

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KETEN TOHUMU YAĞININ OKSİDATİF STABİLİTESİNİN
MİKROEMÜLSİYE POLAR ANTİOKSİDANLARLA ARTTIRILMASI

AYŞE YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2019

Tezin Başlığı: Keten Tohumu Yağının Oksidatif Stabilitésinin Mikroemülsiyé Polar Antioksidanlarla Arttırılması

Tezi Hazırlayan: Ayşe YILMAZ

Sınav Tarihi: 21.06.2019

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değérlendirilerek Gıda Bilimleri Mühendisliğı Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gökhan DURMAZ

.....

İnönü Üniversitesi

Doç. Dr. Sibel ULUATA

.....

İnönü Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Zeynal TOPALCENGİZ

.....

Muş Alparslan Üniversitesi

Prof. Dr. Halil İbrahim ADIGÜZEL

Enstitü Müdürü



Değerli Annem ve Babama...

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Keten Tohumu Yağının Oksidatif Stabilitesinin Mikroemülsiyeye Polar Antioksidanlarla Arttırılması” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

AYŞE YILMAZ



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KETEN TOHUMU YAĞININ OKSİDATİF STABİLİTESİNİN MİKROEMÜLSİYE POLAR ANTİOKSİDANLARLA ARTTIRILMASI

AYŞE YILMAZ

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

77 + viii sayfa

2019

Danışman: Prof. Dr. Gökhan DURMAZ

Bu çalışmada keten tohumu yağı (KTY) içinde su mikroemülsiyonlarının oksidatif stabilitesine bitki ekstraktları ve standart antioksidanların etkisi araştırılmıştır. Soğuk presleme ile elde edilen KTY'nin yağ asidi bileşimi, tokoferol içeriği, toplam karotenoid miktarı; çalışmada kullanılan bitki ekstraktlarının da antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Emülsifikasyon işlemi manyetik karıştırma yoluyla yapılmış olup yağların su içeriği 1 ml/L olarak ayarlanmıştır. Standart antioksidanlar olan gallik asit ve α -tokoferol, bitki ekstraktı olarak da nar kabuğu, biberiye ve üzüm çekirdeği su ekstraktları bu emülsiyonlara ayrı ayrı ilave edilmiştir. Hazırlanan mikroemülsiyonlar 50°C sıcaklıkta 20 gün boyunca oksidasyona bırakılmıştır. Oksidasyon süresi boyunca belli aralıklarla peroksit değeri (PV), tiyobarbütirik asit reaktif madde miktarı (TBARS), serbest yağ asitliği (FFA) ve antioksidan kapasite (ABTS) belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, KTY'de başlıca yağ asidi olarak %55.9 oranında α -linolenik asit bulunduğu, diğer yağ asitlerinden oleik ve linoleik asidin ise sırasıyla %18.3 ve 16.0 oranında bulunduğu belirlenmiştir. γ -Tokoferolün 399 mg/kg ile baskın tokoferol vitamini olduğu, diğer vitaminlerin ise önemsiz düzeylerde bulunduğu belirlenmiştir. Hem PV hem de TBARS analiz sonuçları, sadece su ve yüzey aktif madde (poligliserol polirisinolat, PGPR) içeren KTY örneğinin; hiçbir şey katılmamış KTY, sadece PGPR içeren ve α -tokoferol+su içeren KTY örneğine göre daha yüksek oksidatif stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan, gallik asit veya bitki ekstraktları içeren KTY örneklerinin, bunların tamamından daha düşük PV ve TBARS değerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bitki ekstraktı eklenmiş örnekler içerisinde en yüksek oksidatif stabilite, üzüm çekirdeği ekstraktında gözlenmiştir. Bu örneğin PV ve TBARS değerlerinin gallik aside kıyasla da daha düşük olduğu belirlenmiştir. Üzüm çekirdeği örneğinin antioksidan kapasitesinin ve oksidasyon sırasında karotenoidlerin varlığının göstergesi olan renk değerlerinin de diğer örneklerle göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile, mikroemülsiyonların teknik olarak emülsiyon olmakla birlikte, berrak görünümü ve termodinamik stabilitesi ile bulk KTY'na benzedikleri gözlenmiştir. Daha önemlisi, bu tezle KTY'nin oksidatif stabilitesinin, yağın görünümünde belirgin bir değişim olmaksızın, organik solvent kullanılmadan elde edilen bitki ekstraktları kullanılarak önemli düzeyde artırılabilirdiği gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Keten Tohumu Yağı, Mikroemülsiyon, Oksidatif Stabilite, Biberiye, Nar Kabuğu, Üzüm Çekirdeği

ABSTRACT

Master Thesis

IMPROVING OXIDATIVE STABILITY OF FLAXSEED OIL BY MICROEMULSIFIED POLAR ANTIOXIDANTS

AYŞE YILMAZ

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

77 + viii pages

2019

Supervisor: Prof. Dr. Gökhan DURMAZ

In this study, the effect of plant extracts and standard antioxidants on the oxidative stability of water-in-flaxseed oil microemulsions was investigated. Fatty acid profile, tocopherol composition, total carotenoid content of cold-pressed flaxseed oil (FO) and antioxidant capacity of the plant extracts used in the study was determined. The emulsification was managed by magnetic stirring and the water content of the oils was adjusted to 1 ml/L. Pomegranate peel, rosemary and grape seed water extracts and standard antioxidants gallic acid and α -tocopherol were added separately to these emulsions. The prepared microemulsions were allowed to oxidize at 50 °C in an oven for 20 days. At intervals, peroxide value (PV), thiobarbutyric acid reactive substances (TBARS), free fatty acid content (FFA) and antioxidant capacity (ABTS) were determined.

According to the results, it was found that FO contains 55.9 % α -linolenic acid as the primary fatty acid while oleic and linoleic acids were measured as 18.3 and 16.0%, respectively. γ -Tocopherol was found to be the predominant tocopherol vitamer with the concentration of 399 mg/kg whereas the other tocopherols were measured to be lower levels. Both PV and TBARS tests have revealed that FO microemulsion that containing just water+surfactant (Polyglycerol polyricinoleate) had higher oxidative stability compared to the bulk FO, surfactant containing FO and α -tocopherol+water containing FO. On the other hand, either gallic acid or plant extract added FO samples had lower PV and TBARS values compared to all other samples. Among plant extract added samples, the highest oxidative stability was measured for grape seed extract which had even lower PV and TBARS results compared to gallic acid. In the meantime, antioxidant capacity and color disappearance which was the indication of carotenoid disappearance were also minimum in this sample.

As conclusion, it has been shown that although they are technically emulsions, microemulsions resemble to bulk FO with clear appearance and thermodynamic stability. More importantly, it is postulated with this theses that oxidative stability can be significantly improved by using solvent-free plant extracts in the form of FO microemulsions without changing the appearance.

KEYWORDS: Flaxseed Oil, Microemulsion, Oxidative Stability, Rosemary, Pomegranate Peel, Grape Seed

TEŞEKKÜR

Başta bu çalışma olmak üzere yüksek lisans eğitimimin her aşamasında akademik ve etik değerler ışığında ufuk açıcı katkılarını cömertçe sunarak danışmanlığın ötesinde büyük bir özveri ve nezaketle bana destek olduğundan ötürü danışmanlığında olmaktan gurur duyduğum değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Gökhan DURMAZ'a,

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Sibel ULUATA'ya,

Çalışmam esnasında her türlü imkandan faydalanmamı sağlayan İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine,

Laboratuvar çalışmalarım sırasında çalışmama katkıda bulunan çalışma arkadaşım Yunus İZCİ'ye,

Yüksek lisans eğitimim boyunca gece-gündüz demeden bana eşlik eden ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Arş. Grv. Hacer GÜRKAN'a ve sevgili arkadaşlarım Ülkühan BAĞIŞ ve Arş. Grv. Sara ALTUN'a,

Hayatım boyunca her adımda bana destek olan, maddi ve manevi fedakarlıklarıyla bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım aileme ve her an desteğini yanımda hissettiğim canım ablacığım Kandile YILMAZ'a,

Bu çalışmayı İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi FLY-2018-1192 nolu proje ile maddi olarak destekleyen ve olanak sağlayan İnönü Üniversitesi Rektörlüğü'ne

en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Omega-3 Yağ Asitleri	4
1.2. Lipid Oksidasyonu ve Oksidatif Stabilit�	5
1.2.1. Lipid oksidasyonu belirleme testleri	8
1.2.1.1. Peroksit sayısı	8
1.2.1.2. TBA değeri.....	9
1.3. Antioksidanlar	9
1.3.1. Tokoferoller ve tokotrienoller	10
1.3.2. Yağlarda toplam antioksidan kapasite testleri.....	12
1.3.3. Yağların antioksidanlarca zenginleştirilmesi	12
1.3.4. Bitkilerin antioksidan �zellikleri.....	13
1.4. Emülsiyonlar	16
1.4.1. Emülgatörler (yüzey aktif maddeler)	20
2. KAYNAK ÖZETLERİ	24
3. MATERYAL METOD	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	28
3.1.2. Kullanılan alet, ekipman ve cihazlar	28
3.2. Metod	29
3.2.1. Yağ eldesi.....	29
3.2.2. Yağ Analizleri	29
3.2.2.1. Yağ asidi bileşimi.....	29
3.2.2.2. Tokoferol analizi	30
3.2.2.3. Toplam karotenoid analizi.....	30
3.2.3. Bitki ekstraktlarının eldesi	30
3.2.4. Bitki ekstraktlarında yapılan analizler	31
3.2.4.1. Toplam fenolik madde analizi.....	31
3.2.4.2. Antioksidan aktivite analizi.....	31

3.2.5.	Emülsiyon hazırlama.....	32
3.2.6.	Partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümü	33
3.2.7.	Oksidatif stabilite testleri	33
3.2.7.1.	Peroksit sayısı	33
3.2.7.2.	Tiyobarbütirik asit sayısı.....	33
3.2.8.	Antioksidan kapasitenin belirlenmesi	34
3.2.9.	Serbest yağ asitliği analizi.....	34
3.3.	İstatistiksel Analizler.....	35
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	36
4.1.	Yağ Analizleri	36
4.1.1.	Yağ asidi bileşimi.....	36
4.1.2.	Tokoferol analizi	38
4.1.3.	Toplam karotenoid analizi.....	40
4.2.	Bitki Ekstraktlarında Yapılan Analizler.....	43
4.2.1.	Toplam fenolik madde analizi.....	43
4.2.2.	Antioksidan aktivite analizi.....	44
4.3.	Partikül Boyutu ve Zeta potansiyeli Ölçümü	45
4.4.	Oksidatif Stabilite Testleri	46
4.4.1.	Peroksit sayısı	46
4.4.2.	Tiyobarbütirik asit sayısı.....	53
4.5.	Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi.....	57
4.6.	Serbest Yağ Asitliği	60
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	64
6.	KAYNAKÇA.....	67
	ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

ANOVA	Varyans (Değişkenlik) Analizi
AOCS	American Oil Chemists' Society
GC-FID	Gaz Kromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektör
HPLC-DAD	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Diyot Dizilim Dedektör
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Tolüen
PV	Peroksit Sayısı
TBARS	Tiyobarbütirik Asit Sayısı
ABTS	2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrrylhydrazyl
PGPR	Poligliserol Polirisinolat
EPA	Eikosa Pentaenoik Asit
DHA	Dokosa Hekzaenoik Asit
MDA	Malondialdehit
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
TEAC	Trolox Eşdeğeri
HLB	Hidrofil-Lipofil Dengesi
CMC	Kritik Misel Konsantrasyonu
ÜÇE	Üzüm Çekirdeği Ekstraktının
NKE	Nar Kabuğu Ekstraktlarının
KTY	Keten Tohumu Yağı
ALA	α -linolenik asit
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
g	Gram
cm	Santimetre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Yağ asitlerinin gruplandırılması.....	4
Şekil 1.2.	Omega yağ asitlerinin molekül yapıları	4
Şekil 1.3.	ALA (α -linoleik asit) metabolizması	5
Şekil 1.4.	Lipit oksidasyonu sırasında indüksiyon periyodunu (IP) gösteren değişim eğrisi	6
Şekil 1.5.	Tokoferollerin ve tokotrienollerin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 1.6.	Karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asidin kimyasal yapısı ...	14
Şekil 1.7.	Punikalaginın kimyasal yapısı	15
Şekil 1.8.	Kateşin, epikateşin, epigallokateşin ve gallokateşin'in kimyasal yapıları	16
Şekil 1.9.	Y/S (su içinde yağ) ve S/Y (yağ içinde su) tipi emülsiyonların oluşumunun şematik gösterimi	19
Şekil 1.10.	Yüzey aktif maddenin yapısı.....	20
Şekil 1.11.	Yüzey aktif maddelerin misel oluşum şekilleri.....	22
Şekil 1.12.	Misel (a) ve ters misel (b) şekilleri	23
Şekil 4.1.	Yağ asidi metil esterleri karışımının GC-FID kromatogramı	37
Şekil 4.2.	Keten tohumu yağı için elde edilen GC-FID kromatogramı.....	37
Şekil 4.3.	Tokoferol standartlarının normal faz HPLC ile elde edilen kromatogramı	38
Şekil 4.4.	Keten tohumu yağının normal faz HPLC ile elde edilen tokoferol kromatogramı	39
Şekil 4.5.	Oksidasyon süresince örneklerin renklerinde meydana gelen değişiklikler.....	42
Şekil 4.6.	Biberiye, nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde miktarı	43
Şekil 4.7.	Gallik asit, biberiye, nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ekstraktının antioksidan aktivitesi.....	44
Şekil 4.8.	alfa-tokoferol ilave edilen mikroemülsiyonun partikül çapı ölçümü sonucu	45
Şekil 4.9.	Üzüm çekirdeği ekstraktı ilave edilen mikroemülsiyonun partikül çapı ölçümü sonucu	46
Şekil 4.10.	Hazırlanan mikroemülsiyonların görüntüsü.....	46
Şekil 4.11.	Örneklerin oksidasyon süresince peroksit sayılarında meydana gelen değişiklikler	47
Şekil 4.12.	Örneklerin oksidasyon süresince tiyobarbitirik asit sayısı değerlerinde meydana gelen değişiklikler.....	55
Şekil 4.13.	Örneklerin oksidasyon süresince serbest yağ asitlerinde değerlerinde meydana gelen değişiklikler.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Keten tohumunun besin değeri kompozisyonu (100 g için)	1
Çizelge 1.2.	Partikül çaplarına göre emülsiyonlar	18
Çizelge 1.3.	Bazı yüzey aktif maddelerin kimyasal yapısı ve sınıfı	21
Çizelge 1.4.	Bazı yüzey aktif maddelerin HLB değerleri	22
Çizelge 4.1.	Keten tohumu yağının % yağ asidi bileşimi	36
Çizelge 4.2.	Belirli periyotlarda alınan örneklerin peroksit sayısı değerleri ...	48
Çizelge 4.3.	Nar kabuğu ekstraktının fenolik bileşik içerikleri	52
Çizelge 4.4.	Belirli periyotlarda alınan örneklerin tiyobar bütirik asit sayısı değerleri	54
Çizelge 4.5.	Belirli periyotlarda alınan örneklerin ABTS değerleri	58
Çizelge 4.6.	Belirli periyotlarda alınan örneklerin % serbest yağ asitlik değerleri	61

1. GİRİŞ

Keten (*Linum usitatissimum*) bitkisi, 30-100 cm boyunda, mavi çiçekli ve tek yıllık bir kültür bitkisidir. Keten tohumları, 4-6 mm uzunlukta, yumurta biçiminde, yassı, parlak, kırmızımtırak esmer renkli, kokusuz ve yağlıdır [1].

Keten tohumunun ağırlığının %55'ini embriyo, %36'sını kabuk ile endosperm ve %4'ünü embriyo kutbu oluşturmaktadır. Keten tohumu yaklaşık %40 yağ, %30 lif, %20 protein, %4 kül ve %6 dolayında nem içermektedir [2].

Dünya üzerinde 2.3 milyon hektar alanda 2.2 milyon ton keten tohumu üretimi yapılmaktadır. Üretim en çok Kanada, Çin, Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Hindistan, Rusya ve Etiyopya ülkelerinde yapılmaktadır [3].

Keten tohumu gıda; yem ve lif eldesi gibi amaçlar için kullanılan önemli yağ bitkilerinden birisidir. Keten bitkisinin hemen hemen tamamı doğrudan veya işlemden geçirildikten sonra ticari olarak kullanılmaktadır Keten tohumu genel olarak öğütülmemiş tohum, öğütülmüş tohum ve keten tohumu yağı şeklinde tüketilmektedir. Keten tohumunun bu üç şeklinin besin değeri kompozisyonu Çizelge 1.1'de verilmiştir [1, 3].

Çizelge 1.1. Keten tohumunun besin değeri kompozisyonu (100 g için) [1]

Ürün	Enerji (kcal)	ALA (g)	Toplam diyet lifi (g)	Çözünür lif (g)	SDG (mg)
Öğütülmemiş tohum	454.5	22.7	27.3	6.82	8.8
Öğütülmüş tohum	450.0	22.5	27.5	6.88	6.4
Keten tohumu yağı	885.7	57.1	0.0	0.00	0.0

ALA: α -linolenik asit, SDG: Sekoisolarikiresinol diglukozyd

Keten tohumu yağı ise günümüzde keten tohumuna soğuk sıkım ve solvent ekstraksiyonu işlemlerinin uygulanması yoluyla elde edilmektedir [4]. Keten tohumu yağı ortalama %73'ü çoklu doymamış, %18'i tekli doymamış, %9'u doymuş yağ asitlerinden oluşmaktadır. Toplam yağ asitlerinin yaklaşık %55'ini α -linolenik asit omega-3 yağ asidi oluşturmaktadır. α -linolenik asit (ALA)'ın keten tohumu yağındaki oranı kendinden sonra en iyi kaynak olan kanola ve ceviz yağından 5.5 kat daha fazladır. Kanada'da yetiştirilen keten tohumları %5 palmitik asit (16:0), %3 stearik asit (18:0), %17 oleik asit (18:1), %15 linoleik asit (18:2) ve %59 α - linolenik asit

(ALA; 18:3) içermektedir. Keten tohumunun yağ içeriği ve kalitesi çeşidine ve kalıtsal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca çevresel faktörlerden sıcaklık, toprak koşulları, kültürel uygulamalar ve bitki hastalıkları da keten tohumunun yağ içeriği ve kalitesini etkilemektedir. Yağ asidi kompozisyonunda en fazla değişkenlik oleik asit (%14- 60), linoleik asit (%3-21) ve linolenik asitte (%31-72) olduğu gözlenmiştir [1].

Dünyada yıllık ortalama 600 bin ton keten tohumu yağı üretilmekte ve bu yağ üretimi en fazla Çin, ABD, Belçika, Etiyopya, Almanya, Hindistan ve Kanada'da yapılmaktadır. Ülkemizde 2000 yılında 100 tonun altında keten tohumu yağı üretimi yapılırken 2009 yılında ise üretim 8000 ton üzerine çıkmıştır [3].

Keten tohumu ve yağı, lignan ve onun müsilajlarının çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde birçok potansiyel kullanıma sahip olduğu ileri sürülmektedir. Özellikle son yıllarda kalp ve damar rahatsızlıklarını, prostat ve göğüs kanseri gibi bazı kanser türlerini önleyici etkisi nedeniyle dikkat çekmektedir [5]. Yapılan bazı çalışmalarda keten tohumunun kolon, meme ve akciğer tümörlerinin gelişimine karşı etkileri incelenmiş ve kemirgenlerde keten tohumunun bu tümörlerin gelişmesini önlediği görülmüştür. Ayrıca günde 10 g keten tohumu tüketilerek meme kanseri riskinin azaltılabileceği bildirilmiştir [6]. Keten tohumunun kalbi koruyucu etkisi de bulunmaktadır. Keten tohumunun kalbi koruyucu etkisinin, tam yağlı keten tohumunun %7-10'unu oluşturan ve müsilaj (gum) olarak bilinen çözünür liflerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir [7].

Keten tohumunun yukarıda belirtilen olumlu etkilerinin yanında yapısındaki besinsel bileşenlerin bazı olumsuz etkileri de bulunmaktadır. Keten tohumu yağı bünyesinde linoleik ve α -linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri barındırmaktadır. Çok sayıda çift bağ içeren bu yağ asitleri keten tohumunu oksidasyona ve serbest yağ asidi oluşumuna hassas hale getirmektedir. Bu nedenle, diyetle uzun süre ve yüksek miktarda alınan keten tohumu oksidatif stresi arttırabilmekte ve antioksidan bileşiklerin azalmasına neden olabilmektedir [1].

Yağların oksidasyonu, gıdaların tadında, kokusunda, görünüşünde ve dokusunda istenmeyen değişikliklere neden olmakta ve ayrıca yağda çözünen vitaminleri yapısını etkilemektedir [8]. Oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleşme hızı yağın yağ asidi bileşimi ve içerdiği antioksidan maddelerin miktarı ile doğrudan ilgilidir. Dolayısıyla yağları, yağ asidi bileşiminde herhangi bir değişiklik yapmadan

oksidasyon reaksiyonlarına karşı koruma yollarından biri dışarıdan antioksidan ilavesidir [9]. Çoğunlukla non-polar (yağda çözünen) özellikte olan antioksidanlar kullanılmaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan antioksidanlar sentetik antioksidan olan BHA (bütillenmiş hidroksi anisol), BHT (bütillenmiş hidroksi tolüen)'dir. Bu sentetik antioksidanların kullanımının sebep olabileceği muhtemel toksitiden dolayı son yıllarda kullanımları azalmasıyla birlikte alternatif olarak tokoferoller gibi doğal antioksidanların kullanımı giderek artmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar polar antioksidanların bulk (emülsiyeye halde olmayan) yağların oksidasyonunu geciktirmekte non-polar antioksidanlara kıyasla daha etkili olduğunu göstermiştir [10]. Fakat polar antioksidanların yağlara eklenmesi konusunda sınırlamalar bulunmaktadır. En önemli sınırlama ise bu maddelerin yağdaki çözünürlüğünün çok az olmasıdır. Bu engel, yağ-su emülsiyonları oluşturularak aşılmaya çalışılmaktadır [11]. Dolayısıyla polar antioksidanları yeteri kadar içerebilen ancak yağın orijinal görünüm ve yapısının bozulmadığı bir durum olan yağ içinde su mikroemülsiyonları yani ters misel içeren yağlar bu anlamda önemli bir alternatif olma potansiyeli taşımaktadır [12].

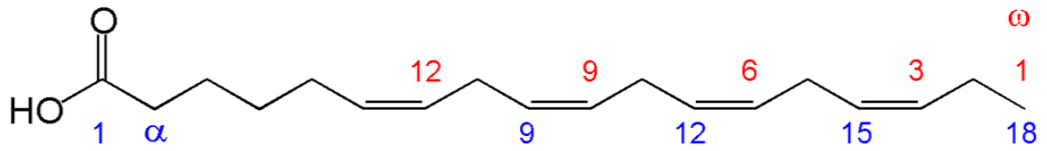
Bu çalışma ile, keten tohumu yağının oksidatif stabilitesini belirlemek, standart polar antioksidanlar ve bitki polar ekstraktları (üzüm çekirdeği, biberiye ve nar kabuğu) eklenmiş ters miselleri içeren keten tohumu yağlarının oksidatif dayanımını belirlemek ve non-polar antioksidanlarla karşılaştırmak, yağ oksidasyonu boyunca antioksidan kapasitedeki değişimleri belirlemek ve böylece önemli bir gıda desteği olma potansiyeli taşıyan keten tohumu yağının raf ömrünün ve dolayısıyla da ticari değerinin artırılması amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda standart antioksidan olarak gallik asit ve α -tokoferol, bitki ekstraktları olarak üzüm çekirdeği, biberiye ve nar kabuğundan elde edilen polar ekstraktlar kullanılmıştır. Elde edilen mikroemülsiyonlar oksidasyona tabi tutulmuş ve oksidasyon aşaması tamamlanmıştır. Standart antioksidanlar (gallik asit ve α -tokoferol) ve bitki ekstraktları içeren ve hiçbir antioksidan içermeyen (kontrol) emülsiyonların oksidatif stabilitelerinin, keten tohumu yağının oksidatif stabilitesi ile karşılaştırılması amacıyla oksidasyon (peroksit sayısı, tiyobar bütirik asit sayısı), serbest yağ asidi değişimi ve antioksidan (ABTS) kapasitesi incelenmiştir. Ayrıca keten tohumu yağının yağ asidi bileşimi, tokoferol izomerlerinin miktarı ve toplam karotenoid miktarı belirlenmiştir.

1.1. Omega-3 Yağ Asitleri

Doğada bulunan yağlar içerdikleri çift bağ sayısına göre doymuş, tekli doymamış, çoklu doymamış şeklinde 3 gruba ayrılırlar (Şekil 1.1). Çoklu doymamış yağ asitleri ise hidrokarbon zincirinin metil ucuna en yakın çift bağın pozisyonuna göre omega-3 (ω -3) ve omega-6 (ω -6) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Şekil 1.2) [3].

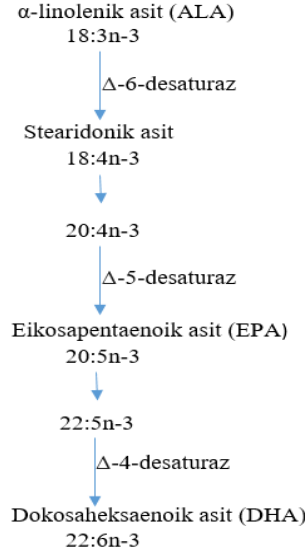


Şekil 1.1. Yağ asitlerinin gruplandırılması



Şekil 1.2. Omega yağ asitlerinin molekül yapıları [3]

Ülkemiz de dâhil olmak üzere batı tarzı beslenmenin hâkim olduğu birçok bölgede, ω -6 yağ asitleri (özellikle linoleik asit) diyetle giren birçok yağda bol miktarda bulunduğundan dolayı eksikliği nadiren görülmektedir. Ancak ω -3 yağ asitleri, sadece bazı deniz canlılarında ve sınırlı sayıda bitkisel yağlarda yeteri kadar bulunduğundan çoğu zaman diyetle yeteri kadar alınamamaktadırlar [13]. Başlıca ω -3 yağ asidi içeren balık ile ALA (18:6, a-linoleik asit) içeren yemişler, tohumlar ve sebzelerdir [14]. Bu yağ asitlerinin erkeklerde yaklaşık günlük 1.6 g, kadınlarda ise 1.1 gram alımı önerilmektedir [15]. Memeli hayvanlar ve insanlarda Δ -5 ve Δ -6 desaturaz enzimi bulunmadığından dolayı hücre içinde ω -3 ve ω -6 yağ asitleri sentezlenemez ve bu nedenle diyetle alınmak zorundadır [16]. Ancak diyetle alınan ALA insan metabolizmasında, aşağıda gösterilen (Şekil 1.3) bir dizi enzimatik basamakla DHA ve EPA'ya dönüştürülebilmektedir [17].



Şekil 1.3. ALA (α -linoleik asit) metabolizması [1]

İnsan metabolizması diyetle alınan ALA'nın %5-10'unu EPA ve DHA'ya dönüştürebilmektedir. ALA'nın diğer ω -3 yağ asitlerine dönüşüm oranı cinsiyete göre farklılık göstermektedir. Sağlıklı erkeklerde dönüşümlerin doğurganlık çağındaki kadınlarda göre 2.5 kat daha az olduğu bildirilmiştir [18].

