaklık	687,361	2	343,68	2,637	0,102
Katı Sıvı Oranı * Süre	22,037	2	11,019	0,085	0,919
Katı Sıvı Oranı * Sıcaklık	41,717	2	20,859	0,16	0,853
Süre * Sıcaklık	133,788	1	133,788	1,026	0,326
Hata	2085,421	16	130,339		
Toplam	636268,2	36			
Düzeltilmiş Toplam	5302,756	35			
a. $R^2 = 0,607$ (Düzeltilmiş $R^2 = 0,140$)					

Tablo 4.40 incelendiğinde su miktarının p değeri 0,05'den küçük çıkmıştır. Su miktarının %20 olmasının su miktarının %10 olması üzerinde anlamlı düzeyde bir farklılık yaratmamıştır.

Tablo 4.40: Su Miktarının USB'da CHCl_3 Üre ile elde edilen PSMME'e ait Tukey testi

	(I) Su Miktarı	(J) Su Miktarı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	-12,6833*	4,66081	0,038
		30	-8,2583	4,66081	0,21
	20	10	12,6833*	4,66081	0,038
		30	4,425	4,66081	0,618
	30	10	8,2583	4,66081	0,21
		20	-4,425	4,66081	0,618
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 130,339.					
*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır.					

Tablo 4.41 incelendiğinde, p değerlerinin 0,05'den yüksek çıktığı ve katı sıvı oranının kendi içinde anlamlı bir farklılık belirtmedi görülmektedir.

Tablo 4.41: Katı Sıvı Oranının USB'da CHCl_3 Üre ile elde edilen PSMME'e ait Tukey testi

	(I) Katı Sıvı Oranı	(J) Katı Sıvı Oranı	Ortalama Farkları (I-J)	Standart Hata	p
Tukey Testi	10	20	-7,6917	4,66081	0,254
		40	-0,05	4,66081	1
	20	10	7,6917	4,66081	0,254
		40	7,6417	4,66081	0,258
	40	10	0,05	4,66081	1
		20	-7,6417	4,66081	0,258
Gözlemlenen ortalamalara göre yapıldı.					
Hata terimi Ortalama Kare'dir = 130,339.					

4.4 Optimizasyon Yöntemiyle Sonuçların Değerlendirilmesi

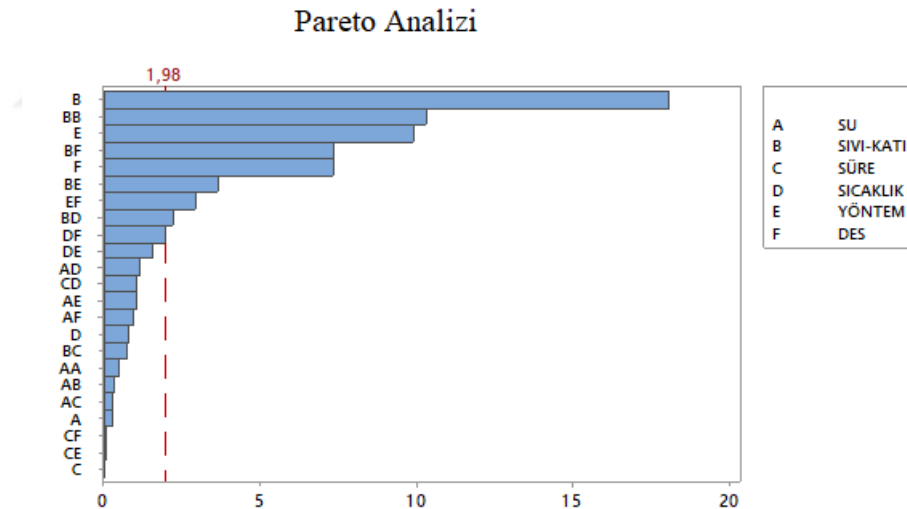
Deney tasarımını kendimiz oluşturduğumuzda Box-Behnken üç seviyeli kullanılmasına karşın kendi deney tasarımımızı modifiye ederek karışık seviyelerde Box-Behnken uygulaması yapılmıştır.

4.4.1 Parametrelerin DeneySEL Tasarım Sonuçlarının Değerlendirilmesi

4.4.1.1 PS İÇİN SONUÇLAR

Model Bileşenlerinin Parametreler Üzerine Etkileri ve İstatistiksel Değerlendirme

Pareto diyagramları bir problemi oluşturan sebeplerin ne olduklarını ve önem derecelerini belirlemek için kullanılmaktadır. Pareto analizine (Şekil 4.11) göre PS'ye en çok katı-sıvı oranı etki etmiştir.



Şekil 4.11: Pareto Analizi

Tablo 4.42: Verilerin varyans analizi

Kaynak	Serbestlik Derecesi	Standart Sapma	Düzenlenmiş Ortalamalar	F	p
Model	29	498528	17191	32,97	0,000
Lineer	7	263123	37589	72,08	0,000
SU	1	48	48	0,09	0,763
SIVI-KATI	1	170510	170510	326,97	0,000
SÜRE	1	1	1	0,00	0,962
SICAKLIK	1	324	324	0,62	0,432
YÖNTEM	1	51095	51095	97,98	0,000
DÖÇ	2	41222	20611	39,52	0,000
Kare	2	59707	29854	57,25	0,000
SU*SU	1	130	130	0,25	0,618
SIVI-KATI*SIVI-KATI	1	55337	55337	106,12	0,000
2-Yönlü Etkileşimler	20	86425	4321	8,29	0,000
SU*SIVI-KATI	1	59	59	0,11	0,737
SU*SÜRE	1	49	49	0,09	0,760
SU*SICAKLIK	1	694	694	1,33	0,251
SU*YÖNTEM	1	568	568	1,09	0,299
SU*DÖÇ	2	1094	547	1,05	0,353
SIVI-KATI*SÜRE	1	280	280	0,54	0,465
SIVI-KATI*SICAKLIK	1	2622	2622	5,03	0,027
SIVI-KATI*YÖNTEM	1	7023	7023	13,47	0,000
SIVI-KATI*DÖÇ	2	63392	31696	60,78	0,000
SÜRE*SICAKLIK	1	583	583	1,12	0,292
SÜRE*YÖNTEM	1	2	2	0,00	0,954
SÜRE*DÖÇ	2	53	27	0,05	0,950
SICAKLIK*YÖNTEM	1	1249	1249	2,40	0,124
SICAKLIK*DÖÇ	2	3138	1569	3,01	0,053
YÖNTEM*DÖÇ	2	6068	3034	5,82	0,004
Hata	132	68835	521		
Uyum Eksikliği	91	68696	755	223,42	0,000
Saf Hata	41	139	3		
Toplam	161	567363			

Box-Behnken tasarımı ile PS değişkeni için oluşturulan modele ilişkin varyans analizi sonuçları tablo 4.42’de verilmiştir. Tabloya genel olarak bakıldığında %95 ($p < 0.05$) anlam

düzeyinde modelin geçerli olduğu görülmektedir. Varyans analizi sonuçlarına göre modele ilişkin katı-sıvı oranı, DÖÇ ve kullanılan yöntem değişkeninin lineer etkileri ile kendi aralarındaki ikili etkileşimleri ve katı-sıvı oranının kareli etkilerinin PS üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olduğu görülmektedir.

Tablo 4.43: PS değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin regresyon katsayılarına ilişkin sonuçlar

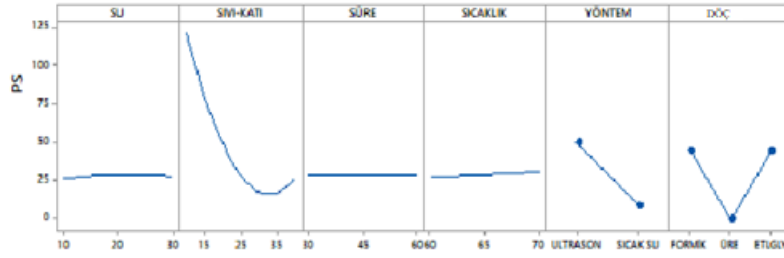
Terim	Ortalama	Düzenlenmiş Ortalama	T	p
Sabit Terim	28,42	3,74	7,61	0,000
SU	0,86	2,84	0,30	0,763
SIVI-KATI	-48,45	2,68	-18,08	0,000
SÜRE	-0,11	2,24	-0,05	0,962
SICAKLIK	1,76	2,24	0,79	0,432
YÖNTEM				
ULTRASON	20,51	2,07	9,90	0,000
DÖÇ				
FORMİK	14,76	3,65	4,05	0,000
ÜRE	-29,51	3,32	-8,89	0,000
SU*SU	-1,88	3,76	-0,50	0,618
SIVI-KATI*SIVI-KATI	44,84	4,35	10,30	0,000
SU*SIVI-KATI	1,48	4,42	0,34	0,737
SU*SÜRE	1,01	3,29	0,31	0,760
SU*SICAKLIK	-3,80	3,29	-1,15	0,251
SU*YÖNTEM				
ULTRASON	2,98	2,85	1,04	0,299
SU*DÖÇ				
FORMİK	-6,64	4,94	-1,35	0,181
ÜRE	0,17	3,77	0,05	0,964
SIVI-KATI*SÜRE	-2,33	3,18	-0,73	0,465
SIVI-KATI*SICAKLIK	-7,12	3,18	-2,24	0,027
SIVI-KATI*YÖNTEM				
ULTRASON	-10,09	2,75	-3,67	0,000
SIVI-KATI*DÖÇ				
FORMİK	-26,38	4,77	-5,53	0,000
ÜRE	40,06	3,65	10,96	0,000
SÜRE*SICAKLIK	2,62	2,47	1,06	0,292
SÜRE*YÖNTEM				
ULTRASON	0,13	2,21	0,06	0,954
SÜRE*DÖÇ				
FORMİK	1,12	3,50	0,32	0,750
ÜRE	-0,46	3,02	-0,15	0,880
SICAKLIK*YÖNTEM				
ULTRASON	3,42	2,21	1,55	0,124
SICAKLIK*DÖÇ				
FORMİK	-5,73	3,50	-1,64	0,104
ÜRE	-2,74	3,02	-0,91	0,367
YÖNTEM*DÖÇ				
ULTRASON FORMİK	1,93	3,31	0,58	0,562
ULTRASON ÜRE	-10,03	3,14	-3,19	0,002
R ² =87,87				

Tablo 4.43’de Box-Behnken tasarımı ile PS değişkeni için oluşturulan modele ilişkin performans ölçütleri verilmiştir. Tablo incelendiğinde Su, Katı-Sıvı, Süre, Sıcaklık, Yöntem, Ultrason, DÖÇ değişkenleri için kurulan modellere ilişkin elde edilen determinasyon katsayısının (R^2) PS üzerinde 87,87’lik bir açıklayıcılığa sahip olduğunu görülmektedir. Yani bağımsız değişkenler ile bağımlı değişken arasında yaklaşık %94’ük bir korelasyon söz konusudur. PS değişkeni için oluşturulan modellere ilişkin regresyon katsayılarına bakıldığında ise sıvı-katı kullanımının lineer ve kareli etkileri, ultrason yöntemi, formik asit ve üre kullanımı ile bunların sıvı-katı oranlarının ikili kullanımı ve son olarak ultrason-üre kullanımlarının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir. Tabloda 4.44’de kurulan modellere ilişkin regresyon denklemleri verilmiştir.