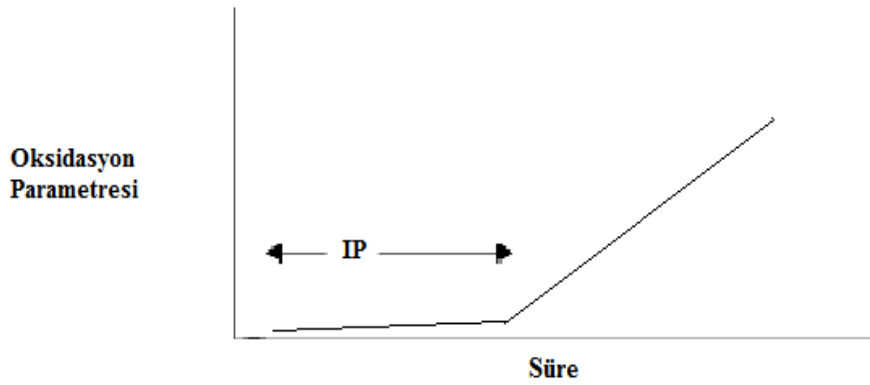
Yapılan bazı çalışmalarda ω -3 yağ asitlerinin kan kolesterolünü düşürücü etki gösterdiği ve kalp-damar hastalıkları sonucu gerçekleşen ölüm oranlarını azalttığı bildirilmektedir [19]. Bununla birlikte romatizmanın, bazı kanser türlerinin önlenmesi ve yeni doğanlarda beyin ve sinir sistemi gelişimi bakımından da ω -3 yağ asitlerinin önem arz ettiği bilinmektedir [20].

1.2. Lipid Oksidasyonu ve Oksidatif Stabilite

Oksidatif stabilite, yağların depolama ve işlenme sırasında oksidasyona karşı gösterdiği dirençtir. Oksidasyon reaksiyonlarındaki ani hızlanma (indüksiyon) veya tat ve aromada meydana gelen hızlı değişimlere kadar geçen sürenin uzunluğu oksidatif stabilite hakkında bilgi vermektedir. Oksidatif stabilite yağların raf ömrünü belirlemede önemli bir gösterge olmasının yanında genellikle oksidasyon için geçen sürenin uzunluğunu ifade etmektedir [21].

Birçok gıda maddesi yağ içerdiğinden dolayı gıda bozulmalarının en önemli sebeplerinin başında lipid oksidasyonu gelmektedir. Lipid oksidasyonu, kısaca atmosferden gelen oksijenin doymamış yağ asitlerine bağlanmasıyla stabil olmayan ara ürünlerin oluşması ve bu ara ürünlerin sonradan parçalanarak arzu edilmeyen aroma ve tat bileşenlerine dönüşmesi şeklinde özetlenebilir [22].

Gıdalardaki yağların oksidasyona uğramasıyla genellikle başlangıçta oksidasyonun çok az düzeyde gerçekleştiği bir indüksiyon periyodu görülür ve bu aşamayı bozulmanın hızla ilerlediği bir basamak takip eder (Şekil 1.4). İndüksiyon periyodunun uzunluğunu demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi bazı metaller pro-oksidan etki göstererek kısaltırken, α - tokoferol gibi antioksidan etki gösteren maddeler önemli ölçüde uzatmaktadır. Yağların indüksiyon periyodu, bu yağların içerdiği antioksidan bileşiklerle doğrudan ilgilidir. Aynı bileşime sahip iki yağdan, antioksidanlarca zengin olanının indüksiyon periyodunun daha uzun olduğu bilinen bir gerçektir. Bu antioksidanların, yağın raf ömrünü arttırmasının yanında, bu yağı tüketen insanların sağlığı açısından da önemi büyüktür. Ayrıca sıcaklığın artmasıyla da yağın bozulma hızı önemli ölçüde artmaktadır [22].



Şekil 1.4. Lipit oksidasyonu sırasında indüksiyon periyodunu (IP) gösteren değişim eğrisi [22]

Lipid oksidasyonu otooksidasyon olarak da adlandırılmaktadır. Bunun temel nedeni, yağların havadaki oksijenle genellikle herhangi bir dış katalizöre ihtiyaç duymadan kendiliğinden reaksiyona girme kabiliyetlerinden kaynaklanmaktadır [23]. Doymamış yağlardaki çift bağlar ısı, ışık, metal, oksijen veya enzim varlığında okside olarak serbest radikalleri oluşturmaktadır. Radikaller, eşleşmemiş elektronlarını verme bakımından çok reaktif oldukları için yakınında bulundukları organik moleküllerle kolayca reaksiyona girebilmekte ve bu molekülleri radikal forma geçirebilmektedirler. Çoklu doymamış yağ asitleri çift bağlar içerdiklerinden dolayı, oksidasyona doymuş

yağ asitlerine göre daha elverişlidirler. Bunun nedeni hidroksil radikali gibi radikalik bir yapının yağ molekülünden hidrojen koparmak için enerjisi düşük bağları seçmesidir. Çift bağlarda hidrojenin karbonla yaptığı bağın enerjisi tekli bağlara göre düşük olduğundan dolayı, doymamış yağ asitlerinin oksidasyona yatkınlığı daha fazladır [24].

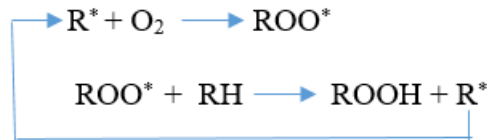
Genel olarak otooksidasyon başlangıç, gelişim ve sonlanma diye üç aşamadan oluşan zincirleme bir reaksiyondur. Otooksidasyonu basamaklarını incelersek:

Başlangıç (Initiation) aşaması;



X^* başlatıcı bir faktördür ve doymamış lipitten (RH) hidrojen molekülünü ayırarak lipid radikali (R^*) oluşturur. X^* başlatıcı faktörü metal iyonu, yüksek enerjili ışın etkisi, fotolizle oluşan bir radikal ya da var olan hidroperoksit ($ROOH$) ayrışmasıyla oluşan bir radikal olabilir [25].

Gelişim (propagation) aşaması;



Oluşan lipid alkil radikali (R^*), moleküler oksijenle (O_2) hızla reaksiyona girerek peroksil radikalini (ROO^*) oluşturur. Oluşan bu radikal de doymamış lipide (RH) etki ederek hidroperoksitleri ($ROOH$) ve bir alkil radikalini oluşturur. Bu basamakta yeniden oluşan alkil radikali moleküler oksijenle tekrar tepkimeye girer ve bu döngü böylece devam eder. Reaksiyonun bu şekilde tekrar etmesi sonucu hidroperoksitlerin oluşumu giderek artar. Lipid oksidasyonu sonucu oluşan birincil bozulma ürünleri hidroperoksitlerdir. Hidroperoksitlerin parçalanması sonucunda aldehitler, ketonlar, alkoller ve asitler gibi ikincil bozulma ürünleri oluşur. Oluşan bu bileşenler yağlı gıdaların bozulması sırasında lezzetin değişimine neden olan etmenlerin başında gelmektedirler [26].

Sonlanma (termination) aşaması;



Oluşan iki radikal birbirleri ile reaksiyona girerek radikal olmayan ürünler oluştururlar ve böylece serbest radikal zinciri sonlanır. Bir antioksidan ile serbest radikal etkileşerek stabil bileşik üretebilir ve serbest radikal zincir reaksiyonunu sonlandırabilir [26].

1.2.1. Lipid oksidasyonu belirleme testleri

Lipitlerde ve lipit içeren gıdalarda meydana gelen oksidasyonu belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bazı analizlerin detayları aşağıda verilmiştir.

1.2.1.1. Peroksit sayısı

Peroksit sayısı, yağlarda birincil oksidasyon ürünleri olan hidroperoksitlerin belirlenmesinde kullanılan yaygın spektrofotometrik bir yöntemdir. Bu yöntemin temel prensibi hidroperoksitlerin iyodürü iyodine çevirmesi sonucu açığa çıkan iyodinin de tiyosülfatla titre edilmesine dayanır [27]. Peroksit sayısı, hidroperoksitlerin miktarını “mili eşdeğer gram oksijen/kg yağ” cinsinden vererek ölçen bir yöntemdir. Bu yöntem ortamdaki oksijen, demir, ısı ve ışıktan önemli derecede etkilenmektedir. Bu yüzden temiz kaplarla ve uygun ortamlarda çalışmak gerekmektedir. Peroksit sayısını belirlemek için daha hassas ve farklı metodlar geliştirilmiştir. Bu metodlardan biri ferrik tiyosiyanat metodudur. Bu metodun temel prensibi ise Fe^{+2} iyonlarının ortamdaki hidroperoksitlerle reaksiyonu sonucu oluşan Fe^{+3} iyonlarının ölçülmesine dayanır. Bu metod iyodimetrik yöntemle göre daha hassas ve daha az örnek gerektirir [23].

1.2.1.2. TBA değeri

Tiyobarbütirik asit değeri, yağlarda ikincil oksidasyon ürünleri olan malondialdehitlerin (MDA: $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$) ölçülmesinde en sık kullanılan en eski yöntemdir. Bu yöntemin ilkesi çoklu doymamış lipid peroksitlerinin sıcaklık etkisiyle parçalanması sonucu oluşan malonaldehitlerin TBA ile reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturmaya dayanır. Oluşan bu renkli kompleks spektrofotometre ile belirlenebilir ve 530-532 nm'de en yüksek absorpsiyonu verir. TBA değeri, malonaldehitlerin miktarını “mili eşdeğer gram MDA/kg yağ” cinsinden ifade eder [28].

1.3. Antioksidanlar

Serbest radikallerin oluşumunu önleyen, radikallerle reaksiyona girerek oksidasyonun ilerlemesini ve zarar vermesini engelleyen kimyasal maddelere antioksidan denir [29]. Antioksidanlar aynı zamanda şelat yapabilme özelliğine sahip, rejenere edilebilen, hem sıvı ortamda hem de membranda görev alabilen maddelerdir [30]. Özellikle yağların oksidasyonu sırasında indüksiyon periyodu denilen süreçte, yağların ana bileşenleri (özellikle yağ asitleri) yerine, okside olarak tahrip olan ve yağın ana bileşenlerini koruyan maddelerdir [31].

Antioksidanlar vücutta üretilbildikleri gibi dışarıdan da alınabilirler. Bitki, sebze ve meyvelerde bulunan polifenolik yapıları moleküller düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyerek antioksidan etki gösterir. Gıdalarla alınan antioksidanlar sayesinde radikallerin sebep olduğu birçok hastalıktan korunmak mümkündür [29].

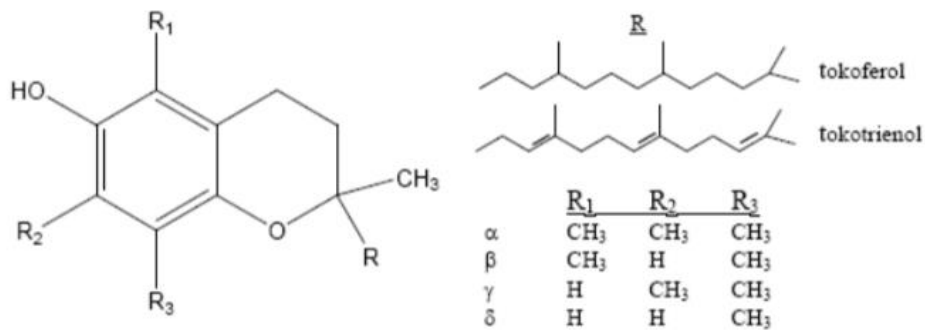
Bitkisel yağlar, doğal olarak oksidatif bozulmaları geciktiren antioksidan olarak adlandırılan bileşikler içerirler. Bu bileşikler, yağların gerek bitki dokusunda iken gerekse de ekstrakte edildikten sonra oksidatif bozulmalara maruz kalmasını önlemektedir. Bitki dokusunda iken yağlar hem non-polar hem de polar antioksidanlar tarafından korunur. Ekstraksiyon işleminden sonra ise ekstraksiyon tekniğine bağlı olarak bitkide bulunan antioksidanların bir kısmı yağa geçer ve koruma burada da devam eder. Ancak bu koruma sınırsız değildir. Gerek yağların işlenmesi gerekse de oksidasyon koşulları, yağ içerisinde bulunan antioksidan bileşiklerin zamanla parçalanmasına, farklı formlara dönüşmesine ve dolayısıyla da antioksidan etkilerinin

kaybolmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı da endüstriyel olarak işlenen yağlara genellikle dışarıdan antioksidan madde takviyesi yapılmaktadır. Antioksidanların yağlar üzerindeki koruyucu etkisinde, polarite bakımından çelişkili bir durum vardır. Yağlar apolar bileşikler olduğu için normalde polar antioksidan bileşiklere göre apolar yapıdaki antioksidan bileşiklerce daha iyi korunmaları beklenirken deneysel çalışmalar bunun tersini göstermiştir. Gallik asit ve askorbik asit gibi polar antioksidanlar yağları tokoferol ve BHA gibi apolar antioksidanlardan daha iyi korumaktadır. Yağ-su emülsiyonlarında ise apolar antioksidanlar polar olanlara nispeten daha iyi bir koruma sağlamaktadır [23].

Yemeklik yağlar doğal olarak tokoferoller, tokotrienoller, karotenoidler, fenolik bileşikler ve steroller gibi antioksidanlar içerir. Bazen antioksidanlar oksidatif stabiliteyi arttırmak için yağa kasıtlı olarak eklenirler [32].

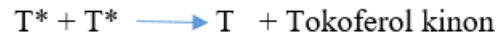
1.3.1. Tokoferoller ve tokotrienoller

Tokoferoller yağlarda doğal olarak bulunan antioksidan bileşiklerdir. Tokoferoller ve tokotrienoller genel olarak tokoller olarak adlandırılırlar. Şekil 1.5’de yağlarda yaygın olarak bulunan tokoferoller ve tokotrienoller gösterilmektedir. Tokoller olarak adlandırılan bu bileşiklerde, bir kromanol baş ve fitil kuyruk mevcuttur. Tokoferoller ile tokotrienoller arasında temel fark, tokotrienollerin fitil kuyrukta üç adet çift bağ içermesidir. Her iki grup da yapılarındaki kromanol halkasındaki 5, 7 veya 8 pozisyonlarına bağlanan grupların metil (CH₃) veya hidrojen (H) olmasına göre α , β , γ , δ olarak adlandırılırlar [33]. Tokoferoller ve tokotrienoller E grubu vitaminlerin konfügrasyonlarıdır.



Şekil 1.5. Tokoferollerin ve tokotrienollerin kimyasal yapısı [34]

Tokoferoller yağlarda bulunan önemli antioksidanlardır. Hayvansal yağlarda bulunan tokoferollerin miktarı bitkisel yağlara göre daha azdır. Bitkisel yağlar arasında soya, kanola, ayçiçeği ve mısır yağları diğer yağlara nisbeten yüksek miktarda tokoferol içerirler. Ayrıca tokoferoller çok iyi radikal süpürme ve lipid oksidasyonunu inhibe etme özelliğine sahiptirler. Aşağıda verilen reaksiyonlarda tokoferollerin oksidasyon basamakları gösterilmektedir [21].



Tokoferoller (T) antioksidan etki gösterirken kromanol halkasındaki bir hidrojenini lipid peroksil (ROO^*) radikaline vererek lipid hidroperoksit ($ROOH$) oluşturur. Lipid radikali stabil olurken kendisi tokoferoksil radikaline (T^*) dönüşmektedir. Oluşan bu yeni radikal, lipid radikaline göre oldukça kararlı olduğu için toplam radikal aktivitesi azalmaktadır. Tokoferoksil radikalleri lipid oksidasyon hızlarına bağlı olarak diğer bileşiklerle veya birbirleriyle etkileşime girebilirler. Tokoferoksil radikalleri düşük lipid oksidasyon hızlarında birbirleriyle reaksiyona girer ve tokoferol (T) ile tokoferol kinon oluşturur. Daha yüksek oksidasyon hızlarında tokoferoksil radikalleri (T^*) lipid peroksil radikalleri (ROO^*) ile reaksiyona girer ve tokoferol-lipid peroksi kompleksleri ($T-OOR$) oluşturur. Bunlar da tokoferol kinon ve lipid hidroperoksite hidrolize olur. Tokoferoksil radikali biyolojik sistemlerde ubikinon ve askorbik asit tarafından tekrardan tokoferole dönüştürülebilmektedir. Tokoferol kinon kararlı bir son üründür [32, 33].

Tokoferoller fizyolojik yönden antisterilite etkisine sahip olduklarından dolayı E vitaminleri olarak da bilinmektedir. Antioksidan etkileri, α -tokoferolden δ -tokoferole doğru artarken, fizyolojik etkileri tersi yönde artma göstermektedir [31]. Yani γ -tokoferolün *in vitro* antioksidan etkinliğinin diğer izomerlerden daha yüksektir. α -tokoferol ise beslenme açısından E vitamini aktivitesi yüksek olup *in vivo* antioksidan etkinliği diğer izomerlerinden daha yüksek olduğu bildirilmektedir [35].

Tokoferoller gıda, ilaç ve kozmetik sanayiinde kullanılan önemli katkı maddeleridir [36]. Gıdaları muhafaza etmekle birlikte hastalıkları önlemede de önemli roller oynamaktadır. Tokoferoller, karaciğerdeki kolesterol üretimini azaltmakta,

vücudun bağışıklık sistemini güçlendirmekte, hücrel yaşlanmayı azaltmakta ve kanserlere karşı koruma sağlamaktadır. Bununla birlikte, tokoferoller kalp hastalıklarını, alzheimer hastalığını ve eklem iltihabını önleyebilmektedir [37, 38].

1.3.2. Yağlarda toplam antioksidan kapasite testleri

Son yıllarda gıda maddelerinde antioksidan kapasite tayinleri çok yaygın olarak çalışılan bir konudur. Literatürde bu konuda yayımlanmış çok sayıda bilimsel çalışma mevcuttur ve bu çalışmalarda birbirinden farklı onlarca metod kullanılmaktadır. Belli bir metod tek başına her zaman tam ve yeterli bilgi veremediğinden dolayı birçok çalışmada birkaç farklı metod aynı materyal için kullanılmaktadır [23]. Antioksidan aktivite belirlemek için genellikle ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ve DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) yöntemleri kullanılmaktadır.

ABTS yöntemi, gıda örneklerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yöntemin prensibi; 660, 734 ve 820 nm'de maksimum absorpsiyon spektrumu gösteren ABST radikal katyonun absorbansının antioksidan tarafından inhibisyonuna dayanmaktadır

Uygulama kolaylığından dolayı ABTS yöntemi birçok bileşik ve gıda örneklerinin antioksidan kapasitesini araştırmak için sıklıkla kullanılmıştır. ABST radikal katyonunun biyolojik sistemlerde bulunmaması ve bu sistemlerdeki radikallere benzememesi de bir problemdir. Bunun yanında, bu yöntemin hem sulu hem de lipid fazlarda kullanılabilir olması, diğer bazı yöntemlere nisbeten hızlı olması gibi avantajları da bulunmaktadır. Orijinal ABTS yöntemi, bazı eksikliklerine rağmen fotokimyasalların antioksidan aktivitesi ile ilgili kullanışlı bilgi sağlamaktadır [39].

1.3.3. Yağların antioksidanlarca zenginleştirilmesi

Oksidasyon, genelde tüm yağlar özelde de çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olan yağlar için en önemli bozulma etmenlerinden biridir. Yağlar bir dizi zincirleme reaksiyon sonucu oksidasyona maruz kalabilmektedir. Bu reaksiyonlar sonucunda, yağın koku, tat, renk ve tekstürel özellikleri olumsuz yönde değişmekte ve aynı zamanda da insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen bazı bileşikler ortaya çıkmaktadır [40].

Oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleşme hızı yağın yağ asidi bileşimi ve içerdiği antioksidan maddelerin miktarı ile doğrudan ilgilidir. Dolayısıyla yağları, yağ asidi bileşiminde herhangi bir değişiklik yapmadan oksidasyon reaksiyonlarına karşı koruma yollarından biri dışarıdan antioksidan ilavesidir [9]. Bu antioksidanlar çoğunlukla non-polar özellikte olan yani yağda çözünen antioksidanlardır. BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanlar bu amaçla en yaygın kullanılan antioksidanlardır. Ancak bu sentetik antioksidanların kullanımının sebep olabileceği muhtemel toksitiden dolayı son yıllarda kullanımları azalmaktadır. Alternatif olarak tokoferoller gibi doğal antioksidanların kullanımı artmaktadır. Ancak yapılan çalışmalar polar antioksidanların bulk (emülsiyeye halde olmayan) yağların oksidasyonunu geciktirmekte non-polar antioksidanlara kıyasla daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu çelişkili durum “polar paradoks” olarak adlandırılmaktadır [10].

Yapılan çalışmalar yağlar içerisinde çok az miktarda su bulunduğunu ve bu suyun, yağın doğal yapısında bulunan mono ve digliseridler, fosfolipidler gibi yüzey aktif maddelerle çevrili halde olduğunu göstermiştir. Özellikle bu su fazında yoğunlaşmış halde bulunan metal iyonlarının lipid oksidasyonunu tetikleyen en önemli faktör olduğunu ve burada bulunacak polar antioksidanların lipid oksidasyon reaksiyonlarını yağ fazında bulunan non-polar antioksidanlara kıyasla daha etkili bir şekilde önleyeceğini göstermiştir. Özellikle yağ fazı ile su damlacıklarının temas ettiği yağ-su ara fazında lokalize olan antioksidanların çok daha etkin bir şekilde oksidasyonu engellediği görülmüştür [41].

1.3.4. Bitkilerin antioksidan özellikleri

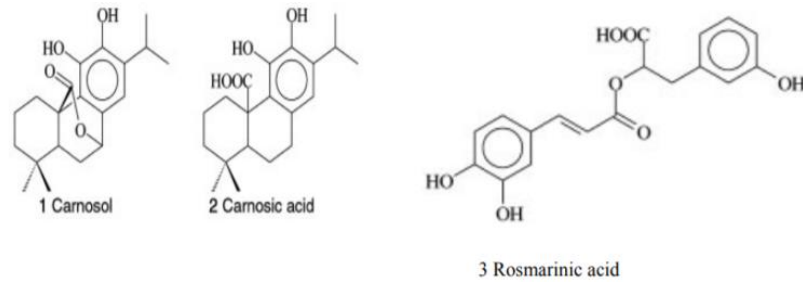
Yağların oksidasyonu, gıdaların tadında, kokusunda, görünüşünde ve dokusunda istenmeyen değişikliklere neden olur ve ayrıca yağda çözünen vitaminlerin miktarının azalmasına sebep olabilmektedir. Son yıllarda bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) gibi sentetik antioksidanlar yüksek oksidatif stabilitesi ve düşük maliyetlerinden dolayı lipidlerin oksidatif bozunmasını geciktirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, sentetik antioksidanların kullanımının insan sağlığı üzerine olumsuz etkileriyle ilgili endişeler gün geçtikçe giderek artmaktadır. Bu durum gıda endüstrisinde sentetik antioksidanların yerine bitkilerden elde edilen doğal antioksidan bileşiklerin kullanımını arttırmaktadır. Bitkiler insanlara önemli biyoaktif maddeleri sunan zengin kaynaklardır. Bu nedenle

farklı bitkilerden elde edilen ekstraktlar, yağ ve yağ içeren gıdaların kalitesini ve raf ömrünü geliştirmek için antioksidan olarak değerlendirilmektedir [8].

Biberiye, küçük iğne uçlu, yapraklı, 1-2 metre boyunda kışın yapraklarını dökmeyen aromatik bir bitkidir. İlkbahar ve yaz aylarında beyaz, açık mavi ve mavi renkli çiçekler açmaktadır. Yapraklarının tadı acımsıdır ve yapraklarından ve uçucu yağından yararlanılmaktadır [42].

Yapısındaki uçucu yağdan kaynaklanan hoş giden aromasından dolayı, Avrupa ve Kuzey Amerika ülkelerinde yaygın olarak kullanılan baharatlardan biridir. Gıdalarda antioksidan ve doğal koruyucu olarak kullanılmasının yanı sıra sabun, oda kokusu, deodorant, parfüm ve losyon yapımında da kullanılmaktadır. Esansiyel yağı ve ekstraktları et ürünlerinde, yağ içeren gıdalarda, yağlarda oksidasyona ve ransiditeye karşı kullanılabilir [42].

Antioksidan özelliği, yapısında bulunan rosmarinik asit, karnosol ve karnosik asitten kaynaklanmaktadır (Şekil 1.6). Karnosik asitin antioksidan özelliği BHT ve BHA'dan yedi kat, karnosoldan ise üç kat fazla olduğu bildirilmiştir [42].

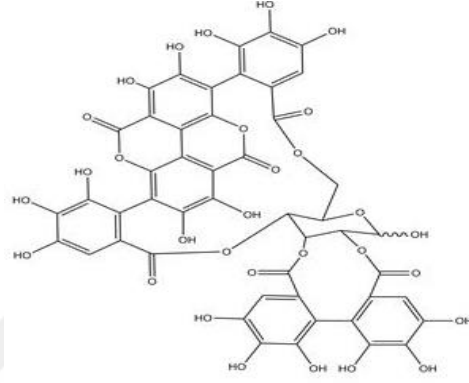


Şekil 1.6. Karnosol, karnosik asit ve rosmarinik asidin kimyasal yapısı [42].

Nar meyve olarak taze tüketilebildiği gibi sanayide işlenerek nar suyu, reçel, şarap ve nar ekşisi gibi çeşitli ürünler şeklinde de tüketilmektedir. Sanayide işlem gören meyvenin %50'si kabuk, posa ve çekirdek kısımlarından oluşmaktadır ve bu kısımları atık olarak ayrılmaktadır. Kabuk kısmı meyvenin %33-40'ını oluşturmakla birlikte meyvenin cinsine göre değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda nar kabuğunun fenolik madde ve diyet lifi başta olmak üzere insan sağlığı açısından değerli bileşenlerce zengin olduğu bilinmektedir [43].

Nar kabuğu ekstraktının toplam fenolik, flavonoid ve proantosiyanidin içeriğinin daha fazla olması nedeniyle antioksidan aktivitesinin nar posasından daha

yüksek olduğu bildirilmektedir. Nar kabuğundaki hidrolize tanenlerden olan punikalaginin (Şekil 1.7) serbest radikallerin uzaklaştırılmasında ve lipid oksidasyonun önlenmesinde oldukça güçlü etkiye sahip olduğu ve ayrıca kabukta α ve γ -tokoferolün önemli düzeyde bulunduğu bildirilmektedir. Nar kabuğunda bulunan polifenoller, serbest radikalleri tutarak, oksidanlara bir hidrojen atomu aktararak serbest radikalleri kararlı hale getirerek ve metal şelatları oluşturarak lipid oksidasyonunu engellemektedir [44].

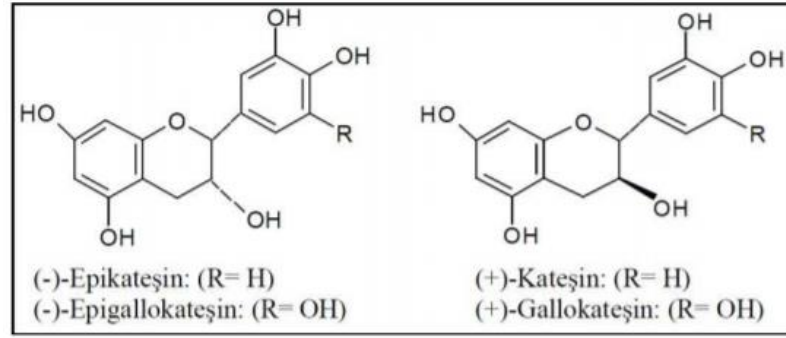


Şekil 1.7. Punikalaginin kimyasal yapısı [45]

Üzüm çekirdeği; meyve suyu, şarap ve pekmez üretiminde açığa çıkan bir atık olup, üzümün meyvesinden sonra fenolik bileşikler ve antioksidan özelliği bakımından besin değeri en zengin kısımdır [46].

Üzüm çekirdeğinin bileşiminde; kateşin, epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin, gallik asit, prosiyanidin dimerler, trimerler ve daha yüksek polimerize prosiyanidinler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda üzüm çekirdeğinde kateşinin (monomerik flavan-3-ol) en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşik olduğunu, miktarının üzümlerin cinslerine göre 62.8 ile 206 $\mu\text{g/g}$ arasında değiştiği ve üzüm çekirdeklerinin içerdiği proantosiyandinlerin, C vitamininden 50 kat, E vitamininden ise 20 kat, daha güçlü bir antioksidan olduğunu bildirilmektedir. Türkiye'de yetiştirilen farklı çeşitlerdeki kırmızı ve beyaz üzüm çekirdeklerinin toplam fenolik madde miktarının 4778.6 mg/100 g ile 13000 mg/100 g Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) arasında değiştiği bildirilmektedir. Üzümde bulunan toplam polifenollerin %60-70'ini üzüm çekirdeğinde bulunan fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Üzüm çekirdeği, kabuğuna göre çok daha fazla oranda flavanol içermekte olup, miktarı üzümün yetiştirildiği iklime ve bölgeye göre değişmektedir. Bu nedenle bu yan ürün insan sağlığı açısından

oldukça faydalı olup doğal antioksidan kaynağı ve gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır [46, 47].



Şekil 1.8. Kateşin, epikateşin, epigallokateşin ve gallokateşinin kimyasal yapıları [48]

1.4. Emülsiyonlar

Emülsiyonlar, birbiriyle karışmayan iki sıvının birinin diğeri içinde damlacıklar halinde dağılmasından oluşmuş, termodinamik olarak stabil olmayan homojen görünüşlü heterojen sistemlerdir [49]. Emülsiyonlar temel olarak biri hidrofilik diğeri lipofilik özellikte olan iki sıvı fazdan ve bu fazlar arasındaki yüzey gerilimini düşüren, ara yüzeyde film oluşturan emülgatörden oluşmaktadır. Bu sistemlerde, dağılan damlacıkları oluşturan sıvı faz iç faz (dağılan/dispers faz), bu damlacıkları taşıyan sıvı faz ise dış faz (sürekli faz) olarak adlandırılmaktadır. Emülgatörler yardımıyla iç fazın dış faz içinde damlacıklar halinde homojen olarak dağıtılması sağlanabilmektedir. Ayrıca, emülsiyonların fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kararlılığını artırmak için koruyucu maddeler, kullanım amacına göre de tat ve koku düzenleyiciler ilave edilebilmektedir [50].

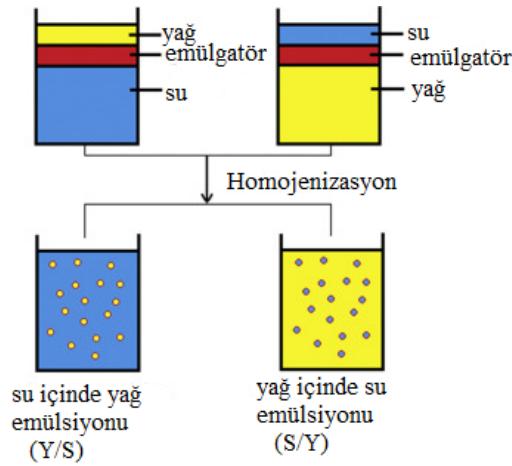
Emülsiyonlar fazlarına göre Y/S (su içinde yağ) ve S/Y (yağ içinde su) tipi emülsiyonlar olarak sınıflandırılmaktadır. Eğer emülsiyon, yağ damlacıklarını su içinde içeriyorsa Y/S emülsiyonu ve su damlacıklarını yağ içinde içeriyorsa S/Y emülsiyonu olarak tanımlanmaktadır (Şekil 1.9). Ayrıca, Y/S (su içinde yağ) ve S/Y (yağ içinde su) tipi emülsiyonlar geleneksel emülsiyonlar olarak adlandırılmaktadır. Bu emülsiyonlarda yağ ve su fazı her zaman tek bileşen değildir aynı zamanda her faz yardımcı maddeleri de içerebilir [49]. Gıdalarda Y/S emülsiyonlarına süt, mayonez, çorba, et ürünleri, kahve kreması, salata sosu; S/Y emülsiyonlarına margarin, tereyağı örnek verilebilir [51].

Çoklu (multiple) emülsiyonlar, emülsiyonların emülsiyonu olarak tanımlanan karmaşık sistemlerdir. S/Y/S veya Y/S/Y olmak üzere iki tipte hazırlanabilen ve dispers faz içinde dış faz ile aynı yapıya sahip daha küçük damlacıkların dağıldığı emülsiyon sistemleridir. Sistemde iki emülsiyon bulunduğundan dolayı çift emülsiyonlar olarak da bilinirler. En iç faz ile en dış faz birbiri ile karışabilen iki farklı maddeden olabileceği gibi, aynı maddeden de oluşabilirler.

Çoklu emülsiyonların üstünlükleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- ✓ Etkin madde çevresel faktörlerden korunabilmektedir.
- ✓ Birbiriyle geçimsiz bileşiklerin farklı fazlara konularak tek bir preparatta bir araya getirilebilmesi mümkün olmaktadır.
- ✓ Etkin maddelerin kontrollü ve sürekli salımı sağlanabilmektedir.
- ✓ Veziküler sistemler olduklarından dolayı hedefleme amacıyla kullanılabilmektedirler.

Ayrıca çoklu emülsiyonların, fiziksel ve termodinamik olarak stabil olmamaları, hazırlanmalarının zor ve üretimlerinin tekrarlanabilir olmaması ve salınım mekanizmalarının tam olarak anlaşılmamış olması gibi dezavantajlarından dolayı endüstride büyük ölçekli üretimleri sınırlıdır [52].



Şekil 1.9. Y/S (su içinde yağ) ve S/Y (yağ içinde su) tipi emülsiyonların oluşumunun şematik gösterimi [53]

Emülsiyonlar farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrisinde doğal olarak bulunmalarının yanı sıra belirli işlemler sonucunda da üretilmektedirler. Alkolsüz içecekler, süt, krema, sıvı ve toz salata sosları, mayonez, hazır çorbalar, çözeltiler, tereyağı ve margarin, dondurma gibi doğal ve işlenmiş gıdaların birçoğu, kısmen veya tamamen emülsiyonlardan oluşturmaktadır. Emülsiyon bazlı gıda ürünleri görünüm, tat ve aroma, tekstür ve raf ömrü gibi fizikokimyasal ve duyuşal özellikler bakımından farklılık gösterirler. Bu çeşitlilik, farklı türlerdeki gıda bileşenlerinden ve istenilen son ürünün karakteristik özelliklerini sağlamak için kullanılan işleme yönteminden kaynaklanmaktadır. Arzu edilen kalite özelliklerine sahip emülsiyon bazlı gıda ürünlerinin üretimi, en uygun kaliteli hammaddenin (su, yağ, emülsifiye edici ve koyulaştırıcı ajanlar, mineraller, asitler, vitaminler, aromalar, renk maddeleri) ve işleme koşullarının (karıştırma, homojenizasyon, pastörizasyon) seçimine bağlıdır [54].

Emülsiyonlar partikül aralığına göre; mikroemülsiyonlar, nanoemülsiyonlar ve makroemülsiyonlar olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak emülsiyonların literatürde net şekilde ifade edilmiş partikül aralığı mevcut değildir. Çeşitli kaynaklara göre tanımlanmaya çalışılan mikroemülsiyon, nanoemülsiyon ve makroemülsiyon partikül özellikleri hakkında derlenmiş literatür verilerine ait çizelge aşağıda verilmiştir [55].

Çizelge 1.2. Partikül çaplarına göre emülsiyonlar [55]

Makroemülsiyon	Nanoemülsiyon	Mikroemülsiyon	Referanslar
-	20-200 nm	-	[56]
-	50-1000 nm	-	[57]
0.2-10 µm	20-200 nm	5-100 nm	[58]
-	< 500 nm	-	[59]
-	20-200 nm	-	[60]
1-100 µm	50-200 nm	< 100 nm	[61]
20-200 µm	-200	4-100	[62, 63]
> 200 µm	< 200 nm	< 100 nm	[64]
1-100 µm	20-500 nm	10-100 nm	[65]

Emülsiyon damlacık boyutu; kullanılan emülgatör çeşidine (en önemli parametre) ve konsantrasyonuna, dispers-sürekli faz konsantrasyonuna, sıcaklığa ve emülsiyon viskozitesine bağlıdır [51].

Makroemülsiyonlar büyük boyutlu emülsiyon damlacıklarından oluşan, genel olarak mekanik kuvvet uygulanarak üretilen damlacıkların ortalama yarıçapları 100 nm ile 1000 µm arasında olan emülsiyonlardır. Makroemülsiyonlar termodinamik olarak stabil değildirler ve zamanla emülsiyon kırılması gerçekleşerek iki faz birbirinden ayrılmaktadır. Nanoemülsiyonlar ise makroemülsiyonlara kıyasla daha küçük emülsiyon damlacıklarından oluşan, yarıçapı yaklaşık 10 nm ile 100 nm arasında olan emülsiyonlardır. Nanoemülsiyonların partikül boyutları makroemülsiyonlara göre daha küçük olması onların kinetik olarak daha stabil olmasını sağlamaktadır. Ancak, bu tür emülsiyonlar hala termodinamik olarak stabil değildirler ve faz ayırımına meyillidirler. Mikroemülsiyonlar partikül yarı çapları 2-50 nm arasında olan emülsiyonlardır. Mikroemülsiyonlarda birleştirmeyi sağlayacak serbest enerji, hazırlandığı fazları oluşturan bileşiklerinkinden daha düşük olduğu için yalnızca karıştırma ile kendiliğinden oluşurlar; bu sebeple termodinamik olarak stabildirler [55].

Çevresel koşulların (sıcaklık, kompozisyon) değişmesiyle mikroemülsiyonlarda termodinamik stabilite azalmakta, mikroemülsiyon; nanoemülsiyona, makroemülsiyona, sıvı kristal sisteme veya iki faza ayrılmış sisteme dönüşmektedir. Fakat çevresel koşullar eski haline geldiğinde tekrar mikroemülsiyona dönüşmektedirler. Mikroemülsiyonların arayüzey gerilimi düşük olduğu için damlacık şekilleri elips veya küresel şeklindedir [51].

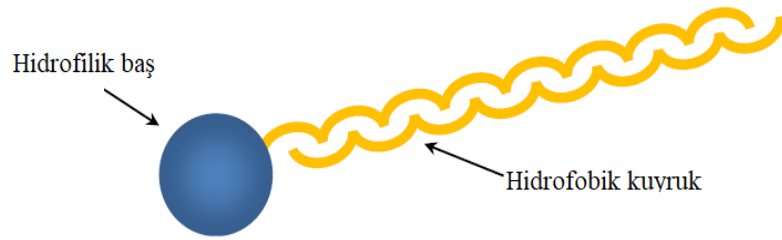
Mikroemülsiyonların oluşabilmesi için aşağıda verilen üç önemli koşul gerekmektedir. Bunlar:

- 1) Yağ ve suyun birbiri içinde kendiliğinden karışarak emülsifiye olabilmesi için yağ-su ara yüzeyindeki gerilimin çok düşük olması (103 N/m'den küçük) gerekmektedir.
- 2) Sürfaktanın konsantrasyonu optimum olmalıdır.
- 3) Mikroemülsiyonun dayanıklılığını arttırmak için ara yüzey akıcı ve esnek olmalıdır [49].

1.4.1. Emülgatörler (yüzey aktif maddeler)

Emülgatör maddeler su içinde yağ veya yağ içinde su emülsiyonlarını stabilize etmek için kullanılan hem hidrofilik, hem de hidrofobik kısımları içeren moleküllerdir [49].

Emülsiyonlar serbest enerjilerini ve arayüzey alanını azaltmak için iki faza ayrılmaya meyillidirler diğer bir deyişle termodinamik olarak dayanıklı değildirler. Uzun vadeli stabil emülsiyonlar oluşturmak için emülgatörlere ihtiyaç vardır [66]. Yüzey aktif maddeler emülsiyon damlacıklarının, emülsiyon oluşumu sırasında bir araya gelip topaklanmasını önleyen, yağ ve su ara yüzeyi arasındaki ara yüzey gerilimini azaltan ve böylece faz ayrımını engelleyen maddelerdir. Yüzey aktif maddeler faz ayrımını engellemenin yanı sıra yağlarda ransiditenin başlamasını engellemektedirler [51].



Şekil 1.10. Yüzey aktif maddelerin şematik gösterimi [66]

Yüzey aktif maddeler, hidrofilik (suyu seven) gruplarının yükleri açısından, molekülün yüzey aktif kısmıyla taşınan yüke göre 4 ana gruba ayrılırlar. Bunlar;

- ✓ Katyonik: baş grup negatif yüklü,
- ✓ Anyonik: baş grup pozitif yüklü
- ✓ Zwitteriyonik: hem pozitif hem negatif yüke sahip
- ✓ Noniyonik: baş grup yüksüz (yükü sıfır) [66, 67].

Çizelge 1.3. Bazı yüzey aktif maddelerin kimyasal yapısı ve sınıfı [68]

Sınıf	Örnekler	Yapısı
Anyonik	Na sitrat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-\text{Na}^+$
	Na dodesil sülfat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
	Na dodesil benzen sülfonat	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_4^-\text{Na}^+$
Katyonik	Laurilamin hidroklorit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$
	Trimetil dodesilamonyum klorit	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
	Ketil trimetilamonyum bromit	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$
Non-iyonik	Polioksietilen alkol	$\text{C}_8\text{H}_{2n+1}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m\text{OH}$
	Alkilfenol etoksilat	$\text{C}_9\text{H}_{19}-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_8\text{OH}$
Zwitteriyonik	Dodesil betain	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$
	Lauramidopropil betain	$\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^-$

Yüzey aktif maddeler ayrıca hidrofil-lipofil dengesi (HLB) değerlerine göre de tanımlanabilmektedirler. HLB değeri, yüzey aktif maddenin yağ fazına veya sulu faza genel eğilimini göstermektedir. Belirli bir yüzey aktif maddenin HLB değeri, emülgatör molekülünün hidrofilik ve hidrofobik bölgelerine göre de hesaplanabilmektedir [66].

$$\text{HLB} = 7 + \Sigma (\text{hidrofilik grup numarası}) - \Sigma (\text{lipofilik grup numarası})$$

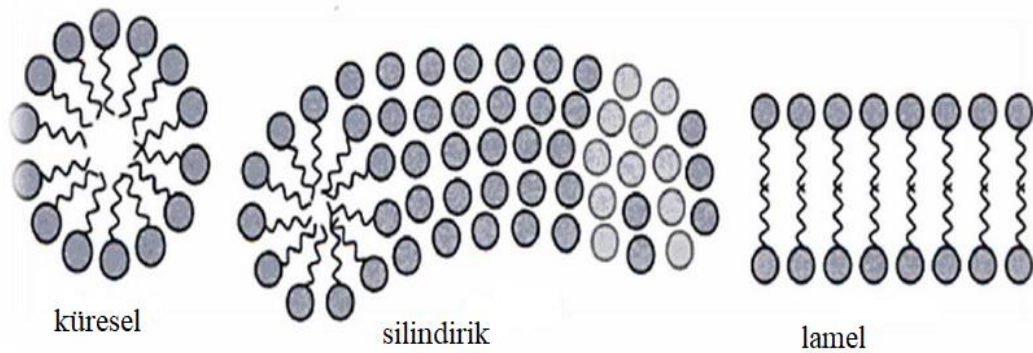
Yüksek HLB (10-18) değerine sahip bir yüzey aktif madde çoğunlukla hidrofiliktir, suda çözünür ve su içinde iyi bir yağ dengeleyici olarak işlev görür. Düşük HLB değerine (3-6) sahip bir yüzey aktif madde esas olarak hidrofobiktir, yağda çözünür ve yağ içinde su emülsiyonlarını stabilize eder. Orta HLB değerine (7-9) sahip bir yüzey aktif madde, hem yağ hem de suya özel bir afiniteye sahip değildir ve iyi bir ıslatıcı madde olarak görev yapar. Bancroft'a göre, yüzey aktif maddenin en fazla çözünür olduğu faz, bir emülsiyonun sürekli fazını oluşturacaktır [66].

Miseller, ortamda yeterli miktarda yüzey aktif madde bulunduğunda yüzey aktif madde moleküllerinin kendiliğinden bir araya gelmesi sonucu oluşan, termodinamik olarak stabil kolloidal kümelerdir. Miseller 50-100 monomer içerirler ve tipik olarak küreseldirler. Bununla birlikte, yüzey aktif madde konsantrasyonu arttıkça başka biçimlerde de (silindirik, lameller) bulunabilirler (Şekil 1.11)

Çizelge 1.4. Bazı yüzey aktif maddelerin HLB değerleri [68]

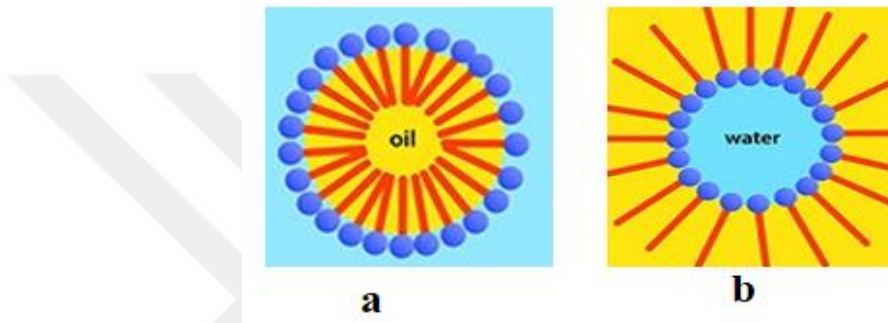
Yüzey aktif madde	HLB
Oleik asit	1
Sorbitan tristearat (SPAN 65)	2
Sorbitan monooleat (SPAN 80)	4
Dietilen glikol monolaurat	6
Sorbitan monolaurat (SPAN 20)	9
Gliserol monostearat	11
Polioksietilen (10) ketil eter (BRIJ 56)	13
Polioksietilen sorbitan monooleat (TWEEN 80)	15
Sodyum oktadekanoat	18
Sodyum dodekanoat	21
Sodyum oktanoat	23
Dioktil sodyum sulfosukinat	32
Sodyum heptadesil sulfat	38
Sodyum dodesil sulfat	40
Sodyum oktil sulfat	42

Miseller, yüzey aktif maddelerin non-polar kuyrukları ile su molekülleri arasındaki elverişsiz teması azaltma eğiliminden dolayı oluşmaktadırlar. Misel oluşumunun başladığı yüzey aktif madde konsantrasyonuna kritik misel konsantrasyonu (CMC) denir. CMC'nin altında yüzey aktif madde ara yüzeyde emilme eğiliminde olur ve arayüzey gerilimi azalır. Yüzey aktif madde molekülleri miseller oluşturma eğiliminde olduklarından dolayı yüzey aktif madde konsantrasyonu arttıkça bu ara yüzler doymuş hale gelir. CMC'nin üstünde monomer konsantrasyonunu değiştirmez, bu nedenle arayüzey gerilimi daha fazla azalmaz [66].



Şekil 1.11. Yüzey aktif maddelerin misel oluşum şekilleri [66].

Yüzey aktif maddeler moleküllerinde taşıdıkları polar (hidrofilik) ve non-polar (hidrofobik) gruplar nedeniyle bulundukları ortamların polaritesine bağlı olarak ara yüzeylerde misel ve ters misel oluşturmaktadırlar. Ters miseller non-polar ortamlardaki küresel miseller olarak tanımlanmaktadır. Ortam su olduğunda yüzey aktif madde moleküllerinin hidrofilik grupları su ile hidrofobik uçları ise birbirleri ile temasta olacak şekilde kümelenmektedirler. Bu küresel yapıya misel denilmektedir. Ancak çözücü non-polar bir madde (yağ) olduğunda moleküllerin hidrofobik uçları ortama doğru yönelirken hidrofilik uçları misellerin iç kısmında kümelenirler. Bu tip misellere ise ters misel denilmektedir (Şekil 1.12) [69].



Şekil 1.12. Misel (a) ve ters misel (b) şekilleri

Ters miseller, genelde yüksek oranda yüzey aktif madde kullanılarak az miktarda suyun, yağ fazında uzun süre karıştırma sonucunda dağıtılması yoluyla elde edilmektedirler. Yüzey aktif madde miktarı arttırıldığında yağa eklenebilen su miktarı da arttırılabilmektedir. Ancak kritik bir eşik (CMC) aşıldıktan sonra yapıdaki mikroemülsiyon kırılmakta ve klasik emülsiyona dönüşmektedir [70].

Emülgatör seçiminde dikkat edilmesi gereken faktörler:

Emülgatör seçimi başarılı bir emülsiyon hazırlanmasındaki en önemli parametrelerden biridir. Emülgatör seçiminde, emülsiyonun tipi, raf ömrü ve emülgatörün maliyeti dikkate alınmaktadır.

Emülgatörde bulunması gereken özellikler:

- ✓ Polar ve polar olmayan uçlara sahip olmalı
- ✓ Yüzeyi etkin olmalı ve yüzey/arayüzey gerilimini düşürmeli
- ✓ Düşük miktarlarda bile emülsiyon oluşturabilmeli
- ✓ Yüzeyler arası film oluşturmali ve damlacıkların bir araya gelmesine engel olmalıdır [50].

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yağların oksidasyonu, gıdaların tadında, kokusunda, görünüşünde ve dokusunda istenmeyen değişikliklere neden olmaktadır. Son yıllarda bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) gibi sentetik antioksidanlar yüksek antioksidan gücü ve düşük maliyetlerinden dolayı lipidlerin oksidatif bozunmasını geciktirmede yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, sentetik antioksidanların kullanımının insan sağlığı üzerine olumsuz etkileriyle ilgili endişeler gün geçtikçe giderek artmaktadır. Bu durum gıda endüstrisinde sentetik antioksidanların yerine bitkilerden elde edilen doğal antioksidan bileşiklerin kullanılmasını arttırmaktadır. Bitkiler insanlara önemli biyoaktif maddeleri sunan zengin kaynaklardır. Bu nedenle farklı bitkilerden elde edilen ekstraktlar yağ ve yağ içeren gıdaların kalitesini ve raf ömrünü geliştirmek için antioksidan olarak değerlendirilmektedir [8].

Tabar ve Baştürk [8], yaptıkları çalışmada 7 farklı bitki ekstraktının (biberiye, zencefil, yeşil çay, ısırgan otu, okaliptüs, sumak ve sarımsak) ayçiçek yağında oksidasyonu engelleme performanslarını araştırmışlardır. Bitki ekstraktları ilave edilmiş yağ örnekleri, 25, 50 ve 75°C’lerde 21 gün boyunca hızlandırılmış oksidasyona tabi tutulup, depolama öncesi, 7., 14. ve 21. günlerde numuneler alınarak peroksit değeri, malondialdehit, konjuge dien ve konjuge trien miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Özellikle birincil oksidasyon ürünlerinin oluşumunu geciktirmede biberiye ekstraktı, sumak ekstraktı ve ısırgan ekstraktı referans antioksidan olarak kullanılan BHT’in, α -tokoferol ve askorbil palmitat kadar etkili olduğu gözlemlenirken; ikincil oksidasyon ürünleri oluşumunu geciktirmede ise ekstraktlardan biberiye, sumak ve zencefil ekstraktlarının etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Negi, Jayaprakasha [71], farklı solventler (etil asetat, aseton, metanol ve su) kullanarak elde ettikleri nar kabuğu ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. Bu amaçla elde ettikleri nar kabuğu ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri BHT ile karşılaştırılmıştır. Metanol ile ekstrakte edilmiş nar kabuğu ekstraktının 50 mg/kg’lık düzeyinin antioksidan özelliğinin BHT’ye göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Yalçın ve ark. [72], üzüm çekirdeği ve üzüm çekirdeği yağının yağ asidi bileşimi, uçucu bileşenler, fizikokimyasal ve biyoaktif özelliklerini tanımlamak amacıyla

yaptıkları çalışmada 5 farklı üzüm çekirdeğinden aseton: su (90:10) karışımı ile elde ettikleri ekstraktların mısır yağının oksidatif stabilitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Üzüm çekirdeği ekstraktları (2000 ppm) eklenen örneklerin kontrol (mısır yağı) örneğine kıyasla indüksiyon periyotlarının daha uzun olduğu ve dolayısıyla üzüm çekirdeği ekstraktlarının mısır yağının oksidatif stabilitesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Üzüm çekirdeklerinin gıda ürünlerinin ve sağlık takviyelerinin korunmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Rababah ve ark. [73], ÜÇE'nin mısır cipslerinin depolama sırasında fizikokimyasal ve duyu özellikleri üzerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Farklı konsantrasyonlarda BHT ve ÜÇE içeren mısır cipsleri 90 gün süresince depolayarak lipid oksidasyonunu ve antioksidan aktivitesini belirlemeye çalışmışlardır. Oksidatif stabilite cihazı ile ölçülen indüksiyon periyotları ÜÇE için 1.6-9.3 saat arasında değişirken BHT için 18.8 saat olduğunu gözlemlemişlerdir. ÜÇE'nin düşük konsantrasyonlarının (200 ppm) peroksit sayısını arttırdığı gözlemlenirken, yüksek konsantrasyonlarının (400 ve 800 ppm) peroksit sayısını arttırmadığını gözlemlemişlerdir. ÜÇE ekstrüde mısır cipslerini korumak için doğal bir antioksidan olarak kullanım potansiyeline sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Sultana ve ark. [74], farklı agro atıklarından elde edilen ekstraktlardan mısır yağının stabilizasyonu üzerine antioksidan potansiyelinin araştırmışlardır. %80'lik metanol ile ekstrakte edilen agro atıkları (nar kabukları, elma kabukları, muz kabukları, turuncgil kabukları, mısır koçanı, buğday kabuğu, pirinç kepeği ve pirinç kabuğu) 600 ppm konsantrasyonda mısır yağına ilave edilerek 30 gün boyunca 60°C'de hızlandırılmış oksidasyona tabi tutmuşlardır. Belirli periyotlarla peroksit sayısı (PV), konjuge dienler (CD), konjuge trienler (CT) ve *p*-anisidin analizlerini yapmışlardır. Kontrol örneğinin tüm örneklerle kıyasla en yüksek peroksit sayısı (PV), konjuge dienler (CD), konjuge trienler (CT) ve *p*-anisidin değerine sahip olduğu gözlemlenirken; en düşük peroksit sayısı (PV), konjuge dienler (CD), konjuge trienler (CT) ve *p*-anisidin değerlerine sahip örneğin nar kabuğu ekstraktı içeren numune olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yeşilsu ve Özyurt [75], sprey kurutma yoluyla mikrokapsüle edilmiş biberiye, kekik ve defne ekstraktlarının balık yağının oksidatif stabilitesi üzerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. 250 ppm BHT, 1000 ve 15000 ppm biberiye, kekik ve

defne ekstraktı bulunan ve herhangi bir antioksidan bulunmayan balık yağı örnekleri 23°C, 40°C ve 60°C'lerde oksidasyona bırakarak belirli aralıklarda peroksit sayısı ve TBARS sayısı değerlerini belirlemişlerdir. 1500 ppm biberiye ekstraktı bulunan mikroenkapsüle edilmiş balık yağının peroksit sayısının 250 ppm BHT bulunan numunelerden daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca 1000 ve 1500 ppm biberiye ve 1500 ppm defne ekstraktı bulunan numunelerin TBARS sayısı değerlerinin kontrol örneğinden daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Iqbal ve ark. [76], metanol ile ekstrakte edilmiş NKE'lerinin hızlandırılmış şartlarda ayçiçek yağının oksidatif stabilitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. 250, 500 ve 1000 ppm nar kabuğu ekstraktı, 200 ppm BHT ilave edilen ayçiçek yağı numuneleri ve hiçbir antioksidan ilave edilmeyen kontrol örneklerini 65°C'de 4 gün boyunca oksidasyona bırakarak belirli periyotlarda peroksit değeri (PV), konjuge dienler (CD), konjuge trienler (CT) ve tiyobar bütirik asit reaktif maddelerin (TBARS) miktarını gözlemlemişlerdir. Numuneler arasında en yüksek stabiliteyi 1000 ppm NKE içeren numunede olduğunu gözlemlemişlerdir. Diğer numunelerin oksidatif stabilitesi ise 1000 ppm NKE > BHT > 500 ppm NKE > 250 ppm NKE > kontrol şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Altunkaya ve ark. [77], ÜÇE ile zenginleştirilmiş mayonezin oksidasyon kararlılığı ve kimyasal güvenilirliğini araştırmışlardır. Mayoneze %0.050, %0.10 ve %0.15 oranında ÜÇE ilave edilerek 8 hafta boyunca oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletmişlerdir. Belirli aralıklarla mayonezlerin oksidatif stabilitesi, lipid hidroperoksitlerin içeriği (peroksit değeri), konjuge dien hidroperoksitlerin içeriği ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin içeriğini (TBARS) belirlemişlerdir. En yüksek antioksidan kapasite ve en düşük lipid hidroperoksit ve TBARS içeriği %0.15 ÜÇE bulunan örnekte olduğunu tespit etmişlerdir.