Tablo 4.44: Kullanılan formüller

YÖNTEM	DÖÇ		
ULTRASON	FORMİK	PS	$= 182 + 4,86 \text{ SU} - 9,19 \text{ SIVI-KATI} - 2,07 \text{ SÜRE} + 2,21 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0188 \text{ SU} * \text{SU} + 0,1993 \text{ SIVI-KATI} * \text{SIVI-KATI} + 0,0099 \text{ SU} * \text{SIVI-KATI}$ $+ 0,0067 \text{ SU} * \text{SÜRE} - 0,0760 \text{ SU} * \text{SICAKLIK} - 0,0103 \text{ SIVI-KATI} * \text{SÜRE}$ $- 0,0949 \text{ SIVI-KATI} * \text{SICAKLIK} + 0,0349 \text{ SÜRE} * \text{SICAKLIK}$
SICAK SU	FORMİK	PS	$= 205 + 4,27 \text{ SU} - 7,84 \text{ SIVI-KATI} - 2,08 \text{ SÜRE} + 0,85 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0188 \text{ SU} * \text{SU} + 0,1993 \text{ SIVI-KATI} * \text{SIVI-KATI} + 0,0099 \text{ SU} * \text{SIVI-KATI}$ $+ 0,0067 \text{ SU} * \text{SÜRE} - 0,0760 \text{ SU} * \text{SICAKLIK} - 0,0103 \text{ SIVI-KATI} * \text{SÜRE}$ $- 0,0949 \text{ SIVI-KATI} * \text{SICAKLIK} + 0,0349 \text{ SÜRE} * \text{SICAKLIK}$
ULTRASON	ÜRE	PS	$= -33 + 5,54 \text{ SU} - 4,76 \text{ SIVI-KATI} - 2,17 \text{ SÜRE} + 2,81 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0188 \text{ SU} * \text{SU} + 0,1993 \text{ SIVI-KATI} * \text{SIVI-KATI} + 0,0099 \text{ SU} * \text{SIVI-KATI}$ $+ 0,0067 \text{ SU} * \text{SÜRE} - 0,0760 \text{ SU} * \text{SICAKLIK} - 0,0103 \text{ SIVI-KATI} * \text{SÜRE}$ $- 0,0949 \text{ SIVI-KATI} * \text{SICAKLIK} + 0,0349 \text{ SÜRE} * \text{SICAKLIK}$
SICAK SU	ÜRE	PS	$= 14 + 4,95 \text{ SU} - 3,41 \text{ SIVI-KATI} - 2,19 \text{ SÜRE} + 1,45 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0188 \text{ SU} * \text{SU} + 0,1993 \text{ SIVI-KATI} * \text{SIVI-KATI} + 0,0099 \text{ SU} * \text{SIVI-KATI}$ $+ 0,0067 \text{ SU} * \text{SÜRE} - 0,0760 \text{ SU} * \text{SICAKLIK} - 0,0103 \text{ SIVI-KATI} * \text{SÜRE}$ $- 0,0949 \text{ SIVI-KATI} * \text{SICAKLIK} + 0,0349 \text{ SÜRE} * \text{SICAKLIK}$
ULTRASON	ETL-GLY	PS	$= -39 + 6,17 \text{ SU} - 8,34 \text{ SIVI-KATI} - 2,19 \text{ SÜRE} + 5,05 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0188 \text{ SU} * \text{SU} + 0,1993 \text{ SIVI-KATI} * \text{SIVI-KATI} + 0,0099 \text{ SU} * \text{SIVI-KATI}$ $+ 0,0067 \text{ SU} * \text{SÜRE} - 0,0760 \text{ SU} * \text{SICAKLIK} - 0,0103 \text{ SIVI-KATI} * \text{SÜRE}$ $- 0,0949 \text{ SIVI-KATI} * \text{SICAKLIK} + 0,0349 \text{ SÜRE} * \text{SICAKLIK}$
SICAK SU	ETL-GLY	PS	$= -28 + 5,58 \text{ SU} - 7,00 \text{ SIVI-KATI} - 2,20 \text{ SÜRE} + 3,69 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0188 \text{ SU} * \text{SU} + 0,1993 \text{ SIVI-KATI} * \text{SIVI-KATI} + 0,0099 \text{ SU} * \text{SIVI-KATI}$ $+ 0,0067 \text{ SU} * \text{SÜRE} - 0,0760 \text{ SU} * \text{SICAKLIK} - 0,0103 \text{ SIVI-KATI} * \text{SÜRE}$ $- 0,0949 \text{ SIVI-KATI} * \text{SICAKLIK} + 0,0349 \text{ SÜRE} * \text{SICAKLIK}$

PS'ye etki eden faktörlerin grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.12).

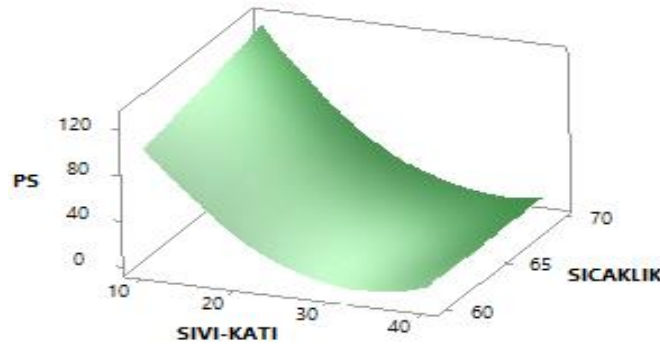


Şekil 4.12: PS'ye etki eden faktörler

Tablo 4.45'te verilerden çıkarılan optimum koşullar elde edilmektedir.

Tablo 4.45: PS'nin en verimli olduğu değerler

Değişken	Ayarlama
SU	30
SIVI-KATI	10
SÜRE	60
SICAKLIK	70
YÖNTEM	ULTRASON
DÖÇ	ETLGLY



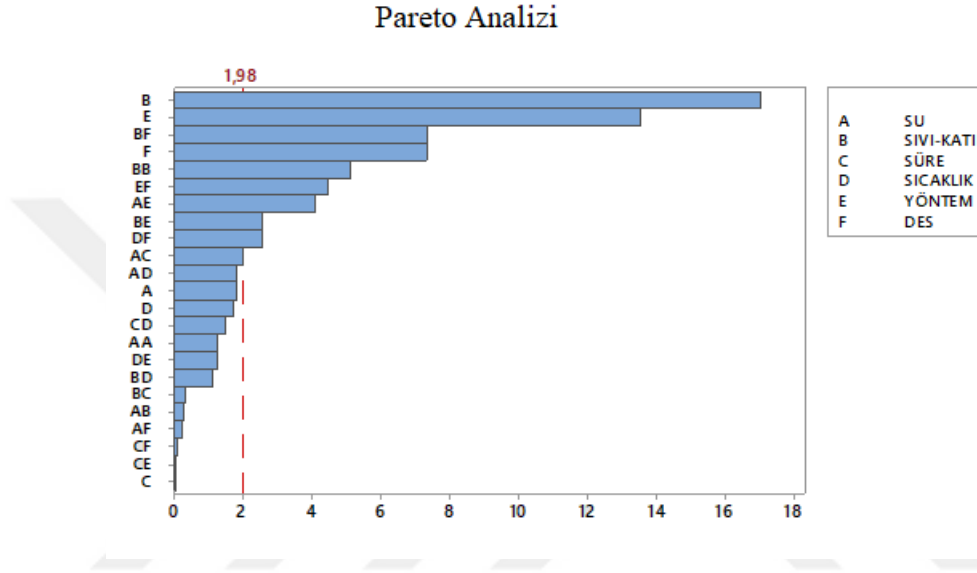
Şekil 4.13: PS değişkeni, sıvı-katı ve sıcaklık değişkenlerine ait üç boyutlu grafik

Şekil 4.13'te PS değişkeni, sıvı-katı ve sıcaklık değişkenlerine ait üç boyutlu grafik gösterilmektedir. Buna göre PS değeri ile sıcaklık arasında anlamlı bir ilişki görülmemektedir. 60° C'den 70° C'ye geçişte önemli bir fark görülmemektedir. Sıvı-katı ile PS değişkeni arasında aynı yönlü ilişki bulunmaktadır. Katı-Sıvı oranı arttıkça PS değeri düşmektedir.

4.4.1.2 PSMME İÇİN SONUÇLAR

Model bileşenlerinin parametreler üzerine etkileri ve istatistiksel değerlendirme

Pareto diyagramları bir problemi oluşturan sebeplerin ne olduklarını ve önem derecelerini belirlemek için kullanılmaktadır. Pareto analizine (Şekil 4.14) göre PSMME'ye en çok Katı-Sıvı Oranı etki etmiştir.



Şekil 4.14: Pareto Analizi

Bu çalışmada su, sıvı-katı, süre, sıcaklık, yöntem ve DÖÇ değişkenlerinin PSMME üzerindeki etkileri Box-Behnken deneysel tasarım tekniği ile incelenmiştir.

Tablo 4.46: PSMME değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin varyans analizi sonuçları

Kaynak	Sd	Düz. SS	Düz. MS	F-İstatistiği	p
Model	29	3427669	118195	54,77	0
Lineer	7	1927765	275395	127,61	0
SU	1	7261	7261	3,36	0,069
SIVI-KATI	1	626362	626362	290,24	0
SÜRE	1	3	3	0	0,97
SICAKLIK	1	6331	6331	2,93	0,089
YÖNTEM	1	394684	394684	182,89	0
DÖÇ	2	794248	397124	184,02	0
Kareli	2	71139	35569	16,48	0
SU*SU	1	3606	3606	1,67	0,198
SIVI-KATI*SIVI-KATI	1	57440	57440	26,62	0
2 Yönlü Etkileşimler	20	481756	24088	11,16	0
SU*SIVI-KATI	1	188	188	0,09	0,769
SU*SÜRE	1	8796	8796	4,08	0,046
SU*SICAKLIK	1	7283	7283	3,37	0,068
SU*YÖNTEM	1	36505	36505	16,92	0
SU* DÖÇ	2	927	464	0,21	0,807
SIVI-KATI*SÜRE	1	253	253	0,12	0,733
SIVI-KATI*SICAKLIK	1	2682	2682	1,24	0,267
SIVI-KATI*YÖNTEM	1	14170	14170	6,57	0,012
SIVI-KATI* DÖÇ	2	270650	135325	62,71	0
SÜRE*SICAKLIK	1	4855	4855	2,25	0,136
SÜRE*YÖNTEM	1	8	8	0	0,953
SÜRE* DÖÇ	2	392	196	0,09	0,913
SICAKLIK*YÖNTEM	1	3467	3467	1,61	0,207
SICAKLIK* DÖÇ	2	19575	9788	4,54	0,012
YÖNTEM* DÖÇ	2	51760	25880	11,99	0
Hata	132	284869	2158		
Uyum Eksikliği	91	283692	3117	108,62	0
Saf Hata	41	1177	29		
Toplam	161	3712538			

R²: % 92.33 Sd:serbestlik derecesi, Düz. SS:düzeltilmiş Standart Sapma Toplamı, Düz. MS:düzeltilmiş Standart Sapma Ortalaması, F-istatistiği:F testi sonucunda elde edilen test istatistiği, p:testin anlamlılık değeri

Tablo 4.46’da PSMME değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin varyans analizi sonuçları gösterilmektedir. Varyans analizi sonuçlarına göre bu modele ilişkin katı-sıvı, yöntem, D, su-süre, su-yöntem, sıvı katı-yöntem, sıvı katı-D istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

PSMME değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin performans ölçüleri gösterilmektedir. Bu modelin belirtme katsayısına göre, oluşturulan cevap yüzey modeli su, sıvı katı, süre, sıcaklık, yöntem ve D değişkenlerinin tarafından PSMME değişkenini %92,33 oranında açıklamaktadır. Bu oran PSMME değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modelinin orta düzeyde açıklayıcılık gücüne sahip olduğunu göstermektedir.