Sekretar ve ark. [78], biberiye ve ladin kabuğu ekstraktlarının karanlıkta ve gün ışığında bekletilen ayçiçeği ve kanola yağların oksidatif stabilitesi üzerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. %0.01 oranında biberiye ve ladin kabuğu ekstraktı ilave edilen ve herhangi bir antioksidan bulunmayan kontrol örneği hem gün ışığında hem de karanlıkta şişelerde depolamışlardır. 7 haftalık depolama sonunda karanlıkta depolanan yağların gün ışığında depolanan yağlardan daha düşük peroksit sayısı değerine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca biberiye ekstraktı bulunan

örneklerin çoğu durumda ladin ekstraktı bulunan ve herhangi bir antioksidan bulunmayan örneklerle kıyasla lipid oksidasyonunu geciktirdiğini tespit etmişlerdir.

Souza ve ark. [79], doğal ve sentetik antioksidanların chia tohumu yağının oksidatif stabilitesi üzerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Bu amaçla chia tohumu yağlarına sentetik ve doğal antioksidanlardan 200 ppm (mg kg^{-1}) ilave edilerek ransimat cihazıyla indüksiyon periyodları belirlenmiştir. Biberiye ekstraktı bulunan numunenin (1.53 saat) kontrol numunesine (1.25 saat) kıyasla indüksiyon periyodunu arttırdığı belirlenirken; en yüksek indüksiyon periyodu gösteren numunenin 200 ppm biberiye ekstraktı+ tert-butilhidrokinon (TBHQ) antioksidan karışımı ilave edilen numunelerde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 200 ppm α - tokoferol ilave edilen numunenin de indüksiyon periyodunu arttırdığı gözlemlenmiştir.

Qiu ve ark. [80], biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) ekstraktının balık yağı ile zenginleştirilmiş inek ve soya sütlerindeki lipidlerin oksidatif stabilitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Biberiye ekstraktı bulunan balık yağı ile zenginleştirilmiş inek ve soya sütü numuneleri 2°C'de depolanarak belli aralıklarla peroksit sayısı ve hekzanal analizleri ile lipid oksidasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. Biberiye ekstraktının balık yağı ile zenginleştirilmiş inek ve soya sütlerinde lipid oksidasyonunu inhibe ettiği gözlemlenirken; biberiye ekstraktının balık yağı ile zenginleştirilmiş inek sütünün oksidatif stabilitesini balık yağı ile zenginleştirilmiş soya sütünden daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Shan ve ark. [81], peynirdeki *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella enterica*'ya karşı beş baharat ve bitki ekstraktlarının (tarçın çubuğu, kekik, karanfil, nar kabuğu ve üzüm çekirdeği) antibakteriyel etkinliğini araştırmışlardır. Baharat ve bitki ekstraktları ile muamele edilen peynir örneklerini oda sıcaklığında oksidasyona bırakarak periyodik olarak peynir örneklerinin lipid oksidasyonunu belirlemek amacıyla oksidatif analizler yapmışlardır. Oksidasyon sonunda beş bitki ekstraktının da, peynirdeki gıda kaynaklı üç patojene karşı etkili olduğunu ve bu bitki ekstraktlarının peynirin lipid oksidasyonuna karşı stabilitesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Bu bitkiler arasında en yüksek antibakteriyel ve antioksidan aktiviteyi karanfilin gösterdiğini gözlemlenmiştir.

3. MATERİYAL METOD

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan keten tohumu (*Linum usitatissimum*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*), üzüm çekirdeği (*Vitis vinifera*) ve nar (*Punica granatum*) Malatya ilindeki yerel marketlerden temin edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Kullanılan tüm kimyasallar Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Farklı firmalardan satın alınan kimyasalların temin edildiği firma parantez içerisinde ifade edilmiştir. Bu tez çalışmasında; metanol, kloroform, izopropil alkol, dietil eter, hegzan, potasyum persülfat, ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)), fenolftaleyn, KOH (potasyum hidroksit), amonyum tiyosiyanat (NH_4SCN), demir klorür (FeCl_2), PGPR (poligliserol polirisinolat), heptan, gallik asit, hidroklorik asit, TCA (triklorasetik asit), TBA (tiyobarbütirik asit), BHT (bütil hidroksi tolueen), etanol, tokoferol seti (α , β , γ , δ) kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan alet, ekipman ve cihazlar

Bu çalışma kapsamında santrifüj (Heraeus Sepatech, Almanya), etüv (Nüve, Almanya), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), rotary evaporatör (Heidolph, Almanya), yüksek devirli parçalayıcı (Heidolph, Almanya), UV-VIS Çift Işın Yollu Spektrofotometre (UV-1800 SHIMADZU, Japonya), çalkalayıcı (DAIHAN SHO-2D, Kore), çok noktalı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya), saf su cihazı (GFL, typ 2004, Almanya), ultra saf su cihazı (Millipore,), liyofilizatör (Armfield,), öğütücü ve hassas terazi (Ohaus PA214C, USA), Malvern NanoZS (Malvern, Orsay, Fransa), ev tipi blender, ev tipi buzdolabı ve otomatik pipet seti kullanılmıştır.

Kromatografik analizler ise Gaz Kromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektör (Agilent GC-FID) ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (Shimadzu HPLC, Japonya) cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC analizlerinde amin kolon (inertsil, NH_2 bağlı 3 μm partikül çaplı, 4.6 x 250 mm, Japonya) kullanılırken; GC-FID analizinde DB-WAX kapiler (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm , Agilent) kolon kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Yağ eldesi

Yağ ekstraksiyonu soğuk presleme yöntemiyle yapılmıştır. Keten tohumu öğütücü ile öğütüldükten sonra bez torbalara tartılmış (100 g) ve el tipi hidrolik pres (Caselsan, Ordu) kullanılarak yağ sızdırılmıştır. Elde edilen yağdaki bulanıklığa neden olan bileşenler 6000 rpm’de 20 dk santrifüj edilerek giderilmiştir. Elde edilen berrak yağlar hemen kullanılmayacaksa derin dondurucuda -24°C’de azot atmosferinde saklanmıştır. Keten tohumu yağı her bir analiz öncesi buzluktan çıkartılarak oda koşullarında çözünmesi sağlanmıştır.

3.2.2. Yağ Analizleri

3.2.2.1. Yağ asidi bileşimi

Yağ asidi metil esterleri (FAMES) Turan ve ark. [82]’in uyguladığı metoda göre hazırlanmıştır. Kısaca, cam tüplere tartılan 100 mg yağ 10 mL hegzanda çözülmüş, üzerine metanolde hazırlanmış 2 N KOH çözeltisinden 100 µL eklenerek 20 sn vortekslenmiş ve 3000 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Üst kısımda bulunan hegzan fazı 0.45 µm PTFE (politetrafloroetilen) filtre ile süzölmüş ve GC cihazına verilmek üzere amber renkli cam viallere alınmıştır.

Keten tohumu yağının yağ asidi bileşimi GC-FID sistemi ile belirlenmiştir [83]. Yağ asitlerinin ayrılmasında DB-WAX kapiler (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film kalınlığı, Agilent) kolon kullanılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı (1 mL/dk akış hızında) kullanılmıştır. Alev iyonlaştırma dedektörü sıcaklığı 280°C ve enjeksiyon bloğu sıcaklığı 250°C olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 1 µm ve split oranı 1:50 oranında uygulanmıştır. Fırın sıcaklığı programı; 140°C’de 5 dk, 4°C/dk artışla 240°C ve bu sıcaklıkta 10 dk bekleyecek şekilde belirlenmiştir. Piklerin tanımlanmasında ise yağ asiti metil ester standart çözeltisi (Supelco grain fatty acid methyl ester mix) kullanılmıştır. Pik alanlarından yararlanılarak % oranları şeklinde yağ asitlerinin miktarı verilmiştir.

3.2.2.2. Tokoferol analizi

Keten tohumu yağının tokoferol bileşimi Yılmaz ve Durmaz [84], tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek belirlenmiştir. Tokoferol analizi için örnekler mobil faz içerisinde uygun oranda seyreltilerek 0.45 µm'lik PTFE filtreden süzölmüş ve HPLC cihazına verilmek üzere cam viallere alınmıştır. Enjeksiyon hacmi 10 µL, kolon sıcaklığı 30°C, akış hızı 1 ml/dk, DAD dedektörün dalga boyu 290 nm olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak %2 izopropil alkol içeren hekzan izokratik olarak amine bağı kolonda (Inertsil 250 × 4.6 mm, 5 µm) yürütölmüştür.

3.2.2.3. Toplam karotenoid analizi

Keten tohumu yağındaki toplam karotenoid miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir [85]. Yağ örnekleri hekzan:aseton (70:30) karışımında uygun oranda seyreltilerek UV-vis spektrofotometrede 450 nm'deki absorbansı çözöcö solösyonuna (hekzan:aseton (70:30)) karşı okunmuştur. β-karoten kullanılarak oluşturulan kalibrasyon grafiğı kullanılarak örneklerdeki toplam karotenoid miktarı mg/kg yağ olarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Bitki ekstraktlarının eldesi

Antioksidan etkisinin güçlü olduğı bilinen nar kabuğı, özüm çekirdeğı ve biberiye bitkilerinden ekstrakt elde etmek için çözöcö olarak ultra saf su kullanılmıştır. 10 g bitki materyali bir erlen içerisinde tartılmış ve üzerine 100 mL ultra saf su eklenerek yüksek hızlı homojenizatörde 30000 rpm'de 2 dk oda sıcaklığında parçalanmıştır. Elde edilen süspansiyon, Whatman No:1 filtre kâğıdından süzölmüştür. Süzöntüler plastik petri kaplarda -18°C'de dondurulmuş ve liyofilizatör cihazı ile 24 saat boyunca kurutulmuştur. Elde edilen toz ekstraktlar nem geçirmez kaplarda kullanılıncaya kadar -24°C'de saklanmıştır.

3.2.4. Bitki ekstraktlarında yapılan analizler

3.2.4.1. Toplam fenolik madde analizi

Toplam fenolik madde miktarı Folin&Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir [51]. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit cinsinden ifade edildiği için öncelikle gallik asit standardı hazırlanmıştır. Bu amaçla 100 mg gallik asit su içerisinde çözülerek hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu stoktan 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 µL alınarak tüplere konulmuş ve hacimleri saf su ile 1000 µL'ye tamamlanarak çalışma çözeltileri elde edilmiştir. Bitki ekstraktları bulunan çözeltilerden veya gallik asit çalışma çözeltilerinden 100 µL cam tüplere konulmuş ve hepsinin hacmi saf su ile 1000 µL'ye tamamlanmıştır. Her bir tüpe 1 mL 1:10 oranında su ile seyreltilmiş Folin&Ciocalteu reaktifi eklenmiş, daha sonra üzerine 1 mL %2'lik Na₂CO₃ eklenerek karıştırıldıktan sonra bu çözeltiler oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 750 nm'de Çift Işın yollu UV-VIS spektrofotometre ile saf suya karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Gallik asit standartları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla gerekli hesaplamalar yapılarak numunelerdeki toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.

3.2.4.2. Antioksidan aktivite analizi

Nar kabuğu, biberiye, üzüm çekirdeği ekstraktlarının antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi ile belirlenmiştir [51]. Bu amaçla bir miktar (5-10 mg) DPPH bir miktar metanolde çözülerek 520 nm'de absorbansı 0.700-0.800 civarında olacak şekilde %70'lik metanolde seyreltilmiştir. Antioksidan aktivite trolox cinsinden ifade edildiği için öncelikle trolox standardı hazırlanmıştır. Bu amaçla 50 mg trolox bir miktar metanol içerisinde çözülmüş ve metanol ile hacmi 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu stoktan 25, 50, 75, 100, 150, 200 µL alınarak tüplere konulmuş ve hacimleri %70 metanol ile 1000 µL'ye tamamlanarak çalışma çözeltileri elde edilmiştir. Bitki ekstraktları bulunan çözeltilerden, standart olarak gallik asit çözeltilerinden veya trolox çalışma çözeltilerinden 100'er µL tüplere alınmış ve her birinin üzerine 2.9 mL DPPH çözeltisi eklenerek karıştırılıp oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda 520 nm'de UV-VIS çift ışın yollu spektrofotometre ile metanole karşı absorbans değerleri ölçülmüştür. Trolox standartları ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımıyla gerekli hesaplamalar yapılarak numunelerdeki antioksidan aktivite Trolox eşdeğeri (TAEC) olarak ifade edilmiştir.

3.2.5. Emülsiyon hazırlama

Ters misellerin hazırlanması

Keten tohumu yağları cam viallere 9.5 g olacak şekilde tartılarak içerisine 0.5 g PGPR eklenmiştir. PGPR eklenen viallere 1 cm'lik magnetik barlar atılmış ve manyetik karıştırıcıda 500 rpm'de PGPR'ın tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

Antioksidanların ters misellere yüklenmesi

Hazırlanacak olan mikroemülsiyonlar için kullanılacak yüzey aktif madde ve su miktarı farklı oranlarda ön denemeler yapılarak belirlenmiştir. Yapılan ön denemeler ışığında 10 gramlık mikroemülsiyonun oluşturulabilmesi için kullanılabilecek en yüksek su miktarının 10 µL ve en düşük PGPR miktarının ise 0.5 g olduğu tespit edilmiştir.

Gallik asit, nar kabuğu, biberiye ve üzüm çekirdeği ekstraktlarına uygun miktarda ultra saf su eklenerek doymuş çözeltiler elde edilmiştir. Elde edilen doymuş çözeltiler 3500 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra üst fazdan 10 µL alınarak içerisinde keten tohumu ve PGPR bulunan viallere eklenmiştir.

Tokoferol ise keten tohumu yağı içerisinde çözülmüş ve bu stoktan seyreltme yapılarak istenen konsantrasyonda tokoferol-yağ karışımı elde edilmiş ve içerisine %5 PGPR ve 10 µL su eklenmiştir.

Elde edilen emülsiyonların tepe boşluğuna azot gazı enjekte edildikten sonra 500 rpm'de 24 saat boyunca kapakları kapalı şekilde manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakılmıştır. 24 saat sonrasında mikroemülsiyon hale getirilmiş yağ örnekleri 1 g olacak şekilde viallere tartılmış ve 50°C'ye ayarlanmış etüvde oksidasyona bırakılmıştır. Oksidasyona bırakılan örnekler belirli aralıklarla etüvden alınarak peroksit sayısı, tiyobarbitirik asit sayısı, antioksidan kapasite (ABTS) ve serbest yağ asidi analizleri yapılmıştır.

3.2.6. Partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümü

Partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümü, dinamik ışık saçılımı ilkesine dayanan Malvern NanoZS (Malvern, Orsay, Fransa) cihazı ile belirlenmiştir. Örnekler heptan, hekzan ve hekzadekan içinde 50-100 kat seyreltilerek cihaza verilmiştir. Keten tohumu yağı ve suyun 25°C sıcaklıktaki kırılma indisi ve viskoziteleri kullanılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.2.7. Oksidatif stabilite testleri

3.2.7.1. Peroksit sayısı

Peroksit sayısı, ferrik tiyosiyanat yöntemi ile belirlenmiştir [22]. Yöntemin ilkesi, NH_4SCN 'ın (amonyum tiyosiyanat) varlığında Fe^{+2} iyonlarının ortamdaki hidroperoksitlerle oksidasyonu sonucunda oluşan Fe^{+3} iyonlarının spektrofotometrik olarak belirlenmesine dayanmaktadır.

Mikroemülsiyeye hale getirilmiş yağ örneklerinden yaklaşık 25 mg alınıp 3 mL kloroformda tamamen çözölmüş, buradan 0.25 mL başka bir deney tüpüne alınarak metanol:kloroform (70:30 %) karışımı ile 4.9 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra 50 μL %30'luk NH_4SCN eklenerek karıştırılmış ve reaksiyon karışımına 50 μL %3.5'lik HCl 'de hazırlanmış FeCl_2 eklenerek reaksiyon başlatılmıştır (toplam hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır). Her bir örnek 20 dk reaksiyonun gerçekleşmesi için bekletilerek oluşan rengin absorbansı 500 nm'de çözücü solüsyonuna (metanol:kloroform (70:30 %)) karşı okunmuştur. Kümene hidroperoksit kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Sonuçlar, milieşdeğer (meq) peroksit/kg yağ cinsinden ifade edilmiştir.

3.2.7.2. Tiyobarbütirik asit sayısı

İkincil oksidasyon ürünleri modifiye TBARS metoduyla belirlenmiştir [86]. Buna göre yaklaşık 100 mg mikroemülsiyeye hale getirilmiş yağ 1 mL 2-propanolda tamamen çözülmüş ve üzerine 2 mL tiyobarbütirik asit (TBA) çözeltisi eklenmiştir. (TBA çözeltisi için 75 g triklorasetik asit (TCA), 1.88 g TBA, 414 g ultra saf su, 8.8 mL HCl (%37) ve %2'lik BHT (etanolda) karıştırılmış ve gerektiğinde ısıtılmıştır). Karışım 80°C'de 15 dk su banyosunda bekletildikten sonra çeşme suyunda 10 dk bekletilerek oda sıcaklığına soğutulmuştur. Organik fazı çöktürmek için karışımın bulunduğu tüplere 1 mL kloroform eklenmiş ve 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

Tüplerde üstte biriken sulu faz bir pastör pipeti ile alınarak 532 nm’de çözücü solüsyonuna (TBA çözeltisi) karşı absorbansı okunmuştur. TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) kullanılarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

3.2.8. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi

Emülsiyon örneklerine antioksidan eklendikten sonra ve oksidasyon sırasında gösterdikleri antioksidan kapasite değerleri FD-ABTS metoduyla belirlenmiştir [87]. Bu yöntem ile emülsiyon örneklerinde bulunan polar ve non-polar antioksidanların tamamının toplam antioksidan kapasiteye katkısı belirlenmiştir. Toplam antioksidan kapasite analizi için öncelikle FD-ABTS tozu elde edilmiştir. Bu amaçla 7 mM ABTS (2,20-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) radikali 2.45 mM persülfate çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti 16 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiş, süre sonunda petri kabının içerisine alınarak dondurulmuş ve daha sonra liyofilizatörde kurutularak FD-ABTS tozu elde edilmiştir. Bu toz metanol:kloroform (1:1) karışımında çözülerek absorbansı 752 nm’de 0.700 ± 0.005 ’e ayarlanmıştır (Bu çözelti analizden hemen önce hazırlanmıştır). 100 mg emülsiyon örneği 1 mL metanol:kloroform (1:1) karışımında çözülmüş ve üzerine 2 mL FD-ABTS radikal çözeltisi eklenmiştir. Her bir örnek 6 dk reaksiyonun gerçekleşmesi için bekletilerek oluşan rengin absorbansı 752 nm’de çözücü solüsyonuna (metanol: kloroform (1:1)) karşı okunmuştur. Kalibrasyon grafiği α -tokoferol kullanılarak oluşturulmuştur.

3.2.9. Serbest yağ asitliği analizi

Bu analiz American Oil Chemists' Society (AOCS International)’nin belirlediği standart metoda göre yapılmıştır [88]. Bu amaçla, yaklaşık 2.5 g emülsiyon tartılmış ve 50 mL etanol:dietileter (1:1) karışımında çözülmüştür. Üzerine 3-4 damla fenolftaleyn indikatörü damlatılmış ve etanol ile hazırlanan 0.5 N KOH ile titre edilmiştir. Kalıcı pembe renk elde edilince kadar titrasyon işlemine devam edilmiş ve harcanan sarfiyat not edilmiştir. Aşağıda verilen formüle göre serbest yağ asitliği hesaplanmıştır.

$$\% \text{Serbest Asitlik} = \frac{V \times M \times N}{10 \times P} \quad (3.1)$$

V = Harcanan etanollü KOH (mL)

N = KOH'in normalitesi

M = İfade edilecek asit cinsinden molekül ağırlığı (g)

P = Alınan örnek ağırlığı (g)

3.3. İstatistiksel Analizler

Her bir analiz en az 2 tekrarlı olarak yapılmış ve elde edilen sonuçların istatistiksel analizi 'SPSS 21.0 for Windows' paket programıyla değerlendirilmiştir. Sonuçlar arasındaki farkların önem düzeyi “One-way ANOVA (Analysis of variances)” testi ve “DUNCAN” post-hoc testiyle belirlenmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak önem düzeyleri a, b, c...şeklinde harflendirilerek belirtilmiştir. Bu harfler Duncan testinde oluşan grup sayısına göre, en düşük değerden başlayarak en yüksek değere doğru belirlenmiştir. Eğer herhangi bir sonuç aynı anda iki grupta yer almışsa, bu sonuç “ab” “bc” gibi bir indisle gösterilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Yağ Analizleri

4.1.1. Yağ asidi bileşimi

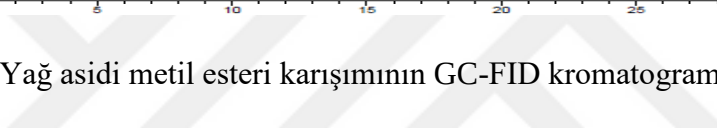
Yağ asidi analizinde dış standart olarak kullanılan yağ asidi metil ester karışımı ve keten tohumu yağına ait GC-FID kromatogramları sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.

Keten tohumu yağında başlıca 5 çeşit yağ asidi tespit edilmiştir. Bu verilere göre keten tohumu yağında en yüksek oranda bulunan yağ asidinin %55 oranı ile linolenik asit (C18:3) olduğu belirlenmiştir. Oleik asit (C18:1) yaklaşık %18, linoleik asit (C18:2) ise %16 civarında olduğu gözlemlenirken; stearik asit (C18:0) yaklaşık %4, palmitik asit (C16:0) ise %5 civarında olduğu tespit edilmiştir. Keten tohumu yağının yağ asidi dağılımı büyükten küçüğe doğru; linolenik asit >oleik asit >linoleik asit >palmitik asit >stearik asit şeklinde olduğu belirlenmiştir.

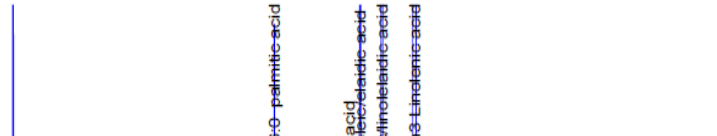
Çizelge 4.1. Keten tohumu yağının % yağ asidi bileşimi (% $\pm$ s) (n=2)

Yağ Asidi Bileşimi		% oran
Palmitik asit	(C16:0)	5.49 $\pm$ 0.05
Stearik asit	(C18:0)	4.31 $\pm$ 0.08
Oleik asit	(C18:1)	18.29 $\pm$ 0.08
Linoleik asit	(C18:2)	16.02 $\pm$ 0.04
Linolenik asit	(C18:3)	55.90 $\pm$ 0.11

Choo ve ark. [89], yedi farklı keten tohumu yağı kullanarak soğuk preslenmiş keten tohumu yağlarının fizikokimyasal ve kalite özelliklerinin araştırmışlardır. Keten tohumu yağlarında yapılan yağ asidi bileşimi analizinde en yüksek oranda bulunan yağ asidinin %51.80-60.42 aralığında değişen linolenik asit olduğu, bunu takiben en yüksek oranda bulunan diğer yağ asitlerinin ise oleik asit veya linoleik asit olduğu bildirilmiştir.



Yağ asidi metil esteri karışımının GC-FID kromatogramı



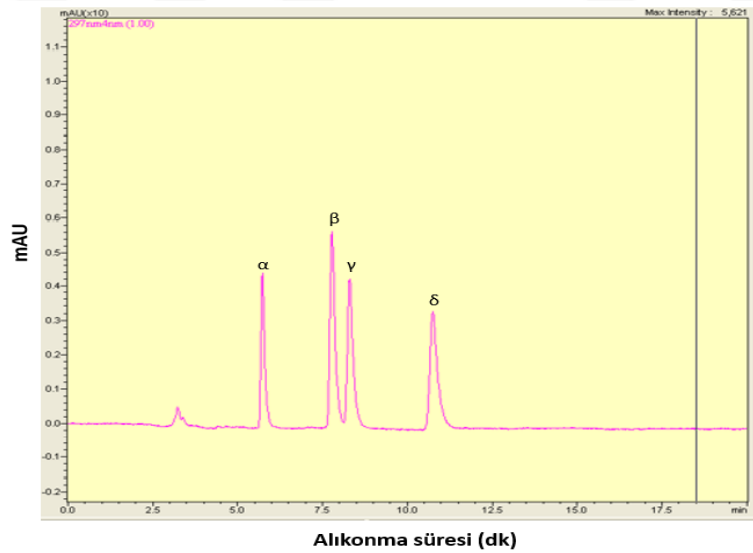
10:0- palmitic acid
11:0- heptadecanoic acid
12:0- stearic acid
13:0- tridecanoic acid
14:0- myristic acid
15:0- pentadecanoic acid
16:0- palmitic acid
17:0- heptadecanoic acid
18:0- stearic acid
18:1- octadecenoic acid
18:2- octadecadienoic acid
18:3- octadecatrienoic acid
19:0- nonadecanoic acid
20:0- eicosanoic acid
20:1- eicosenoic acid
20:2- eicosadienoic acid
20:3- eicosatrienoic acid
20:4- eicosatetraenoic acid
20:5- eicosapentaenoic acid
21:0- heneicosanoic acid
22:0- docosanoic acid
22:1- docosenoic acid
22:2- docosadienoic acid
22:3- docosatrienoic acid
22:4- docosatetraenoic acid
22:5- docosapentaenoic acid
23:0-tricosanoic acid
24:0- tetracosanoic acid
24:1- tetracosenoic acid
24:2- tetracosadienoic acid
24:3- tetracosatrienoic acid
24:4- tetracosatetraenoic acid
24:5- tetracosapentaenoic acid
24:6- tetracosahexaenoic acid
25:0- pentacosanoic acid
26:0- hexacosanoic acid
26:1- hexacosenoic acid
26:2- hexacosadienoic acid
26:3- hexacosatrienoic acid
26:4- hexacosatetraenoic acid
26:5- hexacosapentaenoic acid
26:6- hexacosahexaenoic acid
27:0- heptacosanoic acid
28:0- octacosanoic acid
28:1- octacosenoic acid
28:2- octacosadienoic acid
28:3- octacosatrienoic acid
28:4- octacosatetraenoic acid
28:5- octacosapentaenoic acid
28:6- octacosahexaenoic acid
29:0- nonacosanoic acid
30:0- triacosanoic acid
30:1- triacosenoic acid
30:2- triacosadienoic acid
30:3- triacosatrienoic acid
30:4- triacosatetraenoic acid
30:5- triacosapentaenoic acid
30:6- triacosahexaenoic acid
31:0- triacosanoic acid
32:0- tetracosanoic acid
32:1- tetracosenoic acid
32:2- tetracosadienoic acid
32:3- tetracosatrienoic acid
32:4- tetracosatetraenoic acid
32:5- tetracosapentaenoic acid
32:6- tetracosahexaenoic acid
33:0- pentacosanoic acid
34:0- hexacosanoic acid
34:1- hexacosenoic acid
34:2- hexacosadienoic acid
34:3- hexacosatrienoic acid
34:4- hexacosatetraenoic acid
34:5- hexacosapentaenoic acid
34:6- hexacosahexaenoic acid
35:0- heptacosanoic acid
36:0- octacosanoic acid
36:1- octacosenoic acid
36:2- octacosadienoic acid
36:3- octacosatrienoic acid
36:4- octacosatetraenoic acid
36:5- octacosapentaenoic acid
36:6- octacosahexaenoic acid
37:0- nonacosanoic acid
38:0- triacosanoic acid
38:1- triacosenoic acid
38:2- triacosadienoic acid
38:3- triacosatrienoic acid
38:4- triacosatetraenoic acid
38:5- triacosapentaenoic acid
38:6- triacosahexaenoic acid
39:0- tetracosanoic acid
40:0- pentacosanoic acid
40:1- pentacosenoic acid
40:2- pentacosadienoic acid
40:3- pentacosatrienoic acid
40:4- pentacosatetraenoic acid
40:5- pentacosapentaenoic acid
40:6- pentacosahexaenoic acid
41:0- hexacosanoic acid
42:0- heptacosanoic acid
42:1- heptacosenoic acid
42:2- heptacosadienoic acid
42:3- heptacosatrienoic acid
42:4- heptacosatetraenoic acid
42:5- heptacosapentaenoic acid
42:6- heptacosahexaenoic acid
43:0- octacosanoic acid
44:0- nonacosanoic acid
44:1- nonacosenoic acid
44:2- nonacosadienoic acid
44:3- nonacosatrienoic acid
44:4- nonacosatetraenoic acid
44:5- nonacosapentaenoic acid
44:6- nonacosahexaenoic acid
45:0- triacosanoic acid
46:0- tetracosanoic acid
46:1- tetracosenoic acid
46:2- tetracosadienoic acid
46:3- tetracosatrienoic acid
46:4- tetracosatetraenoic acid
46:5- tetracosapentaenoic acid
46:6- tetracosahexaenoic acid
47:0- pentacosanoic acid
48:0- hexacosanoic acid
48:1- hexacosenoic acid
48:2- hexacosadienoic acid
48:3- hexacosatrienoic acid
48:4- hexacosatetraenoic acid
48:5- hexacosapentaenoic acid
48:6- hexacosahexaenoic acid
49:0- heptacosanoic acid
50:0- octacosanoic acid
50:1- octacosenoic acid
50:2- octacosadienoic acid
50:3- octacosatrienoic acid
50:4- octacosatetraenoic acid
50:5- octacosapentaenoic acid
50:6- octacosahexaenoic acid
51:0- nonacosanoic acid
52:0- triacosanoic acid
52:1- triacosenoic acid
52:2- triacosadienoic acid
52:3- triacosatrienoic acid
52:4- triacosatetraenoic acid
52:5- triacosapentaenoic acid
52:6- triacosahexaenoic acid
53:0- tetracosanoic acid
54:0- pentacosanoic acid
54:1- pentacosenoic acid
54:2- pentacosadienoic acid
54:3- pentacosatrienoic acid
54:4- pentacosatetraenoic acid
54:5- pentacosapentaenoic acid
54:6- pentacosahexaenoic acid
55:0- hexacosanoic acid
56:0- heptacosanoic acid
56:1- heptacosenoic acid
56:2- heptacosadienoic acid
56:3- heptacosatrienoic acid
56:4- heptacosatetraenoic acid
56:5- heptacosapentaenoic acid
56:6- heptacosahexaenoic acid
57:0- octacosanoic acid
58:0- nonacosanoic acid
58:1- nonacosenoic acid
58:2- nonacosadienoic acid
58:3- nonacosatrienoic acid
58:4- nonacosatetraenoic acid
58:5- nonacosapentaenoic acid
58:6- nonacosahexaenoic acid
59:0- triacosanoic acid
60:0- tetracosanoic acid
60:1- tetracosenoic acid
60:2- tetracosadienoic acid
60:3- tetracosatrienoic acid
60:4- tetracosatetraenoic acid
60:5- tetracosapentaenoic acid
60:6- tetracosahexaenoic acid
61:0- pentacosanoic acid
62:0- hexacosanoic acid
62:1- hexacosenoic acid
62:2- hexacosadienoic acid
62:3- hexacosatrienoic acid
62:4- hexacosatetraenoic acid
62:5- hexacosapentaenoic acid
62:6- hexacosahexaenoic acid
63:0- heptacosanoic acid
64:0- octacosanoic acid
64:1- octacosenoic acid
64:2- octacosadienoic acid
64:3- octacosatrienoic acid
64:4- octacosatetraenoic acid
64:5- octacosapentaenoic acid
64:6- octacosahexaenoic acid
65:0- nonacosanoic acid
66:0- triacosanoic acid
66:1- triacosenoic acid
66:2- triacosadienoic acid
66:3- triacosatrienoic acid
66:4- triacosatetraenoic acid
66:5- triacosapentaenoic acid
66:6- triacosahexaenoic acid
67:0- tetracosanoic acid
68:0- pentacosanoic acid
68:1- pentacosenoic acid
68:2- pentacosadienoic acid
68:3- pentacosatrienoic acid
68:4- pentacosatetraenoic acid
68:5- pentacosapentaenoic acid
68:6- pentacosahexaenoic acid
69:0- hexacosanoic acid
70:0- heptacosanoic acid
70:1- heptacosenoic acid
70:2- heptacosadienoic acid
70:3- heptacosatrienoic acid
70:4- heptacosatetraenoic acid
70:5- heptacosapentaenoic acid
70:6- heptacosahexaenoic acid
71:0- octacosanoic acid
72:0- nonacosanoic acid
72:1- nonacosenoic acid
72:2- nonacosadienoic acid
72:3- nonacosatrienoic acid
72:4- nonacosatetraenoic acid
72:5- nonacosapentaenoic acid
72:6- nonacosahexaenoic acid
73:0- triacosanoic acid
74:0- tetracosanoic acid
74:1- tetracosenoic acid
74:2- tetracosadienoic acid
74:3- tetracosatrienoic acid
74:4- tetracosatetraenoic acid
74:5- tetracosapentaenoic acid
74:6- tetracosahexaenoic acid
75:0- pentacosanoic acid
76:0- hexacosanoic acid
76:1- hexacosenoic acid
76:2- hexacosadienoic acid
76:3- hexacosatrienoic acid
76:4- hexacosatetraenoic acid
76:5- hexacosapentaenoic acid
76:6- hexacosahexaenoic acid
77:0- heptacosanoic acid
78:0- octacosanoic acid
78:1- octacosenoic acid
78:2- octacosadienoic acid
78:3- octacosatrienoic acid
78:4- octacosatetraenoic acid
78:5- octacosapentaenoic acid
78:6- octacosahexaenoic acid
79:0- nonacosanoic acid
80:0- triacosanoic acid
80:1- triacosenoic acid
80:2- triacosadienoic acid
80:3- triacosatrienoic acid
80:4- triacosatetraenoic acid
80:5- triacosapentaenoic acid
80:6- triacosahexaenoic acid
81:0- tetracosanoic acid
82:0- pentacosanoic acid
82:1- pentacosenoic acid
82:2- pentacosadienoic acid
82:3- pentacosatrienoic acid
82:4- pentacosatetraenoic acid
82:5- pentacosapentaenoic acid
82:6- pentacosahexaenoic acid
83:0- hexacosanoic acid
84:0- heptacosanoic acid
84:1- heptacosenoic acid
84:2- heptacosadienoic acid
84:3- heptacosatrienoic acid
84:4- heptacosatetraenoic acid
84:5- heptacosapentaenoic acid
84:6- heptacosahexaenoic acid
85:0- octacosanoic acid
86:0- nonacosanoic acid
86:1- nonacosenoic acid
86:2- nonacosadienoic acid
86:3- nonacosatrienoic acid
86:4- nonacosatetraenoic acid
86:5- nonacosapentaenoic acid
86:6- nonacosahexaenoic acid
87:0- triacosanoic acid
88:0- tetracosanoic acid
88:1- tetracosenoic acid
88:2- tetracosadienoic acid
88:3- tetracosatrienoic acid
88:4- tetracosatetraenoic acid
88:5- tetracosapentaenoic acid
88:6- tetracosahexaenoic acid
89:0- pentacosanoic acid
90:0- hexacosanoic acid
90:1- hexacosenoic acid
90:2- hexacosadienoic acid
90:3- hexacosatrienoic acid
90:4- hexacosatetraenoic acid
90:5- hexacosapentaenoic acid
90:6- hexacosahexaenoic acid
91:0- heptacosanoic acid
92:0- octacosanoic acid
92:1- octacosenoic acid
92:2- octacosadienoic acid
92:3- octacosatrienoic acid
92:4- octacosatetraenoic acid
92:5- octacosapentaenoic acid
92:6- octacosahexaenoic acid
93:0- nonacosanoic

Keten tohumu yağı ile ilgili yapılan bir başka çalışmada [90], üç farklı keten tohumundan elde edilen yağların yağ asidi bileşimini incelenmiştir. Elde edilen verilerde üç farklı keten tohumu yağında da en yüksek oranda bulunan yağ asidinin linolenik asit olduğu ve linolenik asit içeriğinin sırasıyla %63.76, %56.93, %48.99 olduğu tespit edilmiştir. Keten tohumu yağının alfa-linolenik asit içeriği elde edildiği keten tohumunun türü veya yetiştirme koşullarına bağlı olarak farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

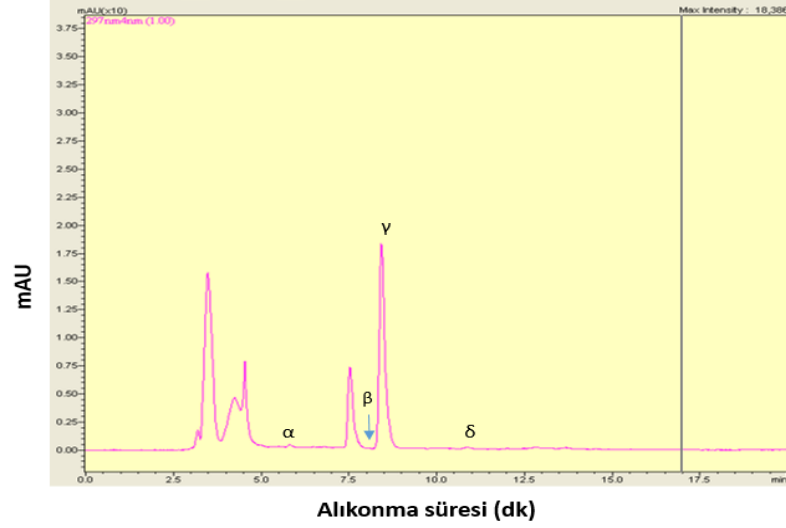
Keten tohumu yağı yüksek oranda alfa-linolenik asit içerdiğinden, başlıca omega-3 doymamış yağ asitlerinin bir kaynağıdır [91]. Doymamış yağ asitlerindeki çift bağlar çeşitli dış etkenlerin (sıcaklık, ışık, su, enzimler, oksijen ve iz elementler gibi) etkisiyle bozulmakta ve kolaylıkla okside olmaktadır [92]. Bu nedenle keten tohumu yağı oksidasyona karşı oldukça hassastır.

4.1.2. Tokoferol analizi

Keten tohumu yağı örneklerinde normal faz HPLC ile yapılan analizlerde tokoferol standartları ve örneklere ait kromatogram Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Tokoferol standartlarının normal faz HPLC ile elde edilen kromatogramı



Şekil 4.4. Keten tohumu yağının normal faz HPLC ile elde edilen tokoferol kromatogramı

Yapılan analizler sonucunda keten tohumu yağında en fazla γ -tokoferolün (399.1 ± 1.56 mg/kg) bulunduğu, α - (5.0 ± 1.14 mg/kg) ve δ -tokoferollerin (3.4 ± 0.56 mg/kg) iz miktarda, β -tokoferolün ise tespit edilmeyecek kadar düşük miktarda olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle β izomeri sonuçlarda verilmemiştir.

Mohanan ve ark. [93], keten tohumu yağının oksidatif stabilitesine hidrofilik, hidrofobik ve ara polaritede antioksidanlarının etkisinin araştırdıkları çalışmada, keten tohumu yağının tokoferol bileşimini belirlemeye çalışmışlardır. Sonuç olarak çalışmada kullanılan keten tohumu yağında en fazla bulunan tokoferolün γ -tokoferol (380 mg/kg) olduğu, α - , β -ve δ -tokoferollerin miktarının ise 10 mg/kg'dan daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Keten tohumu yağında yapılan başka bir çalışmada [90], kullanılan keten tohumu yağlarının γ -tokoferol içeriği sırasıyla 461.7 mg/kg, 555.3 mg/kg, 653.7 mg/kg; α - tokoferol içeriği sırasıyla 23.0 mg/kg, 7.8 mg/kg, 11.3 mg/kg ve δ -tokoferol içeriği ise sırasıyla 1.66 mg/kg, 8.0 mg/kg, 9.5 mg/kg olduğu bildirilmiştir. Çalışmada kullanılan keten tohumu yağlarının β - tokoferol içeriğine ise yer verilmemiştir.

Tokoferoller yağlarda bulunan önemli antioksidanlardır. Ayrıca tokoferoller çok iyi radikal süpürme ve lipid oksidasyonunu inhibe etme özelliğine sahiptirler [21]. Antioksidan etkileri, α -tokoferolden δ -tokoferole doğru artarken, fizyolojik etkileri tersi yönde artma göstermektedir [31]. γ -tokoferol yağlı tohumlar için en önemli antioksidan olarak bulunmaktadır [87]. Bu tez çalışması kapsamında da kullanılan keten tohumu yağında en yüksek oranda bulunan tokoferolün γ -tokoferol olduğu belirlenmiştir. Ayrıca keten tohumu yağı ile ilgili yapılan ve yukarıda ifade edilen çalışmalarda da benzer durum kaydedilmiştir. Keten tohumu yağının yüksek oranda linolenik asit içermesi düşük oksidatif stabiliteye sahip olmasına neden olurken, γ -tokoferol içeriğinin yüksek olması oksidatif stabilitesini arttırmaktadır.

4.1.3. Toplam karotenoid analizi

Keten tohumu yağındaki toplam karotenoid miktarı β -karoten cinsinden ifade edilmiştir. Yapılan analiz sonucunda keten tohumu yağındaki toplam karotenoid miktarı 12.09 ± 0.39 mg β -karoten/g yağ olduğu belirlenmiştir.

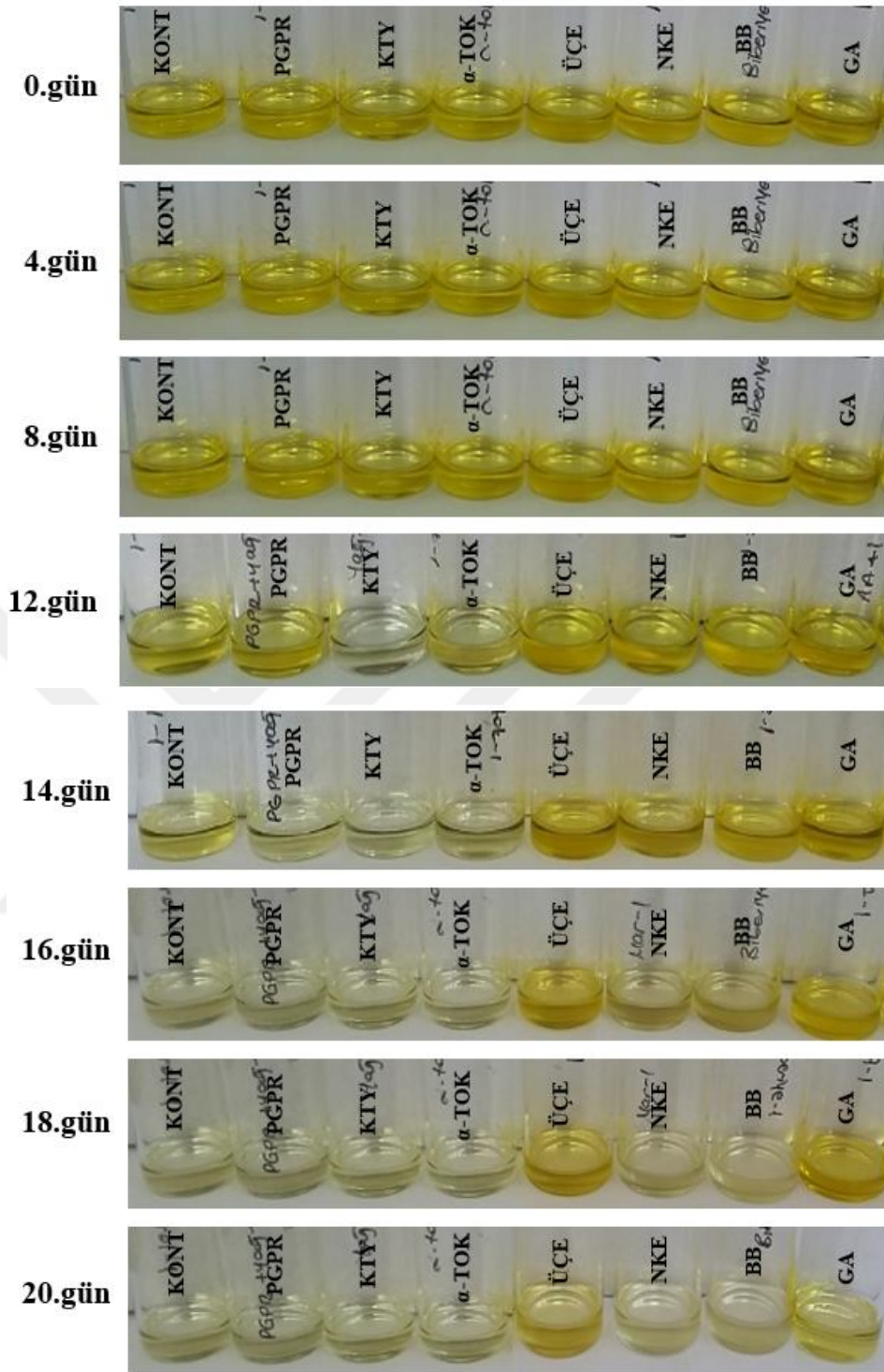
Shadyro ve ark. [90], doğal ve sentetik antioksidanları kullanarak keten tohumu yağını stabilize etmeye çalıştıkları çalışmada, üç farklı keten tohumundan elde ettikleri yağların karakteristik özelliklerini incelemişlerdir. Araştırmacılar keten tohumu yağlarının karotenoid içeriğinin sırasıyla 2.55 mg/100 g yağ, 3.02 mg/100 g yağ, 3.41 mg/100 g yağ olduğunu tespit etmişlerdir. Keten tohumu yağı ile ilgili yapılan bir başka çalışmada [93] ise keten tohumu yağının toplam karotenoid içeriğinin 57.3 mg/g yağ olduğu bildirilmiştir. Keten tohumu yağında bulunan toplam karotenoid miktarın elde edildiği keten tohumunun yetiştirme koşullarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir.

Yağlarda ve yağ içeren gıdalarda meydana gelen oksidatif bozulmalar aroma, besin değeri ve renk kaybına neden olarak tüketicilerin sağlığına zararlı olabilecek toksik bileşikler üretebilmektedir. Ancak antioksidan etki gösteren maddeler ve şelatlayıcı ajanlar lipid oksidasyonunun inhibe etmektedirler [94]. Yağ içeren gıdalarda ve yağlarda oksidatif bozulmalara karşı antioksidan özellik gösteren maddelerden biri karotenoidlerdir. Karotenoid molekülleri lipid radikallerini etkisiz hale getirerek antioksidan özellik göstermektedir [95]. Ayrıca karotenoidler bulundukları gıdalara renk veren bileşiklerdir [96]. Ancak oksidasyon sırasında karotenoidler antioksidan özellik göstererek harcadıklarından dolayı oksidasyon

sırasında bulundukları gıdalarda renk kayıpları görülmektedir. Bu durum bu çalışma kapsamında oksidasyona bırakılan örneklerde de gözlenmiştir (Şekil 4.5).

Oksidasyon süresince örneklerde antioksidan kapasite analizi, serbest yağ asidi analizi, TBARS ve peroksit sayısı analizlerinin yapıldığı aralıklarda örneklerin fotoğrafları kaydedilerek renklerinde meydana gelen değişimler gözlemlenmiştir.

Şekil 4.5’de görüldüğü gibi oksidasyon süresi arttıkça numunelerin renklerinde açılmalar olduğu görülmektedir. On ikinci günde KTY numunesinde ciddi bir renk kaybının olduğunu ve bu durumun sonraki günlerde de devam ettiği görülmektedir. On dördüncü günde kaydedilen fotoğrafta görüldüğü gibi α - tokoferol ve pgpr+yağ örneklerinin renklerinde 12. gün keten tohumu yağı numunesindekine benzer şekilde renk açılmasının gerçekleştiği görülmektedir. Oksidasyonun 16. gününde kontrol numunesinin de renk yoğunluğunun önemli düzeyde azaldığı, biberiye ve nar kabuğu numunelerinde ise kısmi bir renk kaybı olduğu görülmüştür. On sekizinci günde ise 16. günde rengini kısmen kaybeden biberiye ve nar kabuğu örneklerinin tamamen renksizleştiği gözlemlenmiştir. Ancak oksidasyonun 20. gününe kadar üzüm çekirdeği ve gallik asit numunelerinin renginin stabil kaldığı gözlemlenmiştir. Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.4’de verilen TBARS ve peroksit sayısı değerlerine bakıldığında, renk kayıplarındaki trendlerin TBARS ve peroksit sayısı değerlerindeki artışa paralel olarak gerçekleştiği görülmektedir.

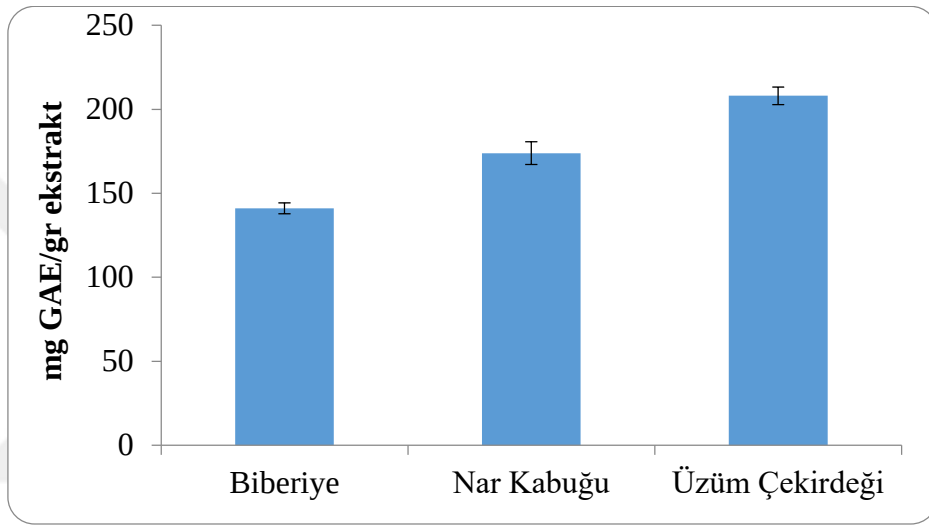


Şekil 4.5. Oksidasyon süresince örneklerin renklerinde meydana gelen değişiklikler (KONT: kontrol, PGPR: Pgpr+yağ, KTY: keten tohumu yağı, α-TOK: α-tokoferol, ÜÇE: üzüm çekirdeği ekstraktı, NKE: nar kabuğu ekstraktı, BB: biberiye ekstraktı, GA: gallik asit)

4.2. Bitki Ekstraktlarında Yapılan Analizler

4.2.1. Toplam fenolik madde analizi

Bu çalışmada kullanılan nar kabuğu, biberiye ve üzüm çekirdeği ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarına ait sonuçlar Şekil 4.6'da verilmiştir. Buna göre en yüksek fenolik madde miktarına sahip örneğin üzüm çekirdeği ekstraktı (208.07 ± 5.28 mg GAE/g) olduğu belirlenmiştir. Üzüm çekirdeğini nar kabuğu ekstraktı (173.90 ± 6.75 GAE mg/g) ve biberiye ekstraktı (140.98 ± 3.25 GAE mg/g) izlemektedir.



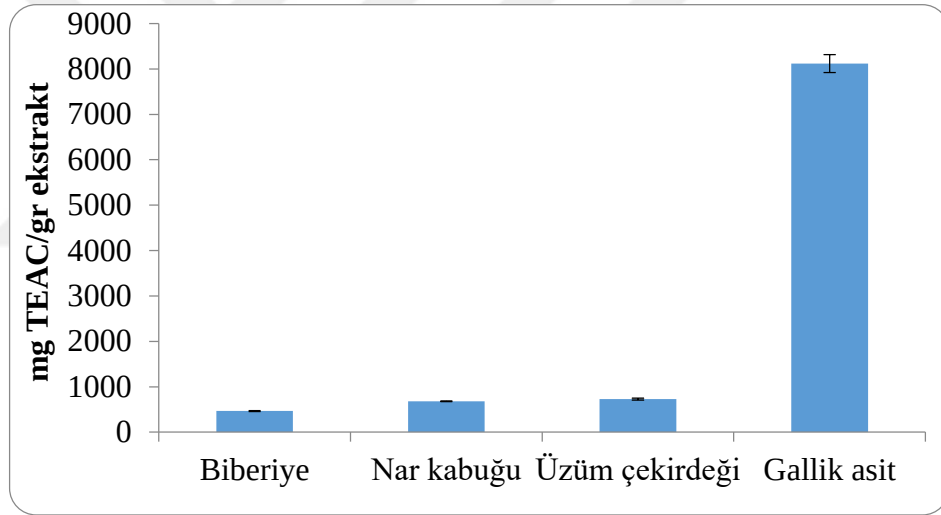
Şekil 4.6. Biberiye, nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde miktarı

El-Elimat ve ark. [97], farklı üzüm çeşitlerinden elde ettikleri üzüm çekirdeklerinin toplam fenolik madde miktarının 37 mg GAE/g ile 152 mg GAE/g olduğunu bildirmişlerdir. Özdemir ve ark. [98], liyofilize nar kabuğun ekstraktının toplam fenolik madde miktarının 158.5 mg GAE/gr olduğunu belirlemişlerdir. Zoral ve Turgay [99], nar kabuğu sulu ekstraktında toplam fenolik madde miktarının 2054.4 mg GAE/100 gr olduğunu tespit etmişlerdir. Yeddes ve ark. [100], farklı biberiye çeşitlerinden elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik madde miktarının 22.91 mg GAE/gr ile 44.57 mg GAE/gr arasında değerlere sahip olduğunu belirlemişlerdir. Casarotti and Jorge [101], çalışmada kullandıkları liyofilize biberiye ekstraktının toplam fenolik madde miktarının 82.03 4 mg GAE/100 gr olduğunu belirlemişlerdir. Türkiye'de yetiştirilen farklı çeşitlerdeki kırmızı ve beyaz üzüm çekirdeklerinin toplam fenolik madde miktarının 4778.6 mg/100 g ile 13000 mg/100 g GAE arasında değiştiği bildirilmektedir. Üzüm çekirdeğinde bulunan fenolik bileşikler üzümde bulunan

toplam polifenollerin %60-70'ini kapsamaktadır. Üzüm çekirdeği, kabuğuna kıyasla çok daha fazla oranda flavanol içermekte olup, miktarı üzümün yetiştirildiği bölgeye ve iklime göre değişmektedir [46].