Tablo 4.47: PSMME değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin regresyon

Katsayıları sonuçları				
Terim	Ortalama	Düzenlenmiş Ortalama	T	p
Sabit Terim	200,72	7,6	26,41	0
SU	-10,59	5,77	-1,83	0,069
SIVI-KATI	-92,87	5,45	-17,04	0
SÜRE	-0,17	4,55	-0,04	0,97
SICAKLIK	7,79	4,55	1,71	0,089
YÖNTEM				
ULTRASON	57	4,21	13,52	0
DÖÇ				
FORMİK	99,61	7,42	13,43	0
ÜRE	-123,9	6,75	-18,35	0
SU*SU	-9,87	7,64	-1,29	0,198
SIVI-KATI*SIVI-KATI	45,68	8,85	5,16	0
SU*SIVI-KATI	-2,65	8,98	-0,29	0,769
SU*SÜRE	13,53	6,7	2,02	0,046
SU*SICAKLIK	-12,31	6,7	-1,84	0,068
SU*YÖNTEM				
ULTRASON	23,88	5,81	4,11	0
SU* DÖÇ				
FORMİK	-2,7	10	-0,27	0,785
ÜRE	5,03	7,68	0,66	0,513
SIVI-KATI*SÜRE	2,21	6,46	0,34	0,733
SIVI-KATI*SICAKLIK	-7,2	6,46	-1,11	0,267
SIVI-KATI*YÖNTEM				
ULTRASON	14,34	5,6	2,56	0,012
SIVI-KATI* DÖÇ				
FORMİK	-36,69	9,71	-3,78	0
ÜRE	83,01	7,43	11,17	0
SÜRE*SICAKLIK	7,55	5,03	1,5	0,136
SÜRE*YÖNTEM				
ULTRASON	-0,27	4,49	-0,06	0,953
SÜRE* DÖÇ				
FORMİK	3,02	7,12	0,42	0,672
ÜRE	-0,99	6,14	-0,16	0,872
SICAKLIK*YÖNTEM				
ULTRASON	5,69	4,49	1,27	0,207
SICAKLIK* DÖÇ				
FORMİK	-10,5	7,12	-1,48	0,142
ÜRE	-10,41	6,14	-1,69	0,093
YÖNTEM* DÖÇ				
ULTRASON FORMİK	-13,99	6,74	-2,08	0,04
ULTRASON ÜRE	-17,69	6,39	-2,77	0,006

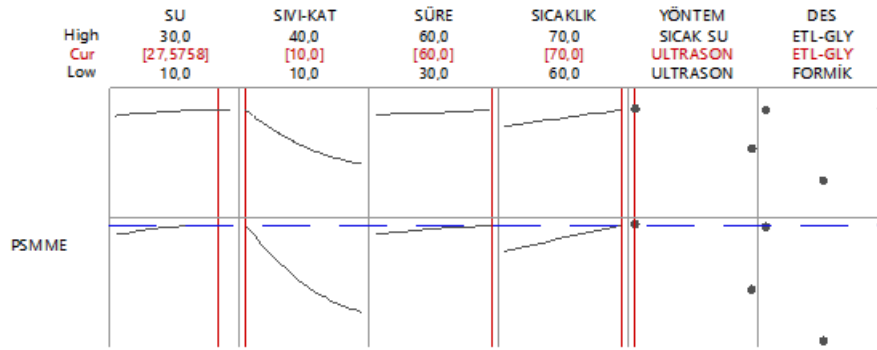
Tablo 4.47’de PSMME değişkeni için oluşturulan cevap yüzey modeline ilişkin regresyon katsayıları sonuçları gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre bağımsız değişkenlere ait su, süre, sıcaklık, su-su, su-sıvı katı, su-sıcaklık, su-DÖÇ, sıvı katı-süre, sıvı katı-sıcaklık, süre-sıcaklık, süre-yöntem, süre-DÖÇ ve sıcaklık-DÖÇ istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0.05$).

R^2 (determinasyon katsayısı) %92,33’dir. Oldukça yüksek R^2 değeri bağımsız değişkenlerinin (süre, sıcaklık, yöntem, ultrason vs.), bağımlı değişken (PSMME) üzerindeki açıklayıcılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Tabloda 4.48’de kurulan modellere ilişkin regresyon denklemleri verilmiştir.

Tablo 4.48: Kullanılan formüller

YÖNTEM	DES		
ULTRASON	FORMİK	PSMME	$= 457 + 17,39 \text{ SU} - 11,68 \text{ SIVI-KATI} - 8,42 \text{ SÜRE} + 3,39 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0987 \text{ SU*SU} + 0,2030 \text{ SIVI-KATI*SIVI-KATI} - 0,0177 \text{ SU*SIVI-KATI}$ $+ 0,0902 \text{ SU*SÜRE} - 0,246 \text{ SU*SICAKLIK} + 0,0098 \text{ SIVI-KATI*SÜRE}$ $- 0,0960 \text{ SIVI-KATI*SICAKLIK} + 0,1006 \text{ SÜRE*SICAKLIK}$
SICAK SU	FORMİK	PSMME	$= 660 + 12,61 \text{ SU} - 13,59 \text{ SIVI-KATI} - 8,38 \text{ SÜRE} + 1,12 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0987 \text{ SU*SU} + 0,2030 \text{ SIVI-KATI*SIVI-KATI} - 0,0177 \text{ SU*SIVI-KATI}$ $+ 0,0902 \text{ SU*SÜRE} - 0,246 \text{ SU*SICAKLIK} + 0,0098 \text{ SIVI-KATI*SÜRE}$ $- 0,0960 \text{ SIVI-KATI*SICAKLIK} + 0,1006 \text{ SÜRE*SICAKLIK}$
ULTRASON	ÜRE	PSMME	$= 25 + 18,17 \text{ SU} - 3,70 \text{ SIVI-KATI} - 8,68 \text{ SÜRE} + 3,41 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0987 \text{ SU*SU} + 0,2030 \text{ SIVI-KATI*SIVI-KATI} - 0,0177 \text{ SU*SIVI-KATI}$ $+ 0,0902 \text{ SU*SÜRE} - 0,246 \text{ SU*SICAKLIK} + 0,0098 \text{ SIVI-KATI*SÜRE}$ $- 0,0960 \text{ SIVI-KATI*SICAKLIK} + 0,1006 \text{ SÜRE*SICAKLIK}$
SICAK SU	ÜRE	PSMME	$= 236 + 13,39 \text{ SU} - 5,61 \text{ SIVI-KATI} - 8,65 \text{ SÜRE} + 1,14 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0987 \text{ SU*SU} + 0,2030 \text{ SIVI-KATI*SIVI-KATI} - 0,0177 \text{ SU*SIVI-KATI}$ $+ 0,0902 \text{ SU*SÜRE} - 0,246 \text{ SU*SICAKLIK} + 0,0098 \text{ SIVI-KATI*SÜRE}$ $- 0,0960 \text{ SIVI-KATI*SICAKLIK} + 0,1006 \text{ SÜRE*SICAKLIK}$
ULTRASON	ETL-GLY	PSMME	$= 49 + 17,44 \text{ SU} - 12,32 \text{ SIVI-KATI} - 8,75 \text{ SÜRE} + 9,68 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0987 \text{ SU*SU} + 0,2030 \text{ SIVI-KATI*SIVI-KATI} - 0,0177 \text{ SU*SIVI-KATI}$ $+ 0,0902 \text{ SU*SÜRE} - 0,246 \text{ SU*SICAKLIK} + 0,0098 \text{ SIVI-KATI*SÜRE}$ $- 0,0960 \text{ SIVI-KATI*SICAKLIK} + 0,1006 \text{ SÜRE*SICAKLIK}$
SICAK SU	ETL-GLY	PSMME	$= 161 + 12,7 \text{ SU} - 14,24 \text{ SIVI-KATI} - 8,72 \text{ SÜRE} + 7,40 \text{ SICAKLIK}$ $- 0,0987 \text{ SU*SU} + 0,2030 \text{ SIVI-KATI*SIVI-KATI} - 0,0177 \text{ SU*SIVI-KATI}$ $+ 0,0902 \text{ SU*SÜRE} - 0,246 \text{ SU*SICAKLIK} + 0,0098 \text{ SIVI-KATI*SÜRE}$ $- 0,0960 \text{ SIVI-KATI*SICAKLIK} + 0,1006 \text{ SÜRE*SICAKLIK}$

Şekil 4.15’de PSMME’ye etki eden faktörlerin grafikleri elde edilmiştir. Grafikte optimum koşulların hangileri olması gerektiği görülmektedir.

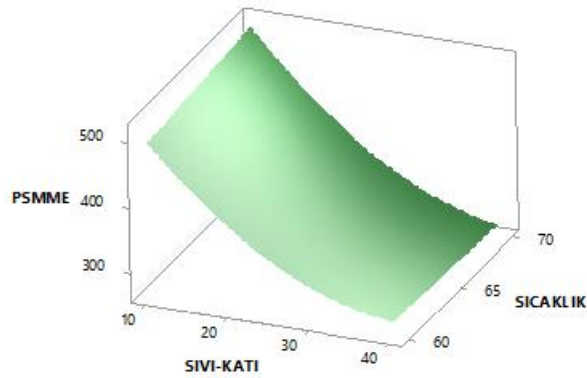


Şekil 4.15: PSMME’ye etki eden faktörler

Tablo 4.49’da verilerden çıkarılan optimum koşullar elde edilmektedir.

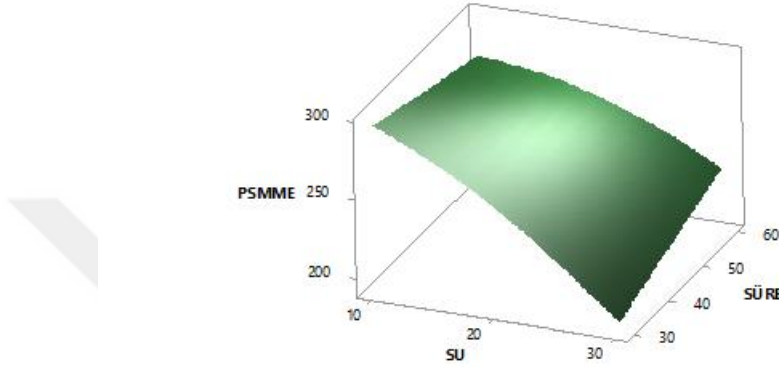
Tablo 4.49: PSMME’nin en verimli olduğu değerler

Değişken	Ayarlama
SU	27,5758
SIVI-KATI	10
SÜRE	60
SICAKLIK	70
YÖNTEM	ULTRASON
DES	ETL-GLY



Şekil 4.16: PSMME değişkeni, sıvı katı ve sıcaklık değişkenlerine ait üç boyutlu grafik

Şekil 4.16’da PSMME değişkeni, sıvı katı ve sıcaklık değişkenlerine ait üç boyutlu grafik gösterilmektedir. Buna göre PSMME değeri ile sıcaklık arasında anlamlı bir ilişki görülmemektedir. 60° C’den 70° C’ye geçişte önemli bir fark görülmemektedir. Sıvı-katı ile PSMME değişkeni arasında aynı yönlü ilişki bulunmaktadır. Sıvı-katı oranı arttıkça PSMME değeri düşmektedir.



Şekil 4.17: PSMME değişkeni, su ve süre değişkenlerine ait üç boyutlu grafik

Şekil 4.17’de PSMME değişkeni, su ve süre değişkenlerine ait üç boyutlu grafik gösterilmektedir. Süre ile doğru yönlü bir ilişki var süre arttıkça PSMME artmış.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Karaçam (*Pinus nigra*) gövde odununda bulunan budaklardaki stilbenlerin (pinoslyvine ve pinoslyvinemonometileter) nontoksit, ucuz ve hazırlanması kolay derin ötektik çözücüler (DÖÇ) kullanarak daha yüksek bir verimle elde edilebilirlikleri incelenmiştir. Ayrıca, gövde odunu ve budaklardaki odun ana bileşenleri de çalışma kapsamında ortaya konulmuştur.