4.2.2. Antioksidan aktivite analizi

Bu çalışmada kullanılan nar kabuğu, biberiye ve üzüm çekirdeği ekstraktlarının antioksidan aktivitelerine ait sonuçlar Şekil 4.7’da verilmiştir. Buna göre en yüksek antioksidan aktiviteye sahip ekstraktın üzüm çekirdeği ekstraktı (728.37 ± 21.6 mg TEAC/g) olduğu belirlenmiştir. Üzüm çekirdeğinden sonra en yüksek antioksidan aktiviteye sahip ekstraktın nar kabuğu ekstraktı (682.61 ± 8.16 mg TEAC/g) olduğu ve bunu biberiye ekstraktının (468.23 ± 10.37 mg TEAC/g) izlediği tespit edilmiştir. Emülsiyon elde edilmesinde standart antioksidan olarak kullanılan gallik asitin antioksidan aktivitesinin ise 8117.65 ± 196.08 mg TEAC/g olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Gallik asit, biberiye, nar kabuğu ve üzüm çekirdeği ekstraktının antioksidan aktivitesi

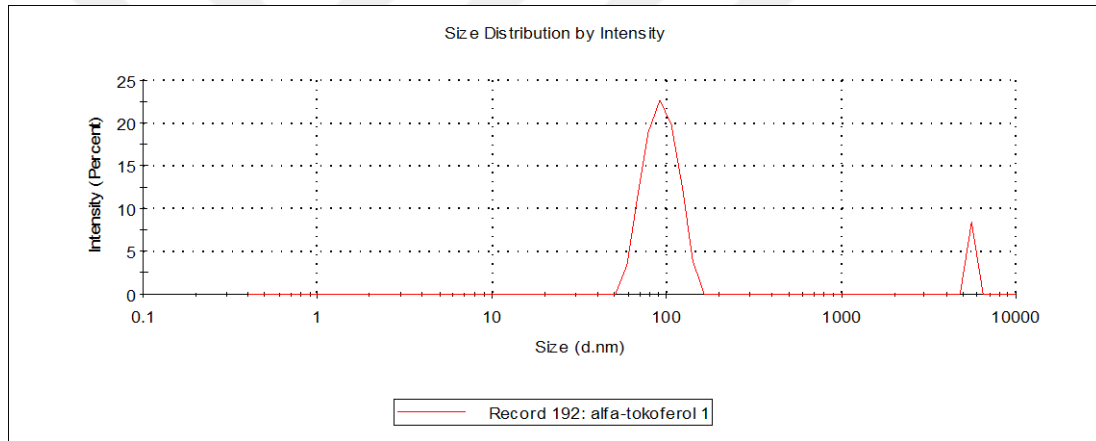
Özdemir ve ark. [98], liyofilize nar kabuğun ekstraktının antioksidan aktivitesinin 5800.6 mM TEAC/gr ekstrakt olduğunu ve nar kabuğunun BHT’den daha yüksek antioksidan etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca nar kabuğu ekstraktının nar danesi ekstraktından daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini, konsantrasyon arttıkça antioksidan etkinin daha da arttığını belirtmişlerdir. Nar kabuğunun antioksidan etkisinin yüksek düzeyde içerdiği polifenollerden (kondanse tanenler ve antosiyaninler) kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Bonilla ve ark. [102], üzüm çekirdeğinin antioksidan aktivitesinin $281.3 \mu\text{mol TEAC/gr}$ olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca üzüm çekirdeklerinin yapraklarından %20 daha fazla antioksidan kapasiteye sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

4.3. Partikül Boyutu ve Zeta potansiyeli Ölçümü

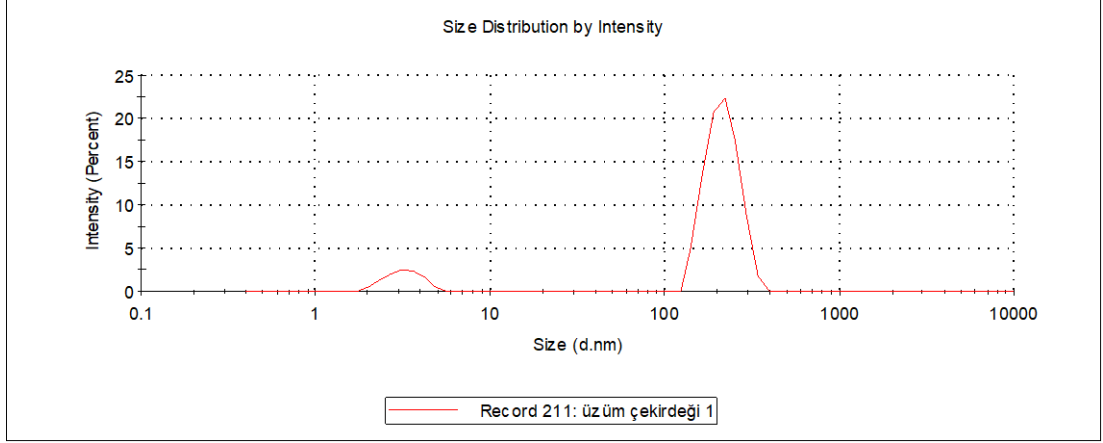
Üzüm çekirdeği ekstraktı ve alfa-tokoferol ilave edilen mikroemülsiyonların Malvern Nanosizer cihazı ile ölçülen partikül boyutu ölçümü sonuçları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’ da verilmiştir.

Hazırlanan mikroemülsiy keken tohumu yağı örneklerinde yapılan partikül boyutu ölçümünden anlamlı sonuçlar alınamamıştır. Söz konusu durumun keken tohumu yağının viskozitesinin yüksek olmasından ve emülsiyonun az miktarda su içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Partikül boyutu analizi için anlamlı sonuçlar elde edilmediğinden zeta potansiyeli ölçülmemiştir.



Şekil 4.8. alfa-tokoferol ilave edilen mikroemülsiyonun partikül çapı ölçümü sonucu

Mikroemülsiyonlar berrak ve termodinamik olarak stabil emülsiyonlardır. Mikroemülsiyonların berrak olması damlacık boyutlarının küçük olduğunu göstermektedir [103]. Şekil 4.10’da çalışma kapsamında hazırlanan emülsiy keken tohumu yağı örneklerini göstermektedir. Şekilde görüldüğü gibi emülsiyonlar berrak görünüme sahiptir. Bu durum emülsiyonların mikroemülsiyon olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. Üzüm çekirdeği ekstraktı ilave edilen mikroemülsiyonun partikül çapı ölçümü sonucu



Şekil 4.10. Hazırlanan mikroemülsiyonların görüntüsü (KONT: kontrol (yağ+pgpr+su), PGPR: pgpr+yağ, KTY: keten tohumu yağı, α -TOK: α -tokoferol, ÜÇE: üzüm çekirdeği ekstraktı, NAR: nar kabuğu ekstraktı, BB: biberiye ekstraktı, GA: gallik asit)

4.4. Oksidatif Stabilité Testleri

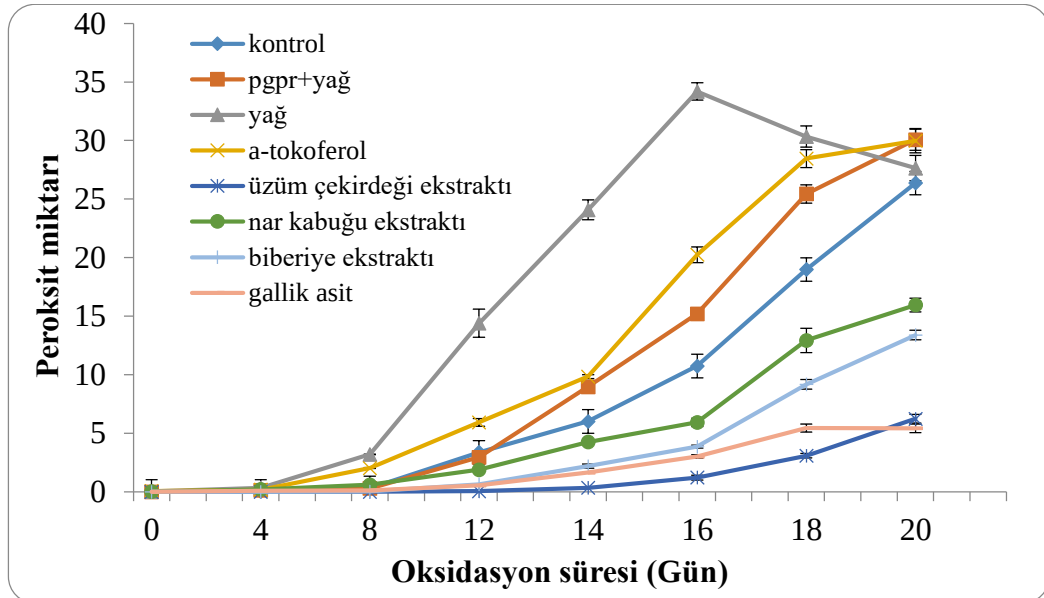
4.4.1. Peroksit sayısı

Mikroemülsiyon gruplarının oksidasyon süresi boyunca peroksit miktarında meydana gelen değişiklikler Şekil 4.11 ve Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Yağ ve yağ içeren ürünlerde peroksit değeri lipid oksidasyonu sırasında birincil bozulma ürünlerini tespit etmek için belirlenir. Çizelge 4.2 incelendiğinde 0. günde tüm örneklerin peroksit değerinin 0.001-0.024 μg kümen/kg yağ aralığı gibi düşük bir oksidasyon seviyesi gösterdiği fakat oksidasyon süresi arttıkça tüm örneklerin peroksit miktarında önemli düzeyde bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$).

Keten tohumu yağı ve α - tokoferol örneklerinde 4. gün sonuna kadar peroksit değerinde önemli bir değişimin olmadığı gözlemlenirken ($P>0.05$); 4. günden itibaren 20. gün sonuna kadar önemli değişimlerin olduğu gözlemlenmiştir ($P<0.05$). Kontrol (pgpr+yağ+su), pgpr+yağ, nar kabuğu ve gallik asit örneklerinde ise 8. gün sonuna kadar peroksit değerlerinde önemli bir değişimin olmadığı belirlenirken ($P>0.05$); 8. gün sonundan 20. gün sonuna kadar önemli düzeyde artış olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Biberiye ve üzüm çekirdeği örneklerinde ise 12. gün sonrasına kadar peroksit değerlerinde önemli bir değişimin olmadığı görülürken ($P>0.05$); belirgin artışın 12- 20. gün arasında gerçekleştiği görülmüştür ($P<0.05$). Kontrol örneğinde antioksidan madde olmadığı için diğer antioksidan içeren örneklerle göre daha düşük oksidatif stabiliteye sahip olduğu görülmüştür.

Örneklerin günlere göre değişimi gözlemlendiğinde ise analizin yapıldığı günlerde üzüm çekirdeği örneğinin diğer tüm örneklerle kıyasla en düşük peroksit sayısı (0.001-6.239 mg kümen/kg yağ) artışı gösterdiği gözlemlenmiştir ($P<0.05$). Üzüm çekirdeği örneğinin daha yüksek oksidatif stabiliteye sahip olmasının, üzüm çekirdeği ekstraktındaki toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitenin nar kabuğu ve biberiye ekstraktlarına kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.11. Örneklerin oksidasyon süresince peroksit sayılarında meydana gelen değişiklikler. Peroksit miktarı μg Kümen hidroperoksit/g yağ olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Belirli periyotlarda alınan örneklerin peroksit sayısı değerleri

Gün	Kontrol (Pgpr+yağ+su)	Pgpr+yağ	Keten tohumu yağı	α -Tokoferol	Üzüm çekirdeği	Nar kabuğu	Biberiye	Gallik asit
0	0.024 $\pm$ 0.015 ^{a,A}	0.006 $\pm$ 0.003 ^{a,A}	0.027 $\pm$ 0.026 ^{a,A}	0.074 $\pm$ 0.052 ^{a,B}	0.001 $\pm$ 0.002 ^{a,A}	0.012 $\pm$ 0.022 ^{a,A}	0.001 $\pm$ 0.008 ^{a,A}	0.004 $\pm$ 0.005 ^{a,A}
4	0.034 $\pm$ 0.018 ^{a,A}	0.143 $\pm$ 0.028 ^{a,BC}	0.330 $\pm$ 0.021 ^{a,D}	0.176 $\pm$ 0.120 ^{a,C}	0.003 $\pm$ 0.003 ^{a,A}	0.203 $\pm$ 0.038 ^{a,C}	0.004 $\pm$ 0.013 ^{a,A}	0.084 $\pm$ 0.031 ^{a,AB}
8	0.322 $\pm$ 0.019 ^{a,C}	0.294 $\pm$ 0.046 ^{a,C}	3.196 $\pm$ 0.033 ^{b,F}	2.025 $\pm$ 0.045 ^{b,E}	0.006 $\pm$ 0.006 ^{a,A}	0.597 $\pm$ 0.047 ^{a,D}	0.025 $\pm$ 0.024 ^{a,A}	0.129 $\pm$ 0.048 ^{a,B}
12	3.380 $\pm$ 0.120 ^{b,C}	2.952 $\pm$ 0.100 ^{b,C}	14.401 $\pm$ 1.196 ^{c,E}	5.930 $\pm$ 0.326 ^{c,D}	0.049 $\pm$ 0.046 ^{a,A}	1.892 $\pm$ 0.068 ^{b,B}	0.639 $\pm$ 0.016 ^{b,A}	0.550 $\pm$ 0.050 ^{b,A}
14	6.009 $\pm$ 0.214 ^{c,D}	8.969 $\pm$ 0.532 ^{c,E}	24.079 $\pm$ 0.838 ^{d,G}	9.837 $\pm$ 0.155 ^{d,F}	0.341 $\pm$ 0.015 ^{b,A}	4.258 $\pm$ 0.101 ^{c,C}	2.191 $\pm$ 0.184 ^{c,B}	1.646 $\pm$ 0.024 ^{c,B}
16	10.740 $\pm$ 0.607 ^{d,E}	15.206 $\pm$ 0.151 ^{d,F}	34.194 $\pm$ 0.729 ^{e,H}	20.241 $\pm$ 0.675 ^{e,G}	1.216 $\pm$ 0.203 ^{c,A}	5.929 $\pm$ 0.364 ^{d,D}	3.857 $\pm$ 0.124 ^{d,C}	3.013 $\pm$ 0.161 ^{d,B}
18	18.983 $\pm$ 0.596 ^{e,E}	25.439 $\pm$ 0.778 ^{e,F}	30.340 $\pm$ 0.903 ^{f,H}	28.455 $\pm$ 0.776 ^{f,G}	3.079 $\pm$ 0.186 ^{d,A}	12.926 $\pm$ 1.033 ^{e,D}	9.179 $\pm$ 0.411 ^{e,C}	5.457 $\pm$ 0.346 ^{e,B}
20	26.367 $\pm$ 0.980 ^{f,D}	30.078 $\pm$ 0.900 ^{f,E}	27.648 $\pm$ 1.089 ^{e,D}	29.981 $\pm$ 1.035 ^{g,E}	6.239 $\pm$ 0.369 ^{e,A}	15.951 $\pm$ 0.583 ^{f,C}	13.384 $\pm$ 0.407 ^{f,B}	5.425 $\pm$ 0.374 ^{e,A}

Sonuçlar üç tekerrür ortalamasıdır (n=3). Küçük harflerle gösterilen indisler aynı satırdaki, büyük harflerle gösterilen indisler ise aynı sütunda verilen ortalamaların istatistiksel grubunu göstermektedir ($P<0.05$).

Şekil 4.11 incelendiğinde örneklerin oksidasyon süresince genel olarak peroksit sayısı değerlerindeki değişim için sırasıyla üzüm çekirdeği <gallik asit< biberiye< nar kabuğu< kontrol< pgpr+yağ< α - tokoferol< yağ olduğu görülmektedir. Çizelge 4.2 incelendiğinde bitki ekstraktlarını içeren örneklerin peroksit sayısı değerleri ile gallik asit örneğinin peroksit sayısı değerleri karşılaştırıldığında, üzüm çekirdeği ile gallik asit örneklerinin peroksit sayısı değerlerinin yakın olduğu gözlemlenirken; nar kabuğu ve biberiye örneklerinin ise gallik asit örneğine göre daha yüksek peroksit sayısı değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Oksidasyona bırakılan tüm örneklerin peroksit sayısı değerleri karşılaştırıldığında ise oksidasyon boyunca bitki ekstraktları ve gallik içeren örneklerin en düşük peroksit sayısı değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Oksidasyon boyunca α - tokoferol örneğindeki peroksit değişimini incelediğimizde ise 18. gününe kadar keten tohumu yağı örneğine kıyasla daha düşük, kontrol, pgpr+yağ, üzüm çekirdeği, biberiye, nar kabuğu ve gallik asit olarak ifade edilen örneklere kıyasla ise daha yüksek lipid hidroperoksit içerdiği gözlemlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda polar antioksidanların bulk (emülsiyeye halde olmayan) yağların oksidasyonunu geciktirmekte non-polar antioksidanlara kıyasla daha etkili olduğu bildirilmişti ve bu çelişkili durum “polar paradoks” olarak ifade edilmişti [10]. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar da bu olguyu desteklemektedir. Dolayısıyla oksidasyona bıraktığımız ve mikroemülsiyon olarak adlandırdığımız örnekler çok az miktarda su içerdiğinden bulk yağ olarak da tanımlanabilir.

Yapılan çalışmalar yağlar içerisinde çok az miktarda su bulunduğunu ve bu suyun, yağın doğal yapısında bulunan mono ve digliseridler, fosfolipidler gibi yüzey aktif maddelerle çevrili halde olduğunu göstermiştir. Özellikle bu su fazında yoğunlaşmış halde bulunan metal iyonlarının lipid oksidasyonunu tetikleyen en önemli faktör olduğunu ve burada bulunacak polar antioksidanların lipid oksidasyon reaksiyonlarını yağ fazında bulunan non-polar antioksidanlara kıyasla daha etkili bir şekilde önleyeceğini göstermiştir. Özellikle yağ fazı ile su damlacıklarının temas ettiği yağ-su ara fazında lokalize olan antioksidanların çok daha etkin bir şekilde oksidasyonu engellediği görülmüştür [41].

Non-polar bir antioksidan olan α -tokoferol yağ fazında lokalize olduğundan polar antioksidan olan gallik asit ve diğer bitki ekstraktlarına kıyasla daha yüksek lipid hidroperoksit içerdiği düşünülmektedir. Benzer şekilde polar antioksidan olan bitki ekstraktları ve gallik asitin mikroemülsiyeye keten tohumu yağında α -tokoferolden daha yüksek antioksidan özellik göstermesinin nedeninin bu polar antioksidanların mikroemülsiyonun su fazında lokalize olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 4.11 ve Çizelge 4.2 incelendiğinde, pgpr+yağ örneğinin (0.006-30.078 mg kümen/kg yağ) keten tohumu yağı örneğine (0.027-34.194 mg kümen/kg yağ) kıyasla oksidasyon boyunca daha düşük peroksit sayısı değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Bu durumun kullanılan PGPR'ın antioksidan özelliğe sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, Chen ve ark. [104], doğal antioksidan ve emülgatörlerin alg yağı ve alg yağı emülsiyonunun oksidasyonu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, PGPR'ın emülsiyonun oksidasyonunu arttırdığını bildirilmişlerdir. Alg yağı emülsiyonu %2 su, %0,5 emülgatör ve %97,5 alg yağı kullanılarak hazırlanmıştır. Emülsiyonlarda su miktarının yüksek olması su/yağ ara yüzeyini artırarak prooksidanların saldırılarını kolaylaştırdığı ifade edilmiştir. PGPR'ın pro-oksidan etki göstermesinin nedeninin ise alg yağı emülsiyonunun keten tohumu yağı emülsiyonuna göre daha yüksek su ve daha düşük PGPR içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 4.11 incelendiğinde keten tohumu yağı örneğinin peroksit sayısı miktarının oksidasyonun 16. gününe kadar arttığını ancak 16-20. günler arasında peroksit sayısı miktarının azaldığı gözlemlenmektedir. Söz konusu durumun oksidasyonun 16. gününe kadar keten tohumu yağı örneğinde hidroperoksit oluşumun arttığı, 16-20. günler arasında ise oluşan hidroperoksitlerin parçalanarak ikincil oksidasyon ürünlerine veya başka bozulma ürünlerine dönüştüğü ve hidroperoksitlerin parçalanmasının oluşum hızından daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Biberiye ekstraktının keten tohumu yağının oksidatif stabilitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada [105], depolama sırasında kontrole kıyasla α -tokoferol ilave edilen grupta lipid hidroperoksit oluşumunun yüksek olduğu, biberiye ekstraktı ilave edilen grupta ise lipid hidroperoksit oluşumunu az olduğu tespit edilmiştir. Keten tohumu yağında biberiye ekstraktının antioksidan etki göstermesinin

sebebinin, biberiye ekstraktında bulunan fenolik bileşenlerden (karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asit) ve bu fenolik bileşenlerin keten tohumu yağında bulunan tokoferollerle sinerjistik etki göstermesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Şekil 1.6'da karnosik asit, karnosol ve rosmarinik asit fenolik bileşiklerinin molekül formülü verilmiştir. Birkaç biberiye ekstraktının antioksidan aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada [106], biberiye ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarının 278-966 mg karnosik asit/g ekstrakt olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu biberiye ekstraktlarında bulunan en çok bulunan fenolik bileşiğin %13.4 ile %70.0 arasında değişen oranlarda karnosik asit olduğunu ve bunu %3.2 ile %9.7 arasında değişen oranlarda karnosol bileşiğinin izlediği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise biberiye ekstraktının %13.39 oranında rosmarinik asit içerdiği ifade edilmiştir [107].

Poiana [108], tarafından yapılan bir çalışmada, üzüm çekirdeği ekstraktının konvektif ve mikrodalga ısıtma sırasında ayçiçek yağının oksidatif stabilitesini arttırdığı bildirilmiştir. Üzüm çekirdeği ekstraktında bulunan antioksidan bileşiklerin oksidasyonun başlangıcı sırasında serbest radikal oluşumlarını inhibe etmesinden dolayı ayçiçek yağının stabilitesini arttırdığı bildirilmiştir.

Kırmızı üzüm çekirdeğinde bulunan polifenollerin %40.3'ü flavan-3-ollerden, %26.2'si fenolik asitlerden, %22.7'si antosiyaninlerden, %6.7'si flavonollerden ve %4.2'si hidroksisinamik asitlerden oluştuğu belirtilmiştir. Flavan-3-ollerin oligomerik ve polimerik yapıda bulunanları olarak bilinen ve güçlü antioksidanlar olarak nitelendirilen proantosiyanidinlerin, antioksidatif etkisinin sulu ortamda C, E vitaminleri ve (+)- kateşine göre çok daha yüksek olduğu vurgulanmıştır. Yapılan çalışmalarda üzüm çekirdeğinde kateşinin (monomerik flavan-3-ol) en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşik olduğunu, miktarının üzümlerin cinslerine göre 62.8 ile 206 µg/g arasında değiştiği ve epikateşin, gallokateşin, epigallokateşin, epikateşin 3-O-gallatin bulunan diğer monomerik flavan-3-oller olduğu bildirilmiştir [47]. Şekil 1.8'de kateşin, epikateşin, epigallokateşin ve gallokateşin'in kimyasal yapıları verilmiştir.

Abd-Allah ve ark. [109], nar ve portakal kabuğu ekstraktlarının yenilebilir yağların (ayçiçek ve soya fasulyesi yağı) oksidatif stabilitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, oksidasyon süresince nar ve portakal kabuğu içeren ayçiçek ve soya fasulyesi yağlarının PV değerlerinin kontrol örneğine kıyasla daha düşük

olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durumun nar kabuğunun yüksek polifenolik madde içermesinden ve bu polifenolik maddelerin birçok reaktif oksijen türlerinin etkili temizleyicisi olarak hareket etmesinden kaynakladığını ifade etmişlerdir.

Nar kabuğu ekstraktının soğukta depolanan köftelerin mikrobiyel ve oksidatif stabilitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada [110], köftelere %0.2-%0.3 nar kabuğu ekstraktı ilavesi ile kötü koku oluşumunun ve kokuşmanın algılanmasını 6 gün geciktirildiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, nar kabuğu ekstraktı içeren köftelerin kontrol numunesine kıyasla daha düşük peroksit sayısı değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Nar kabuğu ekstraktının yapısındaki fenolik bileşikler ve tanenler sayesinde serbest radikal oluşumunu engellediği ve metalleri bağladığı bildirilmiştir.

Çizelge 4.3. Nar kabuğu ekstraktının fenolik bileşik içerikleri [44].

No	Fenolik Bileşik	Nar Kabuğu (mg/g ekstrakt)
1	Gallik asit	10.19±0.21
2	Kafeik asit	53.28±0.98
3	Ferulik asit	40.63±0.76
4	Kateşin	26.81±0.52
5	2,4 hidrosibenzoik asit	16.84±0.35
6	Klorojenik asit	14.04±0.30
7	Elajik asit	23.53±0.45
8	Vanilik asit	26.25±0.49
9	Kuarsetin	27.60±0.58
10	Epikateşin	51.93±0.98
11	Kaempferol	10.69±0.18
12	Rosmarinik asit	6.83±0.13
13	Naringenin	5.66±0.09
14	Punigalajin	168.01±3.32

Nar kabuğundaki hidrolize tanenlerden olan punikalajinin (Şekil 1.7) serbest radikallerin uzaklaştırılmasında ve lipid oksidasyonun önlenmesinde oldukça güçlü etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir [44]. Demir ve ark. [111], nar kabuğu ekstraktı ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, nar kabuğu ekstraktında 14 adet fenolik bileşik tanımlanmışlardır ve nar kabuğu ekstraktının en fazla punigalajin (punikalajin) içerdiği, bunu kafeik asit, epikateşin ve ferulik asitin izlediğini bildirmişlerdir (çizelge 4.3). Nar kabuğu ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise nar kabuğu ekstraktının

punikalagin (296 mg/g), gallik asit (71 mg/g), kaempferol (62 mg/g), kuarsetin (40 mg/g), kumarik asit (32 mg/g), ferulik asit (28 mg/g), elajik asit (18 mg/g), sinapik asit (17 mg/g) ve kafeik asit (11 mg/g) içerdği belirtilmiştir [112]. Bu çalışmada üzüm çekirdeği, biberiye ve nar kabuğu ekstraktı bulunan numunelerin oksidasyon süresince kontrole kıyasla daha düşük peroksit sayısı değerine sahip oldukları ve bu bitki ekstraktlarının yağın oksidasyonunun önlenmesindeki etkili oldukları gözlemlenmiştir. Söz konusu durumun bitki ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin yüksek düzeyde antioksidan aktivite göstermelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 4.7).

4.4.2. Tiobarbitirik asit sayısı

Örneklerin oksidasyon süresi boyunca ikincil bozulma ürünlerini ifade etmek üzere tiobarbitirik asit sayısında meydana gelen değişiklikler belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.11 ve Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Oksidasyon deneyinin başlangıcında tüm örneklerin tiobarbitirik asit sayısının 0.058-0.087 µg TEP/kg yağ aralığı gibi düşük bir oksidasyon seviyesini gösterdiği fakat oksidasyon süresi arttıkça tüm örneklerin tiobarbitirik asit sayısında önemli düzeyde bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$).

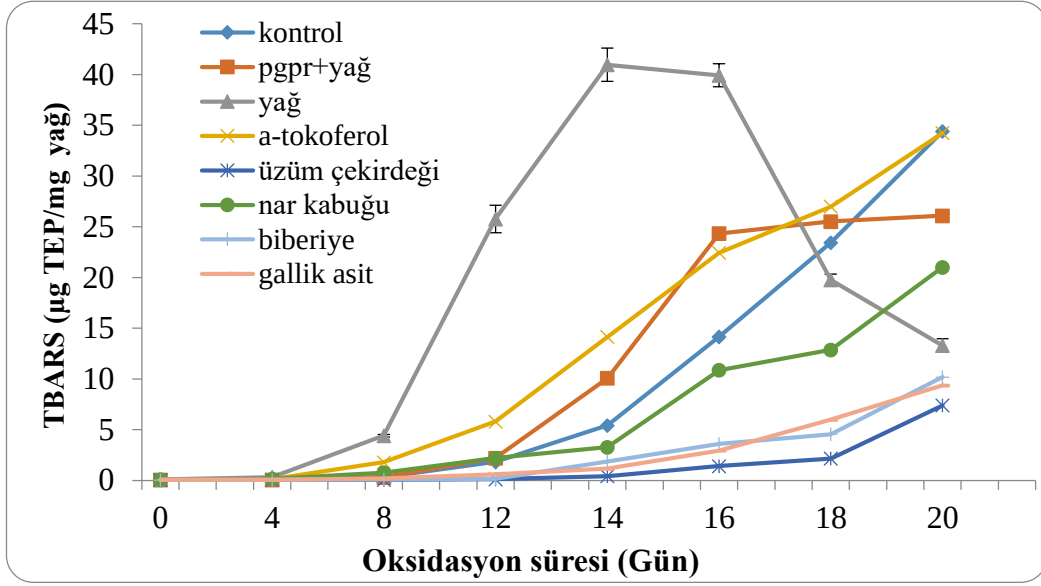
Keten tohumu yağı ve α -tokoferol içeren örneklerin oksidasyonun 4. gününden sonra tiobarbitirik asit değerlerinde önemli düzeyde bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Kontrol, pgpr+yağ, nar kabuğu ekstraktı içeren ve gallik asit içeren örneklerin 8. günden itibaren ve üzüm çekirdeği ekstraktı ve biberiye ekstraktı içeren örneklerde ise 12. günden itibaren tiobarbitirik asit sayısında önemli düzeyde bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$).