Derin ötektik çözücüler (DÖÇ), karboksilik asitler ve diğer yenilenebilir bileşikler dahil olmak üzere en az bir hidrojen bağı alıcı (HBA) ve bir hidrojen bağı donörü (HBD) karışımlarıdır. Bu maddeler, toksisitesi düşük, doğal, organik maddelerden oluşan, çevreye dost, biyo-bozunurlukları yüksek, gerekli öncülleri ucuz, kolay ve bol miktarda bulunan, kokusuz, renksiz ve yenilenebilir çözücülerdir.

Odun ana bileşenlerine ait veriler incelendiğinde Karaçam gövde odunu ve budakları arasında belirgin bir fark olmadığı, birbirine yakın değerler verdiği görülmüştür. Karaçam budaklarında holoselüloz, α -selüloz ve lignin değerleri sırasıyla %75,6, %47,9 ve %25,8 olarak tespit edilmiştir. n-Hekzan ve aseton:su karışımı ile yapılan sıralı ekstraksiyon deneylerinde ise budaklardaki ekstraktif madde miktarı oduna kıyasla daha yüksek oranda bulunmuştur. Karaçam gövde odununda %3,5-6,5 olan ekstraktif miktarı budaklarda %14,3-25,7 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar GC-MS’de kalitatif olarak analiz edilmiş ve hedef madde olarak tespit edilen pinosilvin (PS) ve pinosilvinmonometileter (PSMME) mevcudiyetleri ortaya konulmuştur. DÖÇ çözeltilerine farklı oranlarda su ilave edilmesi ve GC-MS öncesi sililasyonlarında yaşanan sorunlar nedeniyle analizler HPLC’de yapılmıştır.

Sokslet cihazında n-hekzan ve aseton:su (95:5 v/v) ile yapılan ekstraksiyon sonrasında HPLC’e injekte edilen örneklerde PS miktarı sırasıyla sıfır ve 46,25 ppm olarak tespit edilirken, PSMME değerleri 195,0 ppm ve 75,3 ppm olmuştur.

DÖÇ deneylerinde 1 gram budak örneği kullanılarak, iki farklı muamele sıcaklığı (60°C – 70°C), iki farklı muamele süresi (30 – 60 dk), üç farklı sıvı-katı oranı (10–20–40 g/ml), üç farklı su miktarı (10 – 20 – 30 %) ve kolin klorür bazlı üç farklı DÖÇ çözeltisi (ChCl:

formik asit, ChCl: Üre, ChCl: Et-gly) uygulanmıştır. Ekstraksiyon işlemleri ultrason ve sıcak-su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler Box-Behnken tasarımı üzerinden revize edilerek değerlendirilmiş ve PS ve PSMME için optimum koşullar belirlenmiştir.

Karaçam budaklarında bulunan stilbenlerin (PS ve PSMME) DÖÇ'lerle geri kazanılmasında sırası ile katı-sıvı oranı > ekstraksiyon yöntemi > DÖÇ türü > ekstraksiyon süresi gibi faktörlerin etkili olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada, 1 g örneğe 10 ml, 20 ml ve 40 ml olmak üzere üç farklı katı:sıvı oranı denenmiştir. Çözücü ve çözünen arasında bir denge bulunmaktadır ve bu noktaya geldiğinde biyokütle ve çözücü arasındaki etkileşim artmaktadır (Gülsoy ve Kılıç Pekgözlü, 2021). DÖÇ'lerle budaktaki PS ve PSMME ekstraksiyonu için ideal katı sıvı oranı 10 mL/g. 1 g örnek için 10 mL DÖÇ çözeltisi kullanımı yeterlidir. Katı:sıvı oranı önemli bir işletme parametresidir. Özellikle maliyetler açısından etkilidir (Baranse, Ö., 2018). Az miktarda biyokütle ve az miktarda çözücü kullanılması işletme maliyetlerini düşürecektir.

İkinci önemli parameter, ekstraksiyon yöntemi olmuştur. Çalışmada sıcaksu banyosu ve ultrason banyosu yöntemleri klasik sokslet ekstraksiyonuna alternatif olarak kullanılmıştır. DÖÇ'lerle fenolik maddelerin eldesinde literatürde genellikle ultrason banyosu, mikrodalga ve sıcak su banyosu gibi yöntemler kullanılmıştır Ultrason yöntemi en basit ekstraksiyon yöntemidir çünkü tek ihtiyacı olan genel bir laboratuvar aleti olan ultrason banyosudur. Kavitasyon işlemine dayalı bir teknik olup, ekstrakte edilebilir maddelerin çözücüye geçişini artırmaktadır (Wang ve ark.2020, Ming-Zhu ve ark.2020, Panzella ve ark.2020).

Ekstraksiyonlarda uygulanan DÖÇ türü stilben verimini etkileyen diğer bir faktör olmuştur. Bu çalışmada kolin klörür bazlı üç farklı DÖÇ kullanılmıştır (ChCl:FA, ChCl:Et-gly ve ChCl:Üre). DÖÇ'ler literatür bilgilerine dayanılarak 1:2 mol oranında hazırlanmıştır. Üre ile yapılan ekstraksiyonlarda ürenin vizkozitesinin düşük olması nedeniyle özellikle susuz örneklerde kristalleşmeler gözlemlenmiştir. Bu nedenle, susuz örnekler analiz edilmemiştir. Ayrıca sıcak su banyosunda ekstrakte edilen katı-sıvı oranı 40 mL/g olan örneklerde odun örnekleri sıvı içerisinde asılı kalmış HPLC öncesi yapılan

filtreleme işlemi yeterli gelmemiştir. Bu nedenle, HPLC kolonuna zarar vermemesi açısından enjekte edilmemiştir. Elde edilen veriler analiz edildiğinde, PS ve PSMME ekstraksiyonu için en uygun DÖÇ çözeltisi ChCl:Et-gly bulunmuştur.

Ekstraksiyon süresi diğer bir deyişle muamele süresi DÖÇ verimini etkileyen bir başka faktördür. Biyokütle ve çözücü arasında oluşan denge belli bir süre durmakta ve daha fazla çözünme olmamaktadır. Farklı biyokütlelerde farklı süreler kullanılmaktadır (0,5 -24 Saat). Sürenin uzaması bazı bileşiklerin bozunmasına neden olurken enerji açısından da olumsuz bir etki göstermektedir. Bu çalışmada iki farklı muamele süreleri uygulanmıştır (30 dak. – 60 dak.).

Elde edilen sonuçlar optimizasyon yöntemi ile değerlendirildiğinde 30 dakikalık ekstraksiyon süresinin en iyi verimi verdiği sonucuna varılmıştır.

Tüm parametreler optimizasyon yöntemi ile bir arada değerlendirildiğinde, Karaçam budaklarından PS ve PSMME eldesi için en uygun koşulların Tablo 5.1’de belirtildiği şekilde olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 5.1: Sonuçların en verimli olduğu değerler

En İdeal DÖÇ	En İdeal Katı Sıvı oranı	En İdeal Su Miktarı	En İdeal Yöntem	En İdeal Sıcaklık	En İdeal Süre
ChCl:Et-gly	10 mg/ml	%30	Ultrason	70°C	30 dk.

Yukarıda belirtilen koşullarda elde edilen PS miktarı 229,8 ppm ve PSMME miktarı ise 489,1 ppm ‘dir. Bu oranları klasik sokslet ekstraksiyonu sonuçları ile karşılaştırdığımızda, PS değeri aseton:su karışımında 46,2 ppm bulunurken DÖÇ çözeltisinde yukarıdaki koşullarda 229,8 ppm çıkmıştır. PSMME ise 195 ppm’den 489 ppm çıkmıştır. Bu durumda verim PS için 5 kat PSMM için ise 2,5 kat artmıştır.

Zhu vd., (2020) yaptıkları çalışmada, dut yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için sürdürülebilir ve yeşil bir DES-MAE yöntemi uygulamışlardır. Elde edilen sonuçlarda, solvent, Kolin klorür/Gliserol, NCA, CA, CCA, CFA, RU, IS, AS'nin daha yüksek ekstraksiyon verimliliği tek faktörlü ve BBD testine göre, optimal koşullarda 1:2 molar

oranlı ve %20 su içerikli Kolin klorür/Gliserol, sıvı/katı oranı 20 mL/g, mikrodalga sıcaklığı 66 °C ve süre 18 dk. olarak kaydedilmiştir. Üstelik, DES-MAE'nin kütle aktarım kinetiği modelinin yüksek k ve C_{∞} değerlerine göre hızlı ve verimli bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Bu arada, makro gözenekli reçinenin, hedef bileşiklerin zenginleştirilmesi ve saflaştırılması için mevcut bir yöntem olduğu ve geri kazanılan DES'nin hala yüksek bir özütleme verimliliği sergilediği de kanıtlanmıştır. Bu nedenle, DES-MAE tekniği, bitki materyallerinden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için yeşil ve entegre bir strateji olmaktadır.

Genel olarak, elde edilen DÖÇ özütünün HPLC analizinden önce seyreltilmesi gerekir. Bu, DES bileşenlerinin numune viskozitesini ve konsantrasyonunu azaltacaktır. Metanol ve etanol gibi organik çözücüler ve su içeren DÖÇ, daha önceki çalışmalarda seyreltme çözücüsü için yaygın olarak kullanılmıştır (Bajkacz ve Adamek, 2017; Duan vd., 2016; Mansur vd., 2019). Bu çalışmada, DÖÇ özütü metanol, etanol ve DES ile seyreltildi. Sonuçlar, %30 su içeriğine sahip metanol ve DÖÇ'lerin seyreltme çözücülerini için uyumlu olduğunu göstermiştir. Yeşil kimya açısından, çözücü olarak %30 su içeriğine sahip seyreltilmiş DÖÇ kullanılmıştır.

Yaptığımız çalışmada benzer sonuçlar elde ederek en iyi çözünürlük değerlerinin %30 su içeriğine sahip DÖÇ örnekleri olduğu görülmektedir. (Tablo 5.1)

Organik çözücüler, stilbenlerin gıda ve farmakoloji gibi alanlarda koruyucu olarak kullanımının önünde engel teşkil eden maddelerdir. Bu noktadan hareketle çevre dostu, toksit olmayan DÖÇ çözücülerini Karaçam budaklarından PS ve PSMME eldesi için alternatif çözücüler olarak değerlendirilebilir.

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, B., 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(9): 9142-9147.
- Abbott, A. P., Capper, G., McKenzie, K. J. ve Ryder, K. S. (2007). Electrodeposition of zinc-tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 599(2): 288-294.
- Acatay, A. (1956). EHRAMI KARAÇAM (Pinus nigra var. pyramidata) . *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University*,
- Adlercreutz, H. (2007). Lignans and Human Health, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44(5-6): 483-525.
- Albuquerque R., Koskinen Y., Zhang C. 2019. Corporate social responsibility and firm risk: Theory and empirical evidence. *Management Science* 65:4451-69.
- Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., Holmbom, B. R., Pietarinen, S. P. ve Wilför, S. M. (2006). Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials, *The Japan Wood Research Society*, 52: 436-444.
- Anon (1987). *Annual Report for the division of Arable Crops Research 1985-86*, Department of Agricultural Research, Department of Agricultural Research, Ministry of Agriculture, Government of Botswana, Gaborone, Botswana.
- Aytuğ, B., Odun Anatomisi ve Odun Tanıtımı, İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi, 1979.
- Bachelar, F. W., Loman, A. A. ve Snowden, L. R. (1969). Synthesis of pinosylvin and related heartwood stilbenes, *Canadian Journal of Chemistry*, 48: 1554.
- Bajkacz, S., Adamek, J., 2017. Evaluation of new natural deep eutectic solvents for the extraction of isoflavones from soy products. *Talanta* 168, 329-335.
- Belt, T., Keplinger, T., Hänninen, T. ve Rautkari, L. (2017). Cellular level distributions of Scots pine heartwood and knot heartwood extractives revealed by Raman spectroscopy imaging. *Industrial Crops and Products*, 108: 327-335.
- Belt, T., Hänninen, T. ve Rautkari, L. (2017). Antioxidant activity of Scots pine heartwood and knot extractives and implications for resistance to brown rot. *Holzforschung*, 71(6): 527-534.
- Berkel, A. (1970). Ağaç Malzeme Teknolojisi, *İ.Ü. Orman Fakültesi*, İ.Ü. Yayın No. 144S, O.F. Yayın No. 147, İstanbul.