Şekil 4.12 ve Çizelge 4.4 incelendiğinde, pgpr+yağ örneğinin (0.066-24.333 µg TEP/kg yağ) keten tohumu yağı örneğine (0.087-39.931 µg TEP/kg yağ) kıyasla oksidasyonun 16. gününe kadar daha düşük tiobarbitirik asit sayısı değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Peroksit sayısı sonuçlarında da benzer durum gözlemlenmişti ve bu durumun PGPR’ın antioksidan etki göstermesinden kaynaklandığı ifade edilmişti.

Çizelge 4.4. Belirli periyotlarda alınan örneklerin tiyobar bütirik asit sayısı değerleri

Gün	Kontrol (Pgpr+yağ+su)	Pgpr+yağ	Keten tohumu yağı	α -Tokoferol	Üzüm çekirdeği	Nar kabuğu	Biberiye	Gallik asit
0	0.067 $\pm$ 0.001 ^{a,BC}	0.066 $\pm$ 0.004 ^{a,BC}	0.087 $\pm$ 0.005 ^{a,D}	0.064 $\pm$ 0.004 ^{a,B}	0.056 $\pm$ 0.001 ^{a,A}	0.071 $\pm$ 0.004 ^{a,C}	0.058 $\pm$ 0.001 ^{a,A}	0.070 $\pm$ 0.001 ^{a,BC}
4	0.072 $\pm$ 0.005 ^{a,C}	0.067 $\pm$ 0.002 ^{a,BC}	0.334 $\pm$ 0.005 ^{a,F}	0.122 $\pm$ 0.008 ^{a,D}	0.056 $\pm$ 0.004 ^{a,A}	0.150 $\pm$ 0.003 ^{a,E}	0.062 $\pm$ 0.003 ^{a,AB}	0.072 $\pm$ 0.006 ^{a,C}
8	0.311 $\pm$ 0.049 ^{a,C}	0.320 $\pm$ 0.049 ^{a,C}	4.419 $\pm$ 0.128 ^{b,F}	1.802 $\pm$ 0.060 ^{b,E}	0.061 $\pm$ 0.003 ^{a,A}	0.765 $\pm$ 0.017 ^{a,D}	0.094 $\pm$ 0.003 ^{a,AB}	0.184 $\pm$ 0.006 ^{a,B}
12	1.832 $\pm$ 0.035 ^{b,B}	2.213 $\pm$ 0.048 ^{b,B}	25.768 $\pm$ 1.343 ^{e,D}	5.802 $\pm$ 0.174 ^{c,C}	0.120 $\pm$ 0.007 ^{a,A}	2.201 $\pm$ 0.060 ^{b,B}	0.168 $\pm$ 0.022 ^{a,A}	0.595 $\pm$ 0.019 ^{b,A}
14	5.432 $\pm$ 0.109 ^{c,D}	10.086 $\pm$ 0.471 ^{c,E}	40.965 $\pm$ 1.640 ^{f,G}	14.147 $\pm$ 0.247 ^{d,F}	0.428 $\pm$ 0.018 ^{b,A}	3.281 $\pm$ 0.045 ^{c,C}	1.860 $\pm$ 0.082 ^{b,B}	1.667 $\pm$ 0.070 ^{c,AB}
16	14.164 $\pm$ 0.494 ^{d,D}	24.333 $\pm$ 0.346 ^{d,F}	39.931 $\pm$ 1.129 ^{f,G}	22.452 $\pm$ 0.685 ^{e,E}	1.424 $\pm$ 0.078 ^{c,A}	10.872 $\pm$ 0.289 ^{d,C}	3.616 $\pm$ 0.131 ^{c,B}	2.954 $\pm$ 0.186 ^{d,B}
18	23.447 $\pm$ 0.626 ^{e,E}	25.526 $\pm$ 1.483 ^{e,F}	19.759 $\pm$ 0.594 ^{d,D}	26.992 $\pm$ 1.809 ^{f,F}	2.158 $\pm$ 0.278 ^{d,A}	12.877 $\pm$ 0.858 ^{e,C}	4.553 $\pm$ 0.218 ^{d,B}	5.991 $\pm$ 0.275 ^{e,B}
20	34.407 $\pm$ 0.496 ^{f,F}	26.093 $\pm$ 0.717 ^{e,E}	13.293 $\pm$ 0.662 ^{c,C}	34.254 $\pm$ 1.717 ^{g,F}	7.389 $\pm$ 0.137 ^{e,A}	21.004 $\pm$ 0.641 ^{d,D}	10.185 $\pm$ 0.386 ^{e,B}	9.366 $\pm$ 0.285 ^{f,B}

Sonuçlar üç tekerrür ortalamasıdır (n=3). Küçük harflerle gösterilen indisler aynı satırdaki, büyük harflerle gösterilen indisler ise aynı sütunda verilen ortalamaların istatistiksel grubunu göstermektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.12. Örneklerin oksidasyon süresince tiyobarbütirik asit sayısı değerlerinde meydana gelen değişiklikler

Oksidasyon boyunca α -tokoferol örneğindeki tiyobarbütirik asit değerlerindeki değişimini incelediğimizde ise 14 .gününe kadar keten tohumu yağı örneğine kıyasla daha düşük, kontrol, pgpr+yağ, üzüm çekirdeği, biberiye, nar kabuğu ve gallik asit olarak ifade edilen örneklere kıyasla ise daha yüksek tiyobarbütirik asit değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Benzer durum peroksit sayısı sonuçlarında da gözlemlenmişti ve söz konusu durum polar paradoks teorisi ile ifade edilmişti.

Örneklerin günlere göre değişimi gözlemlendiğinde ise analizin yapıldığı günlerde üzüm çekirdeği örneğinin diğer tüm örneklere kıyasla en düşük tiyobarbütirik sayısı (0.056-7.389 mg TEP/kg yağ) artışına sahip olduğu gözlemlenmiştir ($P<0.05$). Benzer durum peroksit sayısı sonuçlarında da gözlemlenmişti ve bu durumun üzüm çekirdeği ekstraktının toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitenin nar kabuğu ve biberiye ekstraktlarına kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklandığı ifade edilmişti.

Şekil 4.12 incelendiğinde örneklerin oksidasyon süresince genel olarak tiyobarbütirik asit sayısı değerleri küçükten büyüğe doğru üzüm çekirdeği <gallik asit< biberiye< nar kabuğu< kontrol< pgpr+yağ< α -tokoferol< yağ sıralaması elde edildiği görülmektedir. Keten tohumu yağı örneğinin tiyobarbütirik asit sayısı miktarının oksidasyonun 16. gününe kadar arttığını ancak 16-20. günler arasında tiyobarbütirik asit sayısı miktarının azaldığı gözlemlenmektedir. Bu durumun oksidasyonun 16. gününe kadar keten tohumu yağı örneğinde ikincil oksidasyon

ürünleri oluşumunun arttığı, 16-20. günler arasında ise oluşan ikincil oksidasyon ürünlerinin başka bozulma ürünlerine dönüştüğü ve ikincil oksidasyon ürünleri oluşum hızının bozulma hızından daha düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer durum peroksit sayısı sonuçlarında da gözlemlenmişti. Çizelge 4.3 incelendiğinde bitki ekstraktlarının bulunduğu üzüm çekirdeği, biberiye, nar kabuğu örnekleri ile standart olarak kullanılan gallik asit içeren örnek karşılaştırıldığında, biberiye ile gallik asit örneklerinin tiyobarbitürik asit sayısı değerlerinin yakın olduğu gözlemlenirken; nar kabuğu örneğinin daha yüksek ve üzüm çekirdeği örneğinin ise daha düşük tiyobarbitürik asit sayısı değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

Turgut ve ark. [113], nar kabuğu ekstraktının soğuk hava depolarında sığır eti köftelerinde lipid ve protein oksidasyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. 8 günlük depolamadan sonra kontrole kıyasla nar kabuğu ekstraktı ilave edilen numunelerin tiyobarbitürik asit reaktif maddelerin miktarının ve peroksit oluşumunun düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Nar kabuğu ekstraktının lipid oksidasyonu üzerine inhibitör etkisinin antioksidan aktivite gösteren fenolik maddelerin, oksidasyon esnasında oluşan radikal zincir reaksiyonlarını inhibe etmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Nar kabuğu ekstraktının soğutmalı depolama sırasında köftelerin kalite özellikleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada [114] ise depolama sırasında liyofilize nar kabuğu içeren numunelerin TBARS değerinin kontrolden ve BHT içeren numunelerden daha düşük olduğu bildirilmiştir. Bu durumun nar kabuğunda antioksidan aktivite gösteren fenolik bileşiklerin oksidasyon sırasında oluşan radikallerin zincir reaksiyonlarını bloke ederek oksidasyonu geciktirmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Biberiye ekstraktı ve α - tokoferolün sardalye yağı model sisteminde sinerjistik antioksidan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada [115], α - tokoferol (%0.05) ve biberiye ekstraktı (%0.02) karışımı bulunan örneklerin hem α - tokoferol bulunan örneklerden hem de biberiye ekstraktı bulunan örneklerden daha yüksek antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada [105], bu durumun biberiye ekstraktında bulunan fenolik bileşenlerin (karnosol ve rosmarinik asit) tokoferollerle sinerjistik bir etki göstermesinden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Biberiye ekstraktının Hindistan'da popüler bir süt ürünü olan gheenin oksidatif stabilitesi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada ise oksidasyona bırakılan numunelerden biberiye ekstraktı bulunan numunelerin en düşük TBARS değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Söz konusu

durumun biberiye ekstraktında bulunan karnosik asit ve karnosolün depolama sırasında lipid oksidasyonunu inhibe etmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir [116].

Carpenter ve ark. [117], çiğ ve pişmiş domuz etlerinde, üzüm çekirdeği ve yabamersini ekstraktlarının antioksidan potansiyelini araştırmışlardır. Üzüm çekirdeği ekstraktı ve yaban mersini ilave edilen çiğ ve pişmiş domuz eti köftelerinde kontrole kıyasla lipid oksidasyonunu (TBARS) azalttıklarını gözlemlemişlerdir. Üzüm çekirdeği ekstraktının lipid oksidasyonu üzerindeki koruyucu etkisinin içeriğinde bulunan kateşin ve epikateşin gibi prosiyanidinlerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Dana köftesinin oksidatif stabilitesi üzerine antioksidanların etkisinin araştırıldığı bir çalışmada [118], üzüm çekirdeği ekstraktı ile muamele edilen numunelerin en düşük TBARS değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Söz konusu durumun üzüm çekirdeği ekstraktında bulunan önemli fenolik bileşikler olan proantosiyaniminlerden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında keten tohumu yağının raf ömrünü uzatmak amacıyla kullanılan üzüm çekirdeği, biberiye ve nar kabuğu ekstraktlarının oksidasyon boyunca keten tohumu yağı örneğine kıyasla oksidatif stabilitelerinin daha yüksek olduğu hem PV hem de TBARS sonuçlarında gözlemlenmiştir. Daha önce bu ekstraktlar ile ilgili yapılan çalışmalarda da bu tez kapsamında bulunan sonuçlar ile benzer sonuçlar kaydedilmiştir.

4.5. Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Örneklerin oksidasyon süresi boyunca antioksidan kapasitelerinde meydana gelen değişiklikler belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5 incelendiğinde 0. günde tüm örneklerin antioksidan kapasitesinin 10.915-21.612 mg α - tokoferol/kg yağ aralığında olduğu ancak oksidasyon süresi arttıkça tüm örneklerin antioksidan kapasitelerinde önemli düzeyde azalma olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Ayrıca 0. günde örneklerin antioksidan kapasite değerleri büyükten küçüğe doğru gallik asit > biberiye > üzüm çekirdeği > nar kabuğu > α - tokoferol > pgpr+yağ > kontrol > keten tohumu yağı şeklinde olduğu görülmektedir. Bu sıralamaya bakıldığında kontrol ve pgpr+yağ numunelerinin keten tohumu yağına göre daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.5. Belirli periyotlarda alınan örneklerin ABTS değerleri

Gün	Kontrol (Pgpr+yağ+su)	Pgpr+yağ	Keten tohumu yağı	α -Tokoferol	Üzüm çekirdeği	Nar kabuğu	Biberiye	Galilik asit
0	11.695 $\pm$ 0.372 ^{lB}	12.391 $\pm$ 0.293 ^{dC}	10.915 $\pm$ 0.182 ^{eA}	14.316 $\pm$ 0.166 ^{dD}	15.041 $\pm$ 0.580 ^{eEF}	14.705 $\pm$ 0.212 ^{aDE}	15.423 $\pm$ 0.146 ^{h,F}	21.612 $\pm$ 0.147 ^{lG}
4	10.991 $\pm$ 0.306 ^{efC}	11.938 $\pm$ 0.454 ^{dD}	7.364 $\pm$ 0.849 ^{dA}	10.026 $\pm$ 0.071 ^{cB}	15.026 $\pm$ 0.140 ^{eE}	14.311 $\pm$ 0.206 ^{eE}	14.293 $\pm$ 0.346 ^{g,E}	16.807 $\pm$ 0.216 ^{aF}
8	10.679 $\pm$ 0.202 ^{eC}	11.788 $\pm$ 0.198 ^{dD}	7.292 $\pm$ 0.201 ^{dA}	9.424 $\pm$ 0.276 ^{cB}	14.899 $\pm$ 0.280 ^{eF}	13.927 $\pm$ 0.279 ^{eE}	13.554 $\pm$ 0.291 ^{fE}	15.501 $\pm$ 0.884 ^{dF}
12	7.802 $\pm$ 0.458 ^{dC}	11.700 $\pm$ 0.284 ^{dD}	5.360 $\pm$ 0.144 ^{cA}	6.342 $\pm$ 0.265 ^{bB}	14.324 $\pm$ 0.273 ^{de,F}	11.597 $\pm$ 0.344 ^{dD}	13.000 $\pm$ 0.146 ^{eE}	13.802 $\pm$ 0.215 ^{cF}
14	5.990 $\pm$ 0.460 ^{cB}	5.432 $\pm$ 0.298 ^{cB}	4.051 $\pm$ 0.199 ^{bA}	3.793 $\pm$ 0.229 ^{aA}	13.786 $\pm$ 0.372 ^{dE}	8.474 $\pm$ 0.580 ^{cC}	11.483 $\pm$ 0.276 ^{dD}	11.363 $\pm$ 0.340 ^{b,D}
16	3.662 $\pm$ 0.104 ^{b,A}	4.464 $\pm$ 0.520 ^{b,B}	3.957 $\pm$ 0.138 ^{b,AB}	3.509 $\pm$ 0.407 ^{aA}	12.882 $\pm$ 0.134 ^{cF}	5.584 $\pm$ 0.200 ^{b,C}	7.446 $\pm$ 0.136 ^{cE}	6.790 $\pm$ 0.151 ^{a,D}
18	3.325 $\pm$ 0.255 ^{b,A}	4.425 $\pm$ 0.281 ^{b,B}	3.730 $\pm$ 0.355 ^{ab,A}	3.185 $\pm$ 0.165 ^{aA}	11.971 $\pm$ 0.133 ^{b,D}	4.857 $\pm$ 0.211 ^{b,B}	6.304 $\pm$ 0.140 ^{b,C}	6.657 $\pm$ 0.351 ^{a,C}
20	1.806 $\pm$ 0.622 ^{a,A}	1.831 $\pm$ 0.339 ^{aA}	2.887 $\pm$ 0.547 ^{a,B}	3.122 $\pm$ 0.513 ^{aB}	7.427 $\pm$ 0.191 ^{aE}	3.638 $\pm$ 0.410 ^{a,B}	4.836 $\pm$ 0.213 ^{a,C}	5.943 $\pm$ 0.136 ^{a,D}

Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır (n=2). Küçük harflerle gösterilen indisler aynı satırdaki, büyük harflerle gösterilen indisler ise aynı sütunda verilen ortalamaların istatistiksel grubunu göstermektedir ($P<0.05$).

Bu durumun kullanılan PGPR yüzey aktif maddesinin antioksidan içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Pgpr+yağ örneğinin TBARS ve peroksit sayısı keten tohumu yağı örneğine kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmişti (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.5).

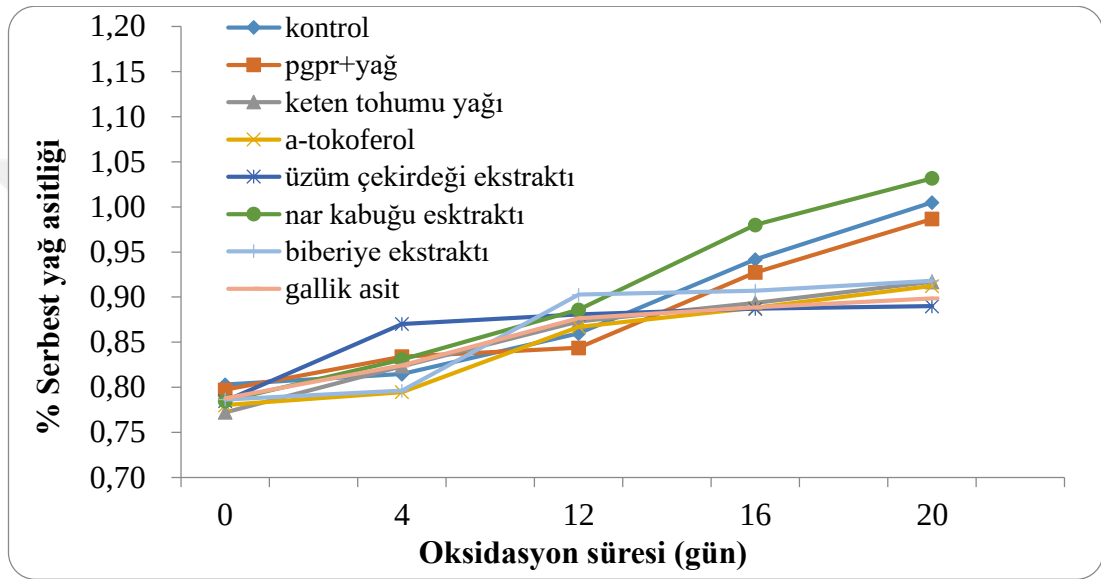
Oksidasyon süresi sonunda yani 20.günde örneklerin antioksidan kapasite değerlerine bakıldığında sırasıyla üzüm çekirdeği> gallik asit > biberiye > nar kabuğu $\geq$ α - tokoferol $\geq$ keten tohumu yağı > Pgpr+yağ $\geq$ kontrol şeklinde olduğu görülmektedir. Bu sıralama ile 0. günde elde edilen sıralama karşılaştırıldığında antioksidan kapasite değerinde en az azalma görülen örneğin üzüm çekirdeği olduğu görülmektedir. Çizelge 4.6 incelendiğinde ise oksidasyon boyunca genellikle bitki ekstraktları (nar kabuğu, biberiye, üzüm çekirdeği) bulunan numunelerin antioksidan kapasitesinin tüm numunelerden daha yüksek olduğu ancak üzüm çekirdeği ekstraktının diğer numunelere (gallik asit hariç) kıyasla en yüksek antioksidan kapasiteye sahip numune olduğu görülmektedir. Söz konusu durumun üzüm çekirdeği ekstraktının toplam fenolik madde miktarının ve antioksidan aktivitesinin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'ye bakınız).

Örneklerin antioksidan kapasite sonuçları, peroksit sayısı ve TBARS sonuçları karşılaştırıldığında, bitki ekstraktları bulunan örneklerin diğer tüm örneklerle kıyasla (gallik asit örneği hariç) oksidasyon süresince daha düşük peroksit sayısı, TBARS değerlerine ve yüksek antioksidan kapasiteye sahip oldukları gözlemlenmiştir. Bitki ekstraktları bulunan örnekler içerisinde oksidasyon boyunca en yüksek oksidatif stabilite ve antioksidan kapasiteye sahip örneğin üzüm çekirdeği örneği olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten tüm örneklerde oksidasyon süresi arttıkça antioksidan kapasitenin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca oksidasyonun başlangıcında en düşük antioksidan kapasiteye sahip örneğin keten tohumu yağı olduğu, pgpr+yağ örneğinin ise antioksidan kapasitesinin keten tohumu yağı örneğine kıyasla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Pgpr+yağ örneğinin peroksit sayısı ve TBARS sonuçlarını incelediğimizde keten tohumu yağı örneğine kıyasla daha geç okside olduğunu görülmektedir. Bu durumun antioksidan kapasite sonuçlarında görüldüğü üzere pgpr+yağ örneğinin antioksidan kapasitesinin keten tohumu örneğine kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

4.6. Serbest Yağ Asitliği

Örneklerin oksidasyon süresi boyunca %serbest yağ asitliğinde meydana gelen değişiklikler Şekil 4.13 ve Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6 incelendiğinde 0. günde tüm örneklerin serbest yağ asitliğinin %0.772-0.803 gibi düşük bir miktarda bulunduğu ancak oksidasyon süresi arttıkça tüm örneklerin serbest yağ asitliği oranlarında önemli düzeyde bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$).



Şekil 4.13. Örneklerin oksidasyon süresince serbest yağ asitliklerinde meydana gelen değişiklikler

Örneklerin günlere göre değişimi gözlemlendiğinde ise 0.günde örneklerin arasında önemli bir farklılığın olmadığı belirlenirken ($P>0.05$); diğer oksidasyon sürelerinde ise örnekler arasında genellikle önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Örneklerin 20 günlük oksidasyon sonundaki %serbest yağ asidi değerlerinin günlere göre değişimi gözlemlendiğinde nar kabuğu, kontrol ve pgpr+yağ örneklerinin %serbest yağ asitlikleri arasında önemli bir farklılığın olmadığı görülmektedir ($P<0.05$). Aynı şekilde biberiye, keten tohumu yağı, α -tokoferol, gallik asit ve üzüm çekirdeği örneklerinin %serbest yağ asitliklerinde de önemli derecede bir farklılığın olmadığı görülmektedir ($P<0.05$).

Çizelge 4.6. Belirli periyotlarda alınan örneklerin % serbest yağ asitlik değerleri (% oleik asit)

Gün	Kontrol (Pgpr+yağ+su)	Pgpr+yağ	Keten tohumu yağı	α -Tokoferol	Üzüm çekirdeği	Nar kabuğu	Biberiye	Galilik asit
0	0.803 $\pm$ 0.024 ^{a,A}	0.797 $\pm$ 0.015 ^{a,A}	0.772 $\pm$ 0.020 ^{a,A}	0.780 $\pm$ 0.000 ^{a,A}	0.785 $\pm$ 0.007 ^{a,A}	0.785 $\pm$ 0.002 ^{a,A}	0.786 $\pm$ 0.000 ^{a,A}	0.788 $\pm$ 0.002 ^{a,A}
4	0.815 $\pm$ 0.049 ^{a,A}	0.834 $\pm$ 0.012 ^{ab,AB}	0.823 $\pm$ 0.011 ^{ab,AB}	0.795 $\pm$ 0.006 ^{a,A}	0.870 $\pm$ 0.010 ^{b,B}	0.831 $\pm$ 0.026 ^{ab,AB}	0.796 $\pm$ 0.009 ^{a,A}	0.824 $\pm$ 0.012 ^{a,AB}
12	0.860 $\pm$ 0.014 ^{a,AB}	0.844 $\pm$ 0.007 ^{b,A}	0.873 $\pm$ 0.018 ^{bc,AB}	0.867 $\pm$ 0.005 ^{b,AB}	0.881 $\pm$ 0.005 ^{b,AB}	0.886 $\pm$ 0.045 ^{b,AB}	0.903 $\pm$ 0.022 ^{b,B}	0.877 $\pm$ 0.018 ^{b,AB}
16	0.942 $\pm$ 0.018 ^{b,C}	0.927 $\pm$ 0.021 ^{c,BC}	0.894 $\pm$ 0.008 ^{c,A}	0.888 $\pm$ 0.005 ^{c,A}	0.887 $\pm$ 0.000 ^{b,A}	0.980 $\pm$ 0.019 ^{c,D}	0.907 $\pm$ 0.002 ^{b,AB}	0.889 $\pm$ 0.003 ^{b,A}
20	1.005 $\pm$ 0.010 ^{b,B}	0.987 $\pm$ 0.016 ^{d,B}	0.917 $\pm$ 0.049 ^{c,A}	0.912 $\pm$ 0.011 ^{d,A}	0.890 $\pm$ 0.013 ^{b,A}	1.032 $\pm$ 0.002 ^{c,B}	0.918 $\pm$ 0.002 ^{b,A}	0.899 $\pm$ 0.023 ^{b,A}

Sonuçlar iki tekerrür ortalamasıdır (n=2). Küçük harflerle gösterilen indisler aynı satırdaki, büyük harflerle gösterilen indisler ise aynı sütunda verilen ortalamaların istatistiksel grubunu göstermektedir ($P < 0.05$).

Pgpr+yağ, keten tohumu yağı, üzüm ve nar örneklerinin oksidasyonun 0. gününden sonra serbest yağ asitliğinde önemli düzeyde bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Gallik asit ve α - tokoferol örneklerinde 4.günden itibaren, kontrol örneğinde ise 12. gününden sonra serbest yağ asitliğinde önemli düzeyde bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$).

Abd-Allah ve ark. [109], nar ve portakal kabuğu ekstraktlarının yenilebilir yağların (ayçiçek ve soya fasulyesi yağı) oksidatif stabilitesi üzerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Nar ve portakal kabuğu ekstraktlarının ilave edildiği numunelerin kontrol numunesine kıyasla daha düşük FFA değerine sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak bu tez kapsamında depolama sonucunda nar kabuğu ekstraktı ilave edilen örnek ile kontrol örneğinin benzer FFA değerlerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Söz konusu durumun mikroemülsiyeye keten tohumu yağı örneklerinde su bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Reddy ve ark. [119], üzüm çekirdeği ekstraktının soğutulmuş depolama ($+4/-1^{\circ}\text{C}$) sırasında aerobik ve vakumlu paketlenme koşulları altında koyun eti dilimlerinin (RSM) oksidatif ve mikrobiyal stabilitesi üzerine etkisini belirlemeye çalışmışlardır. Üzüm çekirdeği ekstraktı ile muamele edilen RMS, kontrol ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ile muamele edilmiş RMS ile karşılaştırıldığında, daha düşük serbest yağ asidi (FFA) değerlerine sahip olduğunu bildirilmiştir. Üzüm çekirdeği ekstraktının düşük FFA değerine sahip olmasının nedeninin antimikrobiyal aktivitesinden kaynaklandığı bildirilmiştir.

Serdaroğlu ve Felekoğlu [120], yaptıkları çalışmada sardalya kıymasının oksidatif stabilitesi üzerine biberiye ekstraktı ve soğan suyunun etkisini araştırmışlardır. Biberiye ekstraktı ile muamele edilen sardalye kıyması depolama sırasında FFA seviyelerinde azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışma kapsamında oksidasyona bırakılan örneklerin içerisindeki materyallerin bileşimi ve su içeriklerine bağlı olarak sıcaklık uygulamasıyla suyun yağdaki çözünürlüğü artmakta ve bunun sonucu olarak ester bağları bozularak hidroliz gerçekleşmektedir. Diğer bir deyişle hidrolizin gerçekleşmesinde rol oynayan başlıca iki faktör su içeriği ve sıcaklık derecesidir. Bu sebeple, kullanılan antioksidanların hidroliz mekanizmasında etkisinin olması beklenmemelidir. Ancak örneklerle ilave

edilen su miktarına ek olarak kullanılan antioksidan ve bitki ekstraktlarında bulunabilecek bir miktar nemin hidroliz mekanizmasına etkisi söz konusu olabilecektir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Keten tohumu yağının bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılması gibi olumlu etkilerinden dolayı gün geçtikçe ülkemizde tüketimi artmakla beraber üretimi de artmaktadır. Bu ürünü değerli yapan en önemli nokta içerdiği omega-3 yağ asitlerinin varlığı ve miktarıdır. Sınırlı sayıda bitkisel yağlarda bulunan omega-3 yağ asitlerinin insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Ancak omega yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleri olduğundan oksidatif stabiliteyi düşüktür ve dolayısıyla bulundukları bitkisel yağların raf ömrünü olumsuz etkilemektedirler. Keten tohumu yağının da düşük oksidatif stabiliteye sahip olması yapısında bulunan omega yağ asitlerinden kaynaklanmaktadır.