- Bindes, M. M. M., Reis, M. H. M., Cardoso, V. L. ve Boffito, D. C. (2018). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from green tea leaves and clarification with natural coagulants (chitosan and Moringa oleifera seeds), *Ultrasonics Sonochemistry*, 51: 111-119.
- Bozkurt, Y. (1979). Ağaç Teknolojisi, *İ.Ü. Orman Fakültesi Yayınları*, İ.Ü. Yayın No. 242S, O.F. Yayın No. 260, İstanbul.
- Bozkurt, Y., Göker, Y. (1987). Fiziksel ve Mekanik Ağaç Teknolojisi Ders Kitabı, *İ.Ü. Yayın No: 3445, O.F. Yayın No: 388.*
- BOZKURT, A.Y., ERDİN, N., 2000: Odun Anatomisi, İ.Ü.Orman Fakültesi, Rektörlük No. 4263, Fakülte No. 466, s. 167, İstanbul.
- Cowling, E. B., Scheffer T. C. (1966). Natural Resistance of Wood to Microbial Deterioration, *Annual Review of Phytopathology*, 4(1): 147-168.
- Chi, X., Xing, Y., Xiao Y., Dong, Q. ve Hu, F. (2014). Separation and purification of three stilbenes from the radix of *polygonum cillinerve* (nakai) ohwl by macroporous resin column chromatography combined with high-speed counter-current chromatography, *Quimica Nova*, 37(9): 1465 – 1468.
- De Angelis, M., Romagnoli, M., Vek, V., Poljanšek, I., Oven, P., Thaler, N., Humar, M. (2018). Chemical composition and resistance of Italian stone pine (*Pinus pinea* L.) wood against fungal decay and wetting. *Industrial Crops and Products*, 117: 187–196.
- Doğu, A. D., Yılğör, N. (2001). Kütahya bölgesi karaçam (*Pinus nigra* L.) varyetelerinde (*P.nigra* var. *pallasiana*-*P.nigra* var. *pyramidata*) anatomik yapıların karşılaştırmalı incelenmesi . *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University*, 51(2): 51-64.
- Duan, L., Dou, L.-L., Guo, L., Li, P., Liu, E.H., 2016. Comprehensive evaluation of deep eutectic solvents in extraction of bioactive natural products. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 2405–2411.
- Ergin, K., Yaylalı A. (2013). Resveratrol ve etkileri üzerine bir gözden geçirme, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 20(3): 115-120.
- Gao, M.-Z., Cui, Q., Wang, L.-T., Meng, Y., Yu, L., Li, Y.-Y., & Fu, Y.-J. (2020). A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds extraction from mulberry (*Morus alba* L.) leaves by deep eutectic solvent. *Microchemical Journal*, 154, 104598.
- Gelhaye, E., Morel-Rouhier, M., Perrot, T., Valette N. ve Sormani R. (2017). Antifungal activities of wood extractives, *Fungal Biology Reviews*, 31(3): 113-123.
- Hernandez-Corroto, E., Plaza, M., Marina, M. L. ve García, M. C. (2020). Sustainable extraction of proteins and bioactive substances from pomegranate peel (*Punica*

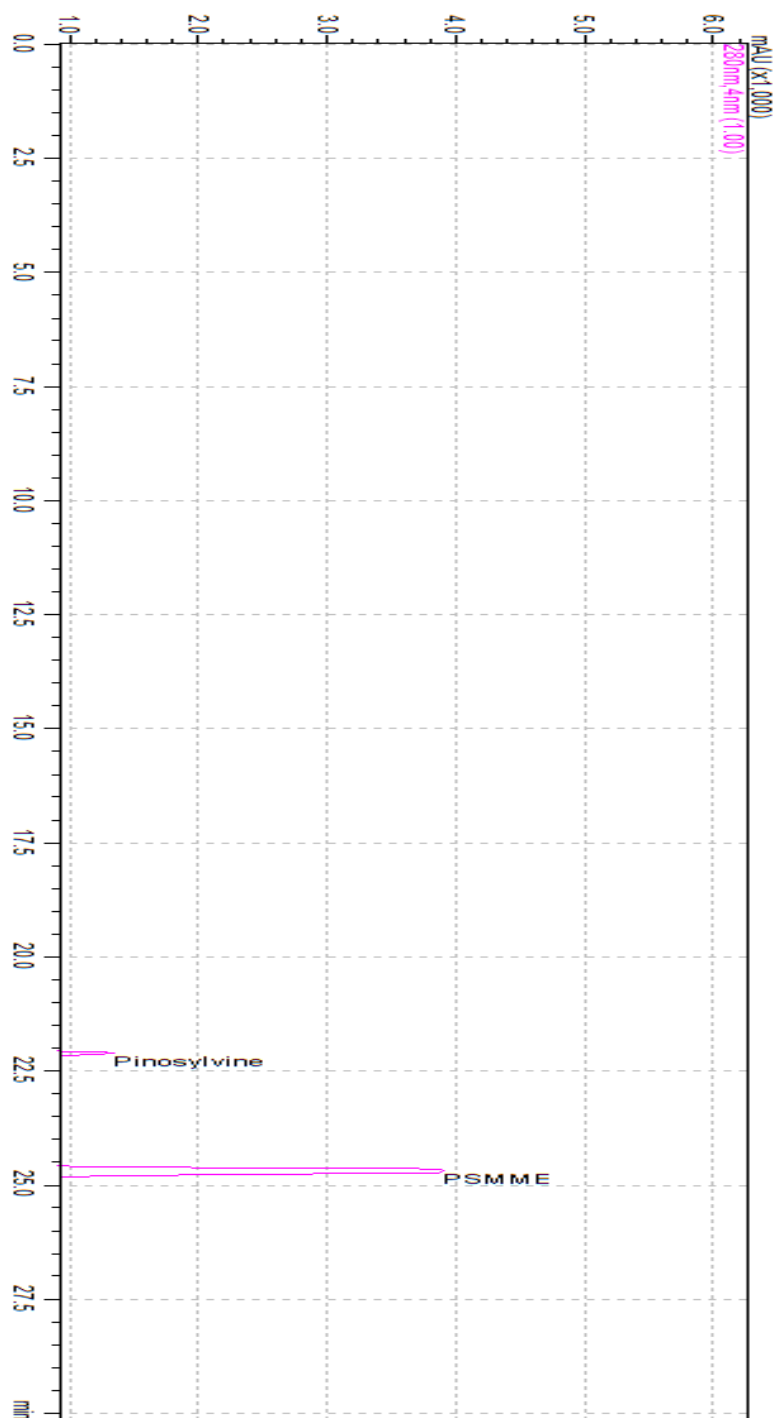
- granatum L.) using pressurized liquids and deep eutectic solvents, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 60: 102314, 1-11.
- H. Hafizoglu ve M. Usta, "Chemical composition of coniferous wood species occurring in Turkey," *HOLZ ALS ROH-UND WERKSTOFF*, vol.63, no.1, pp.83-85, 2005
- Hovelstad, H., Leirset, I., Oyaas, K. ve Fiksdahl, A. (2006). Screening Analyses of Pinosylvin Stilbenes, Resin Acids and Lignans in Norwegian Conifers. *Molecules*, 11(1), 103–114.
- Huang, L., Chen, Z., Wen, Q., Ji, Y., Wu, Z., & Lee, D.-J. (2019). *Toward flexible regulation of polyhydroxyalkanoate composition based on substrate feeding strategy: insights into microbial community and metabolic features*. *Bioresource Technology*, 122369.
- Humar, M., Oven, P., Poljanšek, I., Vek, V. ve Wilför, S. (2020). In vitro inhibition of extractives from knotwood of Scots pine (*Pinus sylvestris*) and black pine (*Pinus nigra*) on growth of *Schizophyllum commune*, *Trametes versicolor*, *Gloeophyllum trabeum* and *Fibroporia vaillantii*. *Wood Science and Technology* 54(6): 1645–1662.
- Jančinová, V., Perečko, T., Nosál, R., Harmatha, J., šmidrkal, J. ve Drábiková, K. (2012). The natural stilbenoid pinosylvin and activated neutrophils: effects on oxidative burst, protein kinase C, apoptosis and efficiency in adjuvant arthritis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(10): 1285–1292.
- Kebbi-Benkeder, Z., Colin, F., Dumarçay, S. ve Gérardin, P. (2014). Quantification and characterization of knotwood extractives of 12 European softwood and hardwood species. *Annals of Forest Science*, 72(2): 277–284.
- Kebbi-Benkeder, Z., Dumarçay, S., Touahri, N., Manso, R., Gérardin, P., ve Colin, F. (2016). Les noeuds : un bois méconnu et une source importante de composés extractibles. *Revue Forestière Française*, (1).
- Neacsu, M., Micol, V., Pérez-Fons, L., Willför, S., Holmbom, B. ve Mallavia, R. (2007). A Novel Antioxidant Phenyl Disaccharide from *Populus tremula* Knotwood. *Molecules*, 12(2): 205–217.
- MacRae, W. D., Towers, G. H. N. (1984). Biological activities of lignans, *Phytochemistry*, 23(6): 1207–1220.
- Merev N., 2003. Odun Anatomisi, Karadeniz Üniversitesi Orman Fakültesi, genel yayın no:209.
- Nadeem, M., Ubaid, N., Qureshi, T. M., Munir, M. ve Mehmood, A. (2018). Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage, *Ultrasonics Sonochemistry*, 45: 1–6.

- Nichenametla, S. N., Taruscio, T. G., Barney, D. L., & Exon, J. H. (2006). A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(2), 161–183.
- Nisula, L. (2018), Wood extractives in conifers : a study of stemwood and knots of industrially important species, *Åbo Akademi University Press*.
- Palori, L. (2015). Wood biochemicals for the protection of health. Focus on hemicellulose, stilbenoids and lignans. *Annales Universitatis Turkuensis*, D 1173
- Panche, A. N., Diwan, A. D. ve Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- Phelan, M., Aherne, S. A., Wong, A. ve O'Brien, N. M. (2009). Bioactive Properties of Wood Knot Extracts on Cultured Human Cells. *Journal of Medicinal Food*, 12(6): 1245–1251.
- Pohjamo, S. P., Hemming, J. E., Willför, S. M., Reunanen, M. H. T. ve Holmbom, B. R. (2003). Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots. *Phytochemistry*, 63(2): 165–169.
- Poljanšek, I., Oven, P., Vek, V., Raitanen, J.-E., Hemming, J. ve Willför, S. (2018). Isolation of pure pinosylvins from industrial knotwood residue with non-chlorinated solvents. *Holzforschung*, 73(5).
- Rattö, M., Ritschkoff, A. C. ve Viikari, L. (2004). Enzymatically polymerized phenolic compounds as wood preservatives, *Holzforschung*, 58: 440-445.
- Roushfort, K. (2000). Photo-guide des Arbres d'Europe. Delachaux et Niestle, S.A.Paris.
- Ropers, C., Neacsu, C. C., Elsaesser, T., Albrecht, M., Raschke, M. B., & Lienau, C. (2007). Grating-Coupling of Surface Plasmons onto Metallic Tips: A Nanoconfined Light Source. *Nano Letters*, 7(9), 2784–2788.
- Saatçioğlu, F. (1955). *Pinus nigra* Arnold'un yeni bir varyetesi (*Pinus nigra* Arnold var. şeneriana Saatçioğlu, var. nov.) . *Journal of the Faculty of Forestry Istanbul University*, 5 (2), 266-274.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12): 3875–3883.
- Seçkin, N. P. (2010). Ahşap Malzeme Sorunlarının Teşhis Yöntemleri. *Restorasyon ve Konservasyon Çalışmaları Dergisi*, 4: 81-87.
- Sekine, N., Shibutani, S. ve Yatagai, M. (2013). Chemical composition of the terpenoids in wood and knots of *Abies* species. *European Journal of Wood and Wood Products*, 71(5): 679–682.
- Shen, T., Wang, X.-N. ve Lou, H.-X. (2009). Natural stilbenes: an overview. *Natural Product Reports*, 26(7): 916.

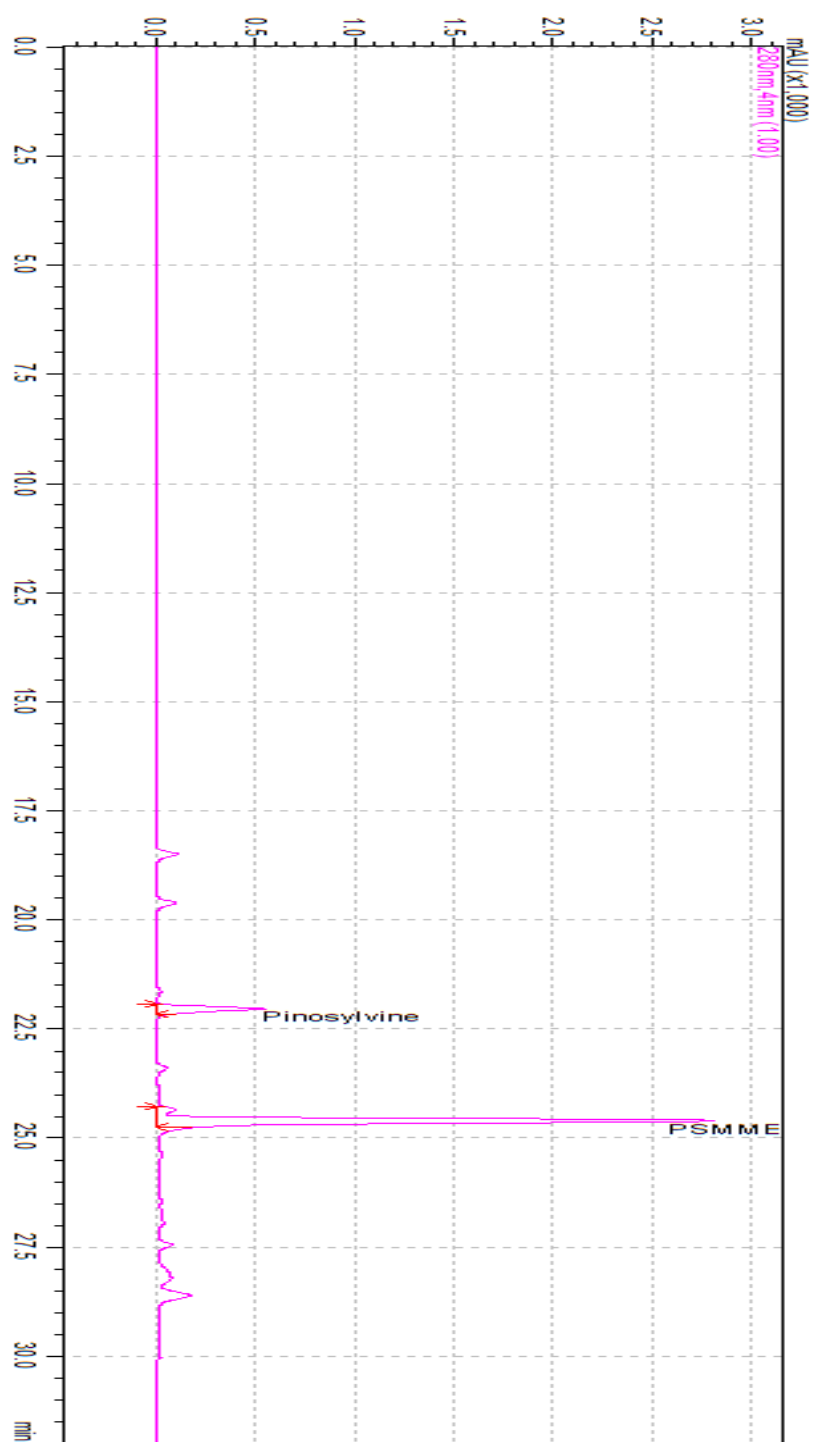
- Smeds, A. I., Eklund, P. C. ve Willför, S. M. (2018). Characterization of high-molar-mass fractions in a Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) knotwood ethanol extract. *Holzforschung*, 72(3): 201–213.
- Smeds, A. I., Češková, I., Eklund, P. C. ve Willför, S. M. (2012). Identification of new lignans in Norway spruce knotwood extracts. *Holzforschung*, 66(5): 553–567.
- Tedersoo, L., Suvi, T., Larsson, E., & Kõljalg, U. (2006). Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycological Research*, 110(6), 734–748.
- Valette, N., Perrot, T., Sormani, R., Gelhaye, E. ve Morel-Rouhier, M. (2017). Antifungal activities of wood extractives. *Fungal Biology Reviews*, 31(3): 113–123.
- Valimaa, A., Honkalampihamalainen, U., Pietarinen, S., Willfor, S., Holmbom, B. ve Vonwright, A. (2007). Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 115(2), 235–243.
- Vek, V., Balzano, A., Poljanšek, I., Humar, M. ve Oven, P. (2020). Improving Fungal Decay Resistance of Less Durable Sapwood by Impregnation with Scots Pine Knotwood and Black Locust Heartwood Hydrophilic Extractives with Antifungal or Antioxidant Properties. *Forests*, 11(9): 1024.
- Vek, V., Oven, P., Ters, T., Poljanšek, I. ve Hinterstoisser, B. (2014). Extractives of mechanically wounded wood and knots in beech. *Holzforschung*, 68(5): 529–539.
- Wagner, M., Musso, M., Kain, S., Willför, S., Petutschnigg, A., ve Schnabel, T. (2020). Larch Wood Residues Valorization through Extraction and Utilization of High Value-Added Products. *Polymers*, 12(2): 359.
- Willför, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., Reunanen, M. H. T., Eklund, P. C., Sjöholm, R. E. ve Holmbom, B. R. (2003). Antioxidant Activity of Knotwood Extractives and Phenolic Compounds of Selected Tree Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26): 7600–7606.
- Willför, S.M., Hemming, J., Reunanen, M., Holmbom, B., 2003. Phenolic and lipophilic extractives in scots pine knots and stemwood. *Holzforschung*, 57: 359–372.
- Yaltırık, F., Akkemik, Ü. 2011. Türkiye'nin Doğal Gymnospermeleri (Açık Tohumlular), T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı.
- Yatkin, E., Polari, L., Laajala, T. D., Smeds, A., Eckerman, C., Holmbom, B., Mäkelä, S. I. (2014). Novel Lignan and Stilbenoid Mixture Shows Anticarcinogenic Efficacy in Preclinical PC-3M-luc2 Prostate Cancer Model. *PLoS ONE*, 9(4), e93764.

EKLER

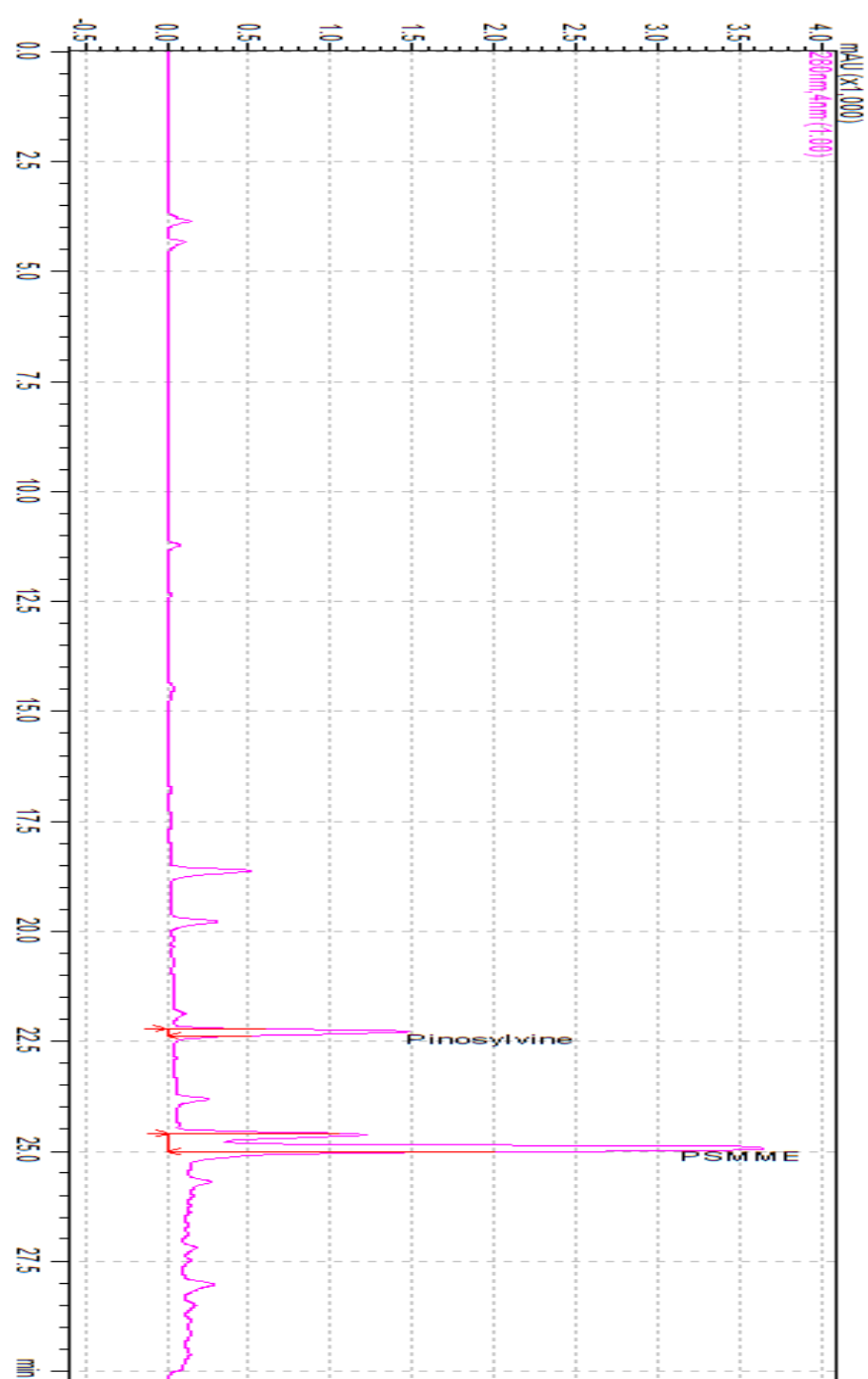
Ek 1: 1-B-1-SSB-30dk-60C-10ml-1CH-2FA



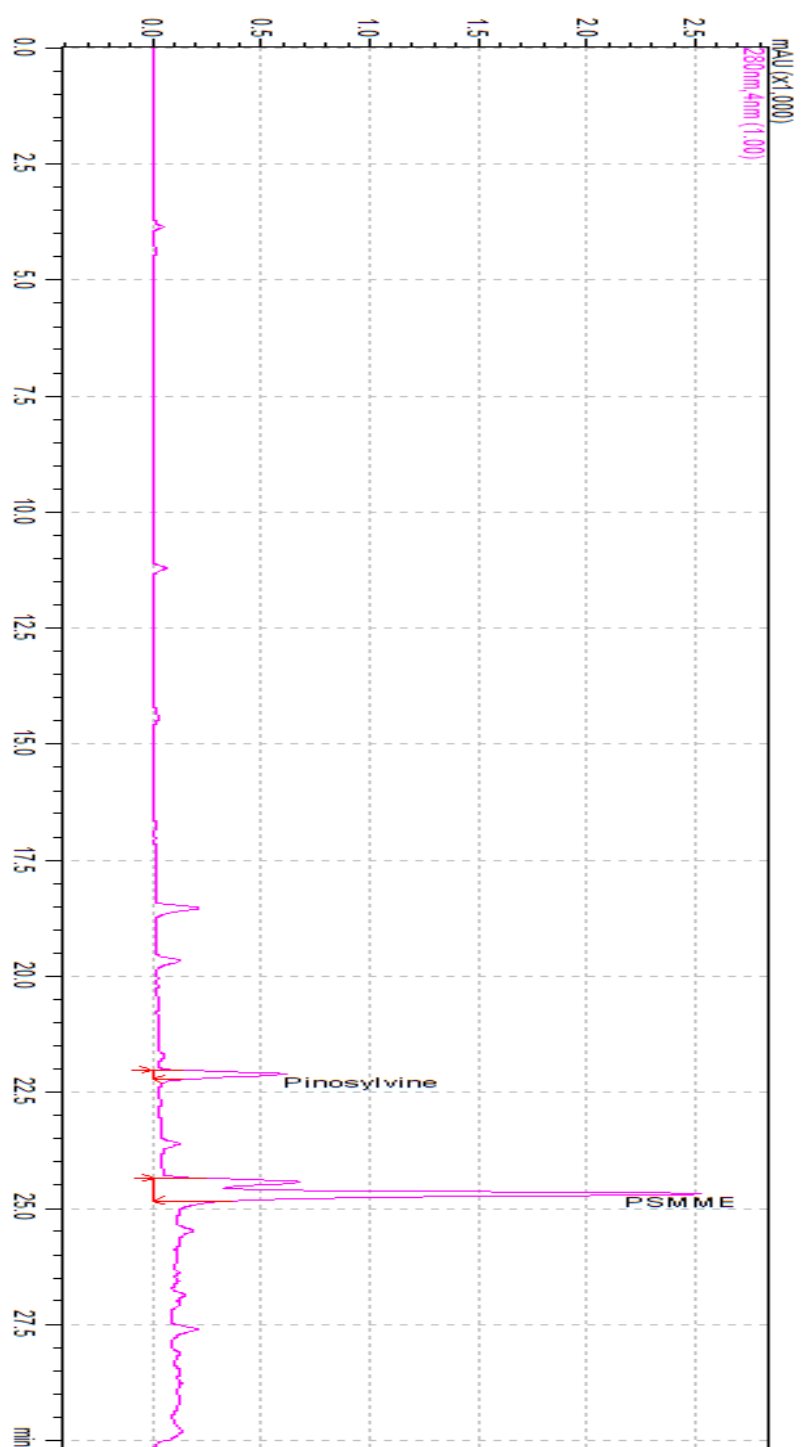
Ek 2: 1-B-2-SSB-60dk-60C-10ml-1CH-2FA



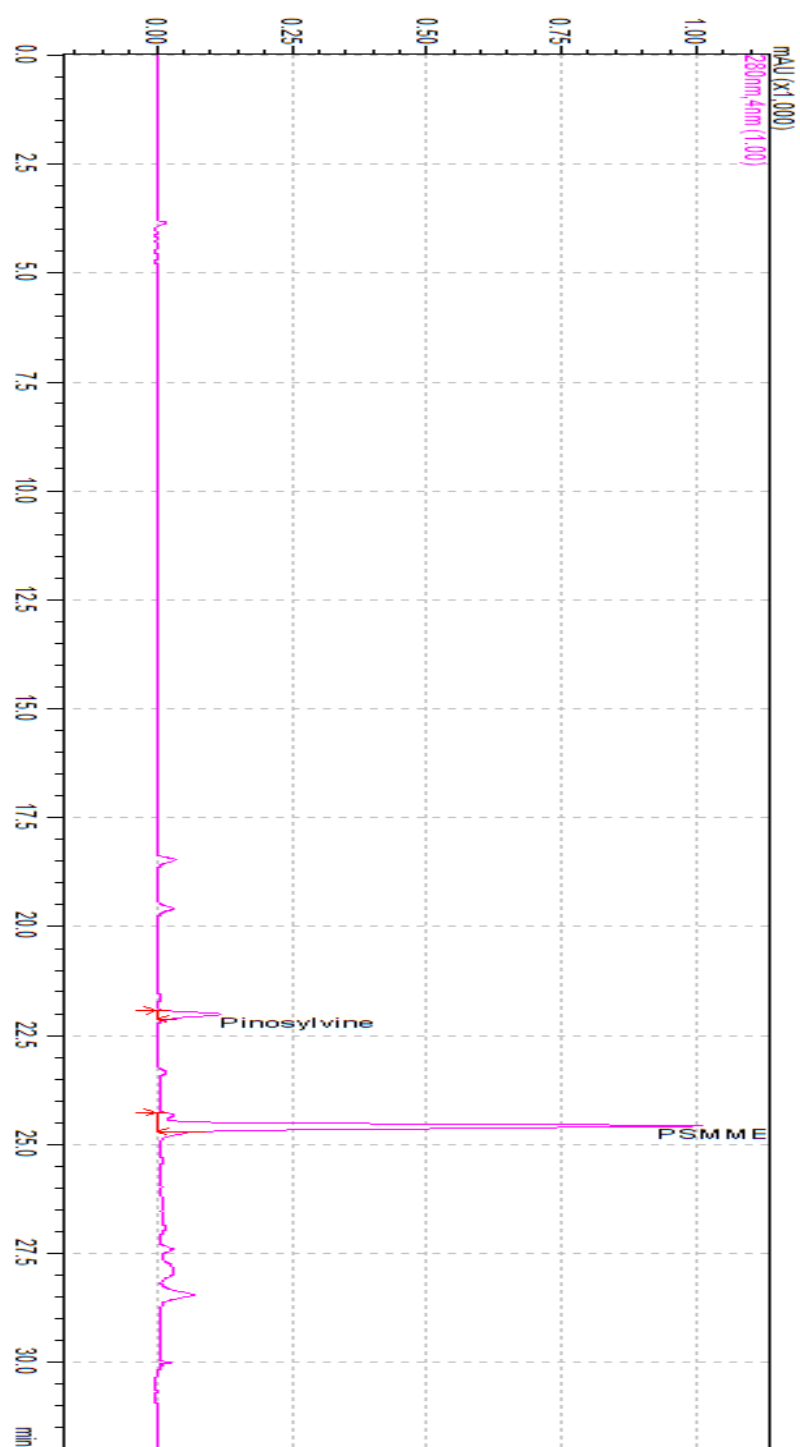
Ek 3: 1-B-3-USB-30dk-70C-10ml-1CH-2Et-gly



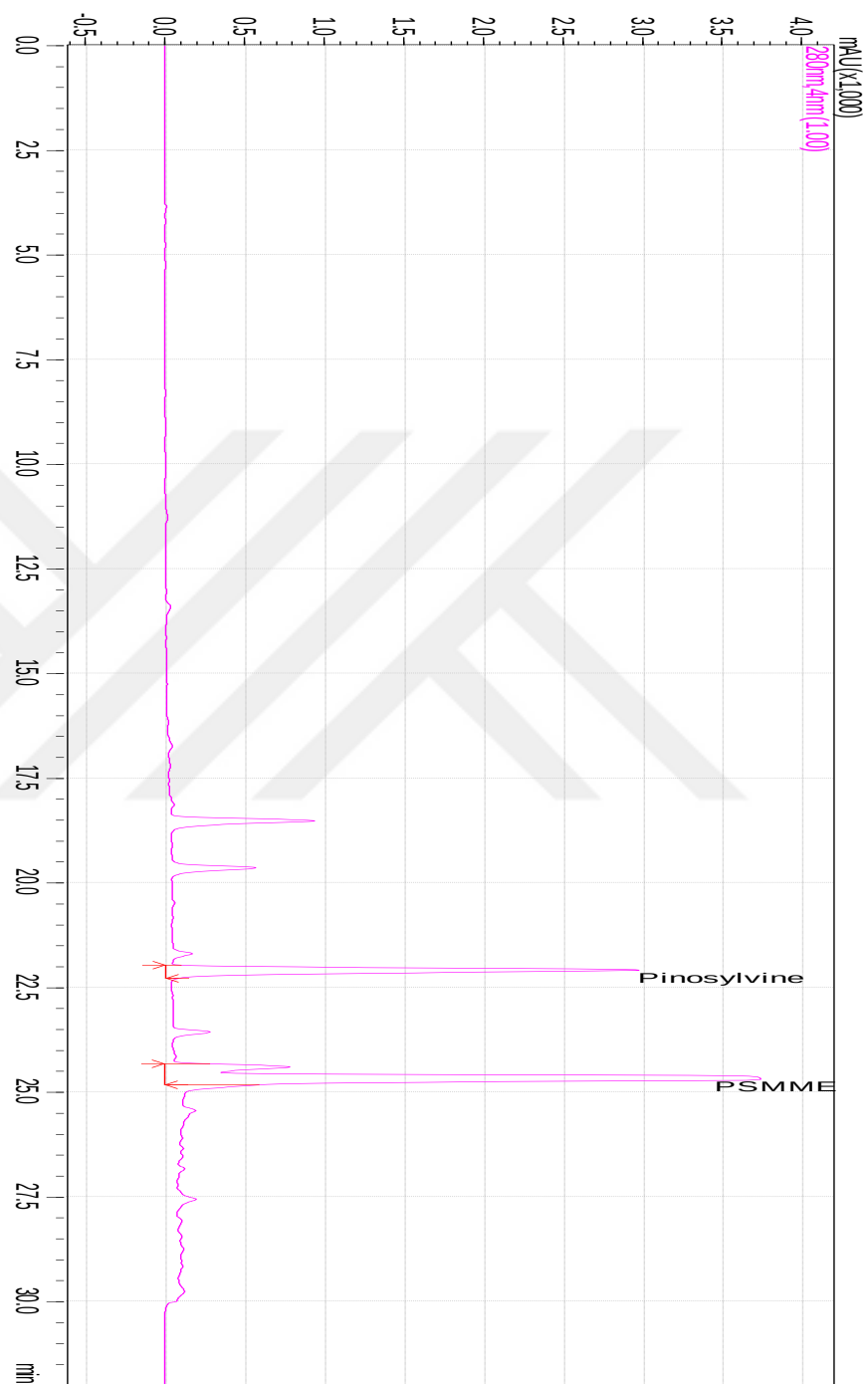
Ek 4: 1-B-4-SSB-60dk-70C-10ml-1CH-2FA



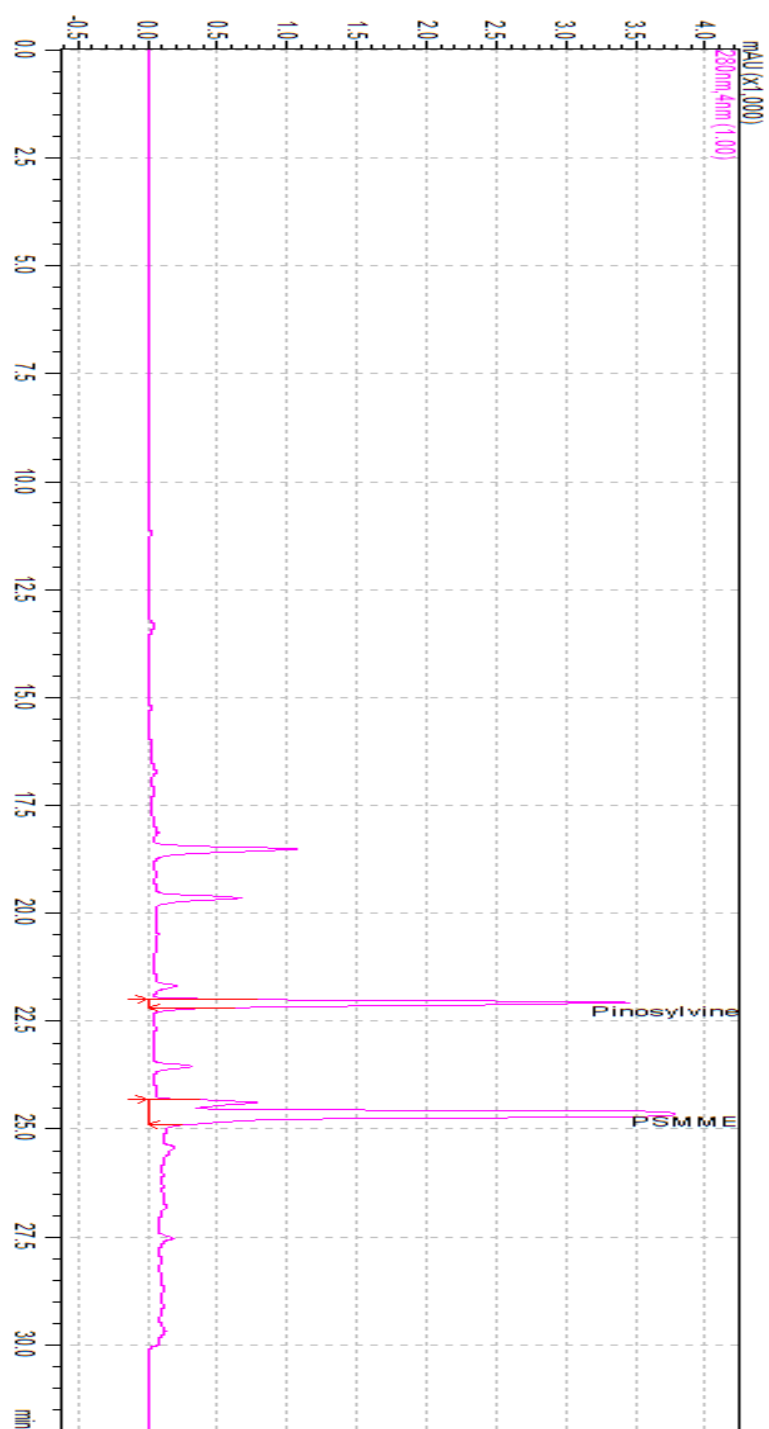
Ek 5: 1-B-5-SSB-30dk-60C-20ml-1CH-2Et-gly



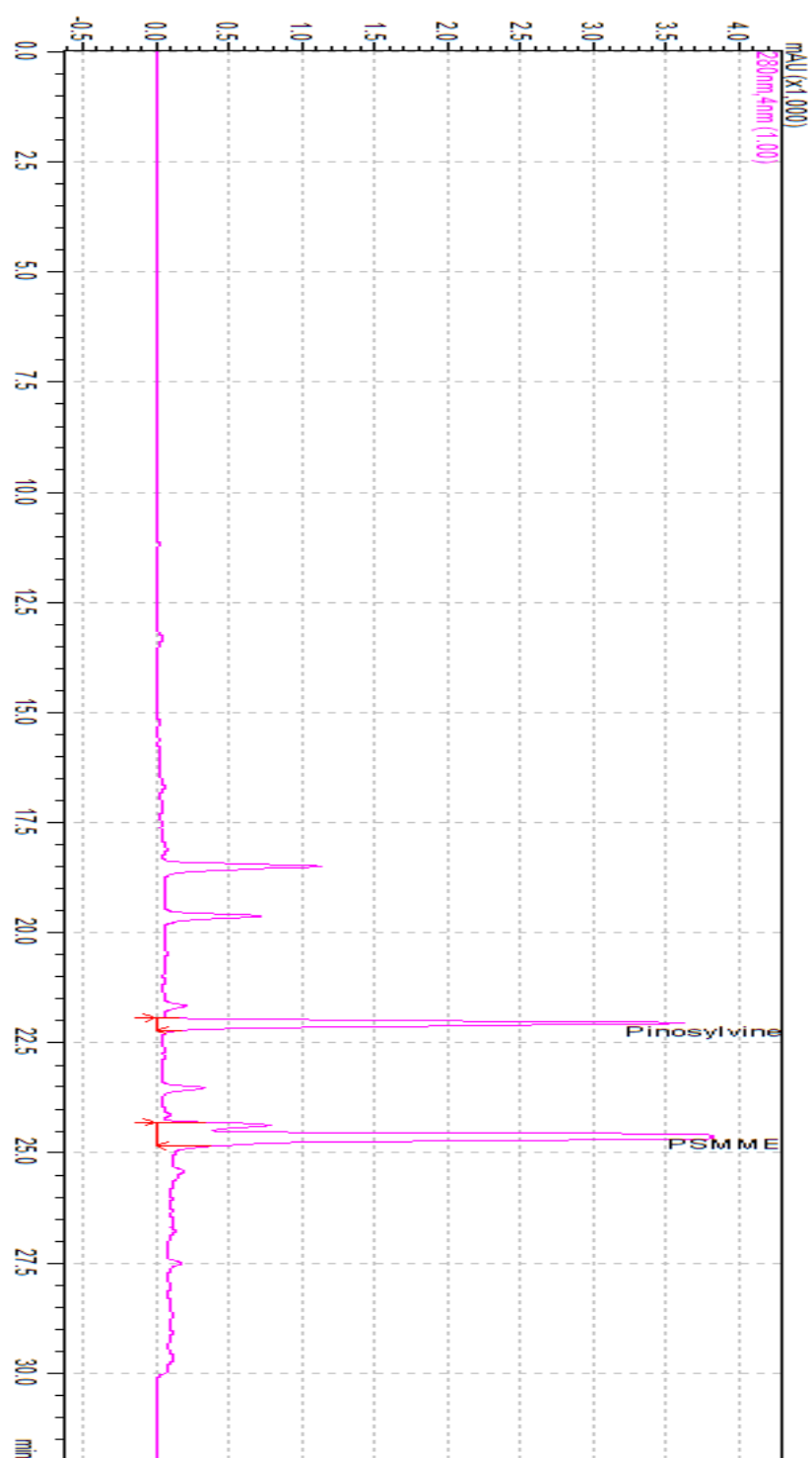
Ek 6: 1-B-1-USB-30dk-60C-10ml-1CH-2Et-gly



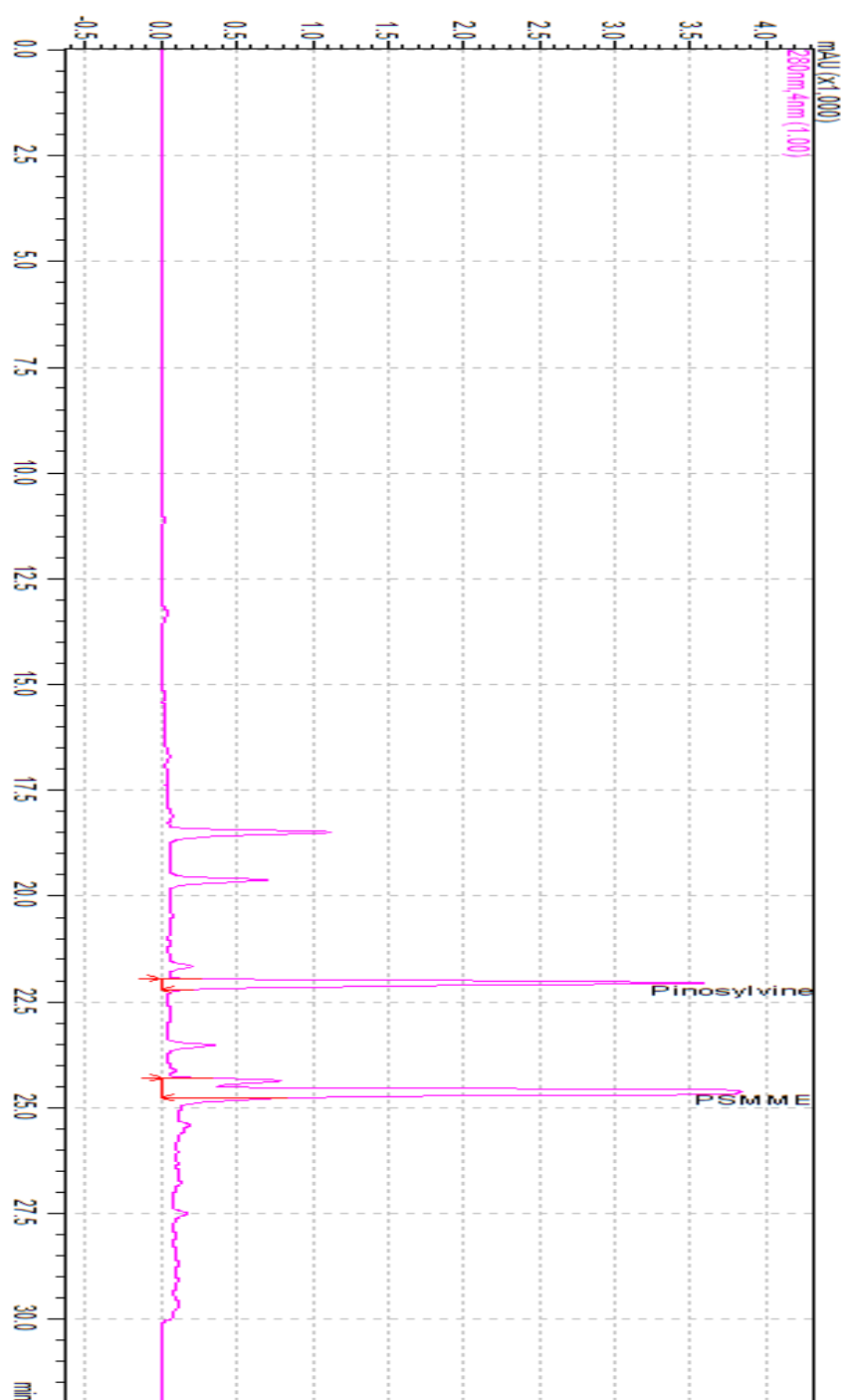
Ek 7: 1-B-2-USB-60dk-60C-10ml-1CH-2Et-gly



Ek 8: 1-B-3-USB-30dk-70C-10ml-1CH-2Et-gly



Ek 9: 1-B-4-USB-60dk-70C-10ml-1CH-2Et-gly



Ek 10: 1-B-5-USB-30dk-60C-20ml-1CH-2Et-gly