Yağlarda oksidasyonun gerçekleşme hızı yağın yağ asidi bileşimi ve içerdiği antioksidan miktarına bağlıdır. Yağın bileşiminde herhangi bir değişiklik yapmadan oksidasyona karşı korumak için dışarıdan antioksidan ilave etmek gerekmektedir. Bu amaçla genellikle non-polar özellikte ve sentetik antioksidanlar olan BHT ve BHA gibi bileşikler kullanılmaktadır. Bu sentetik antioksidanların sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanımları kısıtlanmakla birlikte alternatif olarak doğal antioksidan olan tokoferoller daha çok kullanılmaktadır. Ancak son zamanlarda yağların oksidasyonunu geciktirmede polar antioksidanların non-polar antioksidanlara kıyasla daha etkili oldukları görülmektedir. Fakat polar antioksidanlar yağlardaki çözünürlükleri kısıtlı olduğundan bu durum yağ içinde su emülsiyonları oluşturularak giderilmektedir. Bu bakımdan, çalışmamızda mikroemülsiyon keten tohumu yağının oksidatif stabilitesine polar antioksidanların etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla; mikroemülsiyon keten tohumu yağında sıcakta depolama boyunca oksidasyon belirleme testleri (peroksit sayısı, TBARS), %serbest yağ asitliği, antioksidan kapasite testleri yapılarak en yüksek antioksidan aktiviteye sahip bitki ekstraktı/ ekstraktları belirlenmiştir.

Bu tez kapsamında aşağıda ifade edilen sonuçlar çıkarılmıştır;

- ✓ Soğuk pres ile elde edilen keten tohumu yağında bazı bileşimler analizler yapılarak keten tohumu yağında en yüksek oranda bulunan yağ asidinin linolenik asit ve en yüksek oranda bulunan tokoferolün ise γ -tokoferol olduğu tespit edilmiştir.

- ✓ Bitki ekstraktların içerisinde en yüksek toplam fenolik madde miktarına ve en yüksek antioksidan kapasiteye sahip ekstraktın üzüm çekirdeği ekstraktı olduğu ve bunu sırasıyla nar kabuğu ekstraktı ve biberiye ekstraktının izlediği tespit edilmiştir.
- ✓ Mikroemülsiyon keten tohumu yağına yapılan peroksit sayısı ve TBARS analizleri sonucunda oksidasyon süresi arttıkça tüm mikroemülsiyon gruplarının oksidasyonunun arttığı ancak bitki ekstraktları ve gallik asit ilave edilen mikroemülsiyon gruplarındaki oksidatif stabilitenin diğer gruplara kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bitki ekstraktı ilave edilen mikroemülsiyon grupları içerisinde ise en yüksek oksidatif stabiliteye sahip mikroemülsiyon grubunun üzüm çekirdeği ekstraktı ilave edilen mikroemülsiyonlar olduğu belirlenmiştir. α - tokoferol ilave edilen mikroemülsiyon grubunda ise polar antioksidan ilave edilen örneklerle kıyasla daha düşük oksidatif stabilite gösterdiği gözlemlenmiştir.
- ✓ Oksidasyona bırakılan mikroemülsiyon keten tohumu yağı örneklerinde, oksidasyon süresince örneklerin antioksidan kapasite değişimi gözlemlenerek oksidasyon ilerledikçe örneklerin antioksidan kapasitelerinin azaldığı belirlenmiştir. Oksidasyon boyunca örneklerin antioksidan kapasite değişimleri gözlemlendiğinde ise en az antioksidan kapasite değişiminin üzüm çekirdeği ekstraktı içeren emülsiyonda olduğu belirlenmiştir.
- ✓ Oksidasyona bırakılan mikroemülsiyon keten tohumu yağı örneklerinde oksidasyon süresince örneklerde renk değişimi olduğu gözlemlenerek oksidasyon süresi arttıkça okside olan örneklerin renklerinde kayıplar olduğu emülsiyonun asıl rengi olan sarı renkten beyaz renge doğru renk açılması olduğu tespit edilmiştir.
- ✓ Oksidasyon süresi boyunca mikroemülsiyon keten tohumu yağı örneklerinde yapılan %serbest yağ asitliği analizinde ise tüm örnek gruplarında oksidasyon süresi arttıkça bu parametrelerin arttığı gözlemlenmiştir.
- ✓ Hazırlanan mikroemülsiyon keten tohumu yağı örneklerinde partikül boyutu analizi yapıldığında ise keten tohumu yağının viskozitesinin yüksek olmasından ve emülsiyonun az miktarda su içermesinden dolayı emülsiyondaki su partiküllerinin boyutu ölçülemediği. Ancak mikroemülsiyonların berrak olduğu bilindiğinden elde edilen emülsiyonların fotoğrafları kaydedildiğinde emülsiyonların berrak oldukları tespit edilmiştir.

İnsan nüfusu ve sağlıklı beslenme ihtiyacının artmasıyla birlikte bitkisel yağların tüketimi de artmaktadır. Ancak keten tohumu yağı gibi biyoaktif bileşenlerce zengin olan bitkisel yağların çoğu tüketiciye ulaştırılırken okside olmakta ve bu sorun beraberinde kötü tat ve kokulara neden olmaktadır. Biyoaktif bileşenlerce zengin olan keten tohumu yağı ve diğer bitkisel yağlarda meydana gelen bu olumsuzlukları engellemek, elde edilen tazelikte tüketiciye ulaştırmak, raf ömürlerini arttırmak bununla birlikte bu yağların ticari olarak değer kazanması için üzerinde yapılan çalışmaların ve araştırmaların artırılması gerekmektedir.

Biyoaktif bileşenlerce zengin olan keten tohumu yağının oksidasyonunu engellemek ve geciktirmek için kullanılan biberiye, nar kabuğu ekstraktı ve üzüm çekirdeği ekstraktları veya antioksidan aktiviteleri yüksek başka bitki ekstraktları diğer bitkisel yağlarda da aynı amaç için aynı yöntemle uygulanabilir.

6. KAYNAKÇA

- [1] H. İşleroğlu ve Z. Yıldırım, M. Yıldırım, *Fonksiyonel bir gıda olarak keten tohumu*, **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 22:2 (2005) 23-30.
- [2] K.K. Singh, D. Mrdula and J. Rehal, *Flaxseed: a potantiel source of food, feed and fiber*, **Food Science and Nutrition**, 51:3 (2011) 210-222.
- [3] İsmail Tontul, *Keten tohumu yağını püskürterek kurutmaya mikroenkapsülasyonu üzerine farklı taşıyıcı madde ve emülsiyon uygulamalarının etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Türkiye, 2011.
- [4] Sena Pekşen, *Depolama süresinin mikroenkapsüle edilmiş keten tohumu yağı ile zenginleştirilmiş yoğurtlarda oksidatif stabilite üzerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Türkiye, 2018.
- [5] A. Ramcharitar, N. Badrie and M. Mattfeldt-Beman, *Consumer acceptability of muffins with flaxseed (Linum usitatissimum)*, **Journal of Food Science**, 70:7 (2005) 504-507.
- [6] Turgay Coşkun, *Fonksiyonel besinlerin sağlığımız üzerine etkileri*, **Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi**, 48:1 (2005) 61-84.
- [7] LeAnne T. Bloedon and Philippe O. Szarpary, *Flaxseed and cardiovascular risk*, **Nutrition reviews**, 62:1 (2004) 18-27.
- [8] Ayhan Baştürk ve Bahattin Tabar, *Farklı bitkisel ekstraktların ayçiçek yağının oksidatif stabilitesi üzerine etkileri*, **Gıda/The Journal of Food**, 43:2 (2018) 333-346.
- [9] Thaddao Waraho, D. Julian McClements and Eric A. Decker, *Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions*, **Trends in Food Science & Technology**, 22:1 (2011) 3-13.
- [10] E. N. Frankel, S. Huang, J. Kanner and J. B. German, *Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42:5 (1994) 1054-1059.
- [11] Douglas G. Dalgleish, *Food emulsions—their structures and structure-forming properties*, **Food Hydrocolloids**, 20:4 (2006) 415-422.
- [12] D. Julian McClements, *Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities*, **Soft Matter**, 8:6 (2012) 1719-1729.
- [13] P.M. Kris-etherton, D.S. Taylor, S. Yu-poth, P. Huth, K. Moriarty and V. Fishell, *Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States*, **American Journal of Clinical Nutrition**, 71:1 (2000) 179-188.

- [14] A.P. DeFilippis and L.S. Sperling, *Understanding omega-3's*, **American Heart Journal**, 151:3 (2006) 564-570.
- [15] P. Trumbo and S. Schlicke, *Dietary Reference Intakes For Energy, Carbonhydrat, Fiber, Fat, Fatty Acids,Cholesterol, Protein and Amino Acids*, **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, 102:11 (2002), 1621.
- [16] Sheila M. Innis, *Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain*, **Brain Research**, 1237 (2008) 35-43.
- [17] Julie M. Martin and Renee D. Stapleton, *Omega-3 fatty acids in critical illness*, **Nutrition Reviews**, 68:9 (2010) 531-541.
- [18] Aliza H. Stark, Michael A. Crawford and Ram Reifen, *Update on alpha-linolenic acid*, **Nutrition Reviews**, 66:6 (2008) 326-332.
- [19] Penny M. Kris-Etherton, William S. Harris and Lawrence J. Appel, *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*, **Circulation**, 106:21 (2002) 2747-2757
- [20] Charlotte Jacobsen, M. B. Let, N. S. Nielsen and A. S. Meyer *Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation*, **Trends in Food Science Technology**, 19:2 (2008) 76-93.
- [21] Eunok Choe and David B. Min, *Mechanisms and factors for edible oil oxidation*, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 5:4 (2006) 169-186.
- [22] Kübra Şişlioğlu, *Isıl işlem gören bazı et ürünlerinin lipid fraksiyonlarında meydana gelen bazı değişimlerin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2012.
- [23] Gökhan Durmaz, *Kayısı Çekirdeği Yağının Oksidatif Stabilitesi ve Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2008.
- [24] Sevilay Gürsul, *Dondurularak kurutulan mikrokapsüle ceviz yağında timol ve karvakrol'ün antioksidan etkisinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2018.
- [25] Edwin N. Frankel, *Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 61:12 (1984) 1908-1917.
- [26] Sibel Uluata, *Bazı bitkisel yağların karakterizasyonu*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye , 2010.

- [27] A. Lips, R. A. Chapman, and W. D. McFarlane, *The application of the ferric thiocyanate method to the determination of incipient rancidity in fats and oils*, **Oil and Soap**, 20:11 (1943) 240-243.
- [28] R. Guillen-Sans and M. Guzman-Chozas, *The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a reviews*, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 38:4 (1998) 315-350.
- [29] İlhami Gülçin, *Antioxidant activity of food constituents: an overview*, **Archives of Toxicology**, 86:3 (2012) 345-391.
- [30] Marian Valko et al, *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, **Chemico-biological interactions**, 160:1 (2006) 1-40.
- [31] İlbilge Saydamlı, *Gıda Kimyası*, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2014.
- [32] Eunok Choe, and David B. Min, *Mechanisms and factors for edible oil oxidation*, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 5:4 (2006) 169-186.
- [33] Sümeyye Atalan, *Mısırözü Yağı Deodorizasyon Distilatından Tokoferol Vitamerlerinin İzolasyonu*, Yüksek LisanS Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2018.
- [34] Özgül Özer, *Farklı Antioksidan İlavesinin Dondurarak Muhafaza Edilen Mekanik Ayrılmış Piliç Eti Köftelerinin Bazı Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Türkiye, 2008.
- [35] F. Fine, C. Brochet, M. Gaud, P. Carre, N. Simon, F. Ramli & F. Joffre, *Micronutrients in Avegetable oils: the impact of crushing and refining processes on vitamins and antioxidants in sunflower, rapeseed, and soybean oils*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 118:5 (2016) 680-697.
- [36] Wen-Wu Zhou, De-Huai Qin, and Jun-Qing Qian, *Optimisation of enzymatic pretreatment of soybean oil deodoriser distillate for concentration of tocopherols*, **International Journal of Food Science & Technology**, 44:7 (2009) 1429-1437.
- [37] E. Gimeno, A. I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventos, M.C. De La Torre & M.C. Lopez-Sabater, *Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography*, **Journal of Chromatography**, A 881:1-2 (2000) 251-254.
- [38] P.F. Martins, C.B. Batistella, R. Maciel-Filho & M.R. Wolf-Maciel, *Comparison of two different strategies for tocopherols enrichment using a molecular distillation process*, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 45:2 (2006) 753-758.

- [39] Sevil Albayrak, Osman Sağdıç and Ahmet Aksoy, *Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler*, **Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi**, 26:4 (2010) 401-409.
- [40] Earl G. Hammond, and Pamela J. White, *A brief history of lipid oxidation*, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 88:7 (2011), 891-897.
- [41] Mickaël Laguerre, Christelle Bayrasy, Atikorn Panya, Jochen Weiss, D. Julian McClements, Jérôme Lecomte, Eric A. Decker & Pierre Villeneuve, *What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox*, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 55:2 (2015) 183-201.
- [42] Özlem Emir Çoban and B. Patır, *Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı*, **Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi**, 5:2 (2010),7-19.
- [43] Cansu Topkaya, *Nar kabuğu tozu ilavesinin keklerin besinsel, duyu ve mikrobiyolojik özelliklerine etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Türkiye, 2017.
- [44] Şenay Sarıca, *Nar suyu yan ürünlerinin hayvan beslemede kullanım olanakları*, **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 2011:2 (2011).
- [45] Amir Gharib, Zohreh Faezizadeh and Masoud Godarzee, *Inhibition of telomerase activity and cell growth by free and nanoliposomal forms of punicalagin in human leukemia cell line K562*, **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 15:8 (2016) 1621-1630.
- [46] Dilara Konuk and Figen Korel, *Kurutma sıcaklığının üzüm çekirdeklerinin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesi üzerine etkisi*, **Pamukkale Univ Muh Bilim Dergisi**, 21:9 (2015) 404-407.
- [47] Onur Sevindik and Serkan Selli, *Üzüm Çekirdeklerinin Temel Biyoaktif Bileşenleri*, **Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi**, 31:2 (2016) 9-16.
- [48] A. C. Akalın, *Nar Şaraplarında Antioksidan Fenolik Bileşiklerin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Türkiye, 2011
- [49] N. Çelebi, *Modern farmasötik teknoloji*, TEB Eczacılık Akademisi Yayınları, Ankara, 2009, p. 391-400.
- [50] Ahmet Gökhan Ağgöl, *Zeytin yaprağı etil alkol ekstresi ve bundan izole edilen oleuropeinin emülsiyon formülasyonlarının diyabetik ratlar üzerine etkisinin incelenmesi*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Türkiye, 2017.

- [51] Emine Betül Akalın, *Berrak kayısı suyu eldesinde beta-karoten kazanımının artırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2016.
- [52] N. Çelebi, *Modern farmasötik teknoloji*, TEB Eczacılık Akademisi Yayınları, Ankara, 2009, p. 391-400.
- [53] Wei Lu, Alan L. Kelly, and Song Miao, *Emulsion-based encapsulation and delivery systems for polyphenols*, **Trends in Food Science & Technology**, 47 (2016) 1-9.
- [54] Ö. Güngör, A. Zungur, M. Koç & F. Kaymak-Ertekin, *Emülsiyonların Özellikleri ve Emülsifikasyon Koşullarının Aroma ve Yağların Mikroenkapsülasyonu Üzerine Etkisi*, **Academic Food Journal/Akademik GIDA**, 11:2 (2013).
- [55] Kübra Şişlioğlu, *Organojel yapısında lipid taşıyıcı partikül sistemlerin üretimi ve fonksiyonel özelliklerinin araştırılması*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Türkiye, 2019.
- [56] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar and M.J. Garcia-Celma, *Nano-emulsions*, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 10:3-4 (2005) 102-110.
- [57] Peerasak Sanguansri, and Mary Ann Augustin, *Nanoscale materials development—a food industry perspective*, **Trends in Food Science & Technology**, 17:10 (2006) 547-556.
- [58] John Flanagan and Harjinder Singh, *Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food*, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 46:3 (2006) 221-237.
- [59] Nicolas Anton, Jean-Pierre Benoit and Patrick Saulnier, *Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a reviews*, **Journal of Controlled Release**, 128:3 (2008) 185-199.
- [60] J.M. Gutiérrez, C. González, A. Maestro, I. Solè, C.M. Pey and J. Nolla, *Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation*, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 13:4 (2008) 245-251.
- [61] Qingrong Huang, Hailong Yu and Qiaomei Ru, *Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology*, **Journal of Food Science**, 75:1 (2010) R50-R57.
- [62] David Julian McClements, *Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance*, **Soft Matter**, 7:6 (2011) 2297-2316.
- [63] David Julian McClements, *Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities*, **Soft Matter**, 8:6 (2012) 1719-1729.

- [64] Jennifer S. Komaiko and David Julian McClements, *Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods*, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 15.2 (2016): 331-352.
- [65] Ankur Gupta, H. Burak Eral, T. Alan Hatton and Patrick S. Doyle, *Nanoemulsions: formation, properties and applications*, **Soft Matter**, 12:11 (2016) 2826-2841.
- [66] Maryam Kargar, *Emulsion design for protection of chemically sensitive bioactive ingredients*, Doctoral Dissertation, University of Birmingham, Britain, 2014.
- [67] Rabia Gemici, *Çeşitli sürfaktan karışımlarının yüzey gerilim ölçülerinin ve DNA üzerindeki etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Türkiye, 2011.
- [68] Laurier L. Schramm, Elaine N. Stasiuk and D. Gerrard Marangoni, *Surfactants and their applications*, **Annu. Rep. Prog. Chem**, 99 (2003) 3-48.
- [69] Gönül Hakyemez, *Ters Miseller : Özellikleri ve ilaç Teknolojisindeki Önemleri*, **FABAD J. Pharm. Sci**, 13 (1988), 461-470.
- [70] M. Laguerre, C. Bayrasy, A. Panya, J. Weiss, D.J. McClements, J. Lecomte & P. Villeneuve, *What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox*, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 55:2 (2015) 183-201.
- [71] P. S. Negi, and G. K. Jayaprakasha, *Antioxidant and antibacterial activities of Punica granatum peel extracts*, **Journal of Food Science**, 68:4 (2003) 1473-1477.
- [72] H. Yalcin, H. Kavuncuoglu, L. Ekici & O. Sagdic, *Determination of Fatty Acid Composition, Volatile Components, Physico-Chemical and Bioactive Properties of Grape (Vitis vinifera) Seed and Seed Oil*, **Journal of Food Processing and Preservation**, 41:2 (2017) e12854.
- [73] T.M. Rababah, S. Yücel, K.I. Ereifej, M.N. Alhamad, M.A. Al-Mahasneh, W. Yang & K. Ismael, *Effect of grape seed extracts on the physicochemical and sensory properties of corn chips during storage*, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 88:5 (2011) 631-637.
- [74] B. Sultana, F. Anwar, M.R. Asi & S.A.S. Chatha, *Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil*, **Grassas Y Acetites**, 59:3 (2008) 205-217.

- [75] A.F. Yeşilsu & G. Özyurt, *Oxidative stability of microencapsulated fish oil with rosemary, thyme and laurel extracts: A kinetic assessment*, **Journal of Food Engineering**, 240 (2019) 171-182.
- [76] S. Iqbal, S. Haleem, M. Akhtar, M. Zia-ul-Haq & J. Akbar, *Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions*, **Food Research International**, 41:2 (2008) 194-200.
- [77] A. Altunkaya, R.V. Hedegaard, J. Harholt, L. Brimer, V. Gökmen & L.H. Skibsted, *Oxidative stability and chemical safety of mayonnaise enriched with grape seed extract*, **Food & Function**, 4:11 (2013) 1647-1653.
- [78] S. Sekretar, L. Tmakova, S. Schmidt, F. Kreps & Z. Burcova, *Special products from the phytomass*, **Chemzi**, 11:2 (2018), 100.
- [79] A.L. Souza, F.B. Martínez, S.B. Ferreira & C.R. Kaiser, *A complete evaluation of thermal and oxidative stability of chia oil*, **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 130:3 (2017) 1307-1315.
- [80] Xujian Qiu, Charlotte Jacobsen, and Ann-Dorit Moltke Sørensen, *The effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract on the oxidative stability of lipids in cow and soy milk enriched with fish oil*, **Food Chemistry**, 263 (2018) 119-126.
- [81] B. Shan, Y.Z. Cai, J.D. Brooks & H. Corke, *Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese*, **Journal of Medicinal Food**, 14:3 (2011) 284-290.
- [82] S. Turan, A. Topcu, I. Karabulut, H. Vural & A.A. Hayaloglu, *Fatty acid, triacylglycerol, phytosterol, and tocopherol variations in kernel oil of Malatya apricots from Turkey*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55:26 (2007) 10787-10794.
- [83] Frank David, Pat Sandra, and Philip L. Wylie, *Improving the analysis of fatty acid methyl esters using retention time locked methods and retention time databases*, **Agilent Technologies-Application**, Agilent Technologies, Palo Alto, CA (2002).
- [84] Mehmet Ali Yılmaz and Gökhan Durmaz, *Mulberry Seed Oil: a Rich Source of δ -Tocopherol*, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 92:4 (2015) 553-559.
- [85] Meng-Han Chuang and Gerd Brunner, *Concentration of minor components in crude palm oil*, **The Journal of Supercritical Fluids**, 37:2 (2006) 151-156.

- [86] Gwendolyn M. Huber, HP Vasantha Rupasinghe and Fereidoon Shahidi, *Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides*, **Food Chemistry**, 117:2 (2009) 290-295.
- [87] Gökhan Durmaz, *Freeze-dried ABTS+ method: A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils*, **Food Chemistry**, 133:4 (2012) 1658-1663.
- [88] AOCS, Official methods and recommended practices of the american oil chemists' society, Champaign: **AOCS Pres**, Method Ti 3d-63.
- [89] Wee-Sim Choo, John Birch and Jean-Pierre Dufour, *Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils*, **Journal of Food Composition and Analysis**, 20:3-4 (2007) 202-211.
- [90] Oleg I. Shadyro, Anna A. Sosnovskaya and Irina P. Edimecheva, *Flaxseed oil stabilization using natural and synthetic antioxidants*, **European Journal of Lipid Science and Technology**, 119:10 (2017)1700079
- [91] Alessia Menina, Francesca Zanon, Martina Vakarelova, Roberto Chignola, Giulia Donà, Corrado Rizzia, Federica Mainentea and Gianni Zoccatelli, *Effects of microencapsulation by ionic gelation on the oxidative stability of flaxseed oil*, **Food Chemistry**, 269 (2018) 293-299.
- [92] Sibel Soykan Önenç and Zümrüt Açıkgöz, *Aromatik bitkilerin hayvansal ürünlerde antioksidan etkileri*, **Hayvansal Üretim**, 46:1 (2005).
- [93] Athira Mohanan, Michael T. Nickerson and Supratim Ghosh, *Oxidative stability of flaxseed oil: Effect of hydrophilic, hydrophobic and intermediate polarity antioxidants*, **Food Chemistry**, 266 (2018) 524-533.
- [94] Mukhtiar Ahmed, Jana Pickova, Taufiq Ahmad, Muhammad Liaquat, Abid Farid and Muhammad Jahangir, *Oxidation of Lipids in Foods*, **Sarhad Journal of Agriculture**, 32:3 (2016).
- [95] Andrew J. Young, and Gordon M. Lowe, *Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids*, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 385:1 (2001) 20-27.
- [96] Devinder Kaur, Dalbir Singh Sogi and Ali Abas Wani, *Oxidative stability of soybean triacylglycerol using carotenoids and γ -tocopherol*, **International Journal of Food Properties**, 18.12 (2015): 2605-2613.
- [97] T. El-Elmat, B.A. Jarwan, A. Zayed, A. Alhusban & M. Syouf, *Biochemical evaluation of selected grape varieties (Vitis vinifera L.) grown in Jordan and in vitro evaluation of grape seed extract on human prostate cancer cells*, **Food Bioscience**, 24 (2018) 103-110.

- [98] H. Özdemir, A. Soyer, Ş. Tağı & M. Turan, *Nar kabuğu ekstraktının antimikrobiyel ve antioksidan aktivitesinin köfte kalitesine etkisi*, **GIDA**, 39:6 (2014) 355-362.
- [99] F. Betül Zoral and Özlem Turgay, *Çeşitli gıda atıklarının toplam fenolik madde içeriğinin, antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin araştırılması*, **KSÜ Doğa Bilim Dergisi**, 17:2 (2014).
- [100] W. Yeddes, A. Chalghoum, W. Aidi-Wannes, R. Ksouri & M. Saidani Tounsi, *Effect of bioclimatic area and season on phenolics and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves*, **Journal of Essential Oil Research**, (2019).
- [101] Sabrina Neves Casarotti and Neuza Jorge, *Antioxidant activity of rosemary extract in soybean oil under thermoxidation*, **Journal of Food Processing and Preservation**, 38:1 (2014) 136-145.
- [102] E. Pastrana-Bonilla, C.C. Akoh, S. Sellappan & G. Krewer, *Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes*, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51:18 (2003) 5497-5503.
- [103] S. Madhav and D. Gupta, *A review on microemulsion based system*, **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 2:8 (2011) 1888.
- [104] B. Chen, J. Rao, Y. Ding, D.J. McClements & E.A. Decker, *Lipid oxidation in base algae oil and water-in-algae oil emulsion: Impact of natural antioxidants and emulsifiers*, **Food Research International**, 85 (2016) 162-169.
- [105] Y.Z. Wang, S.G. Fu, S. Y. Wang, D.J. Yang, Y.H.S. Wu & Y.C. Chen, *Effects of a natural antioxidant, polyphenol-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, on lipid stability of plant-derived omega-3 fatty-acid rich oil*, **LWT**, 89 (2018) 210-216.
- [106] Petra Terpinc, Miran Bezjak and Helena Abramovič, *A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts*, **Food Chemistry**, 115:2 (2009) 740-744.
- [107] F. Vlavec, M. Naimi, B. Murphy, T. Hudlicky & E. Tsiani, *Rosmarinic acid, a rosemary extract polyphenol, increases skeletal muscle cell glucose uptake and activates AMPK*, **Molecules**, 22:10 (2017) 1669.
- [108] Mariana-Atena Poiana, *Enhancing oxidative stability of sunflower oil during convective and microwave heating using grape seed extract*, **International Journal of Molecular Sciences**, 13:7 (2012) 9240-9259.

- [109] A.A. Islam, R. Mohamed, S. Abdelrahman, M. Dalia & E.B. Ahmed, *Oxidative stability of edible oils via addition of pomegranate and orange peel extracts*, **Foods and Raw Materials**, 6:2 (2018).
- [110] H. Özdemir, A. Soyer, Ş. Tağı & M. Turan, *Nar kabuğu ekstraktının antimikrobiyel ve antioksidan aktivitesinin köfte kalitesine etkisi*, **GIDA**, 39:6 (2014) 355-362.
- [111] T. Demir, Ö. Akpınar, H. Kara & H. Güngör, *Nar (Punica granatum L.) Kabuğunun İn Vitro Antidiyabetik, Antiinflamatuar, Sitotoksik, Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitesi*, **Akademik Gıda**, 17:1 (2019) 61-71.
- [112] M.I. Ibrahim, *Efficiency of pomegranate peel extract as antimicrobial, antioxidant and protective agents*, **World Journal of Agricultural Sciences**, 6:4 (2010) 338-344.
- [113] Sebahattin Serhat Turgut, Ayla Soyer and Fatma Işıkçı, *Effect of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage*, **Meat Science**, 116 (2016) 126-132
- [114] Mohamed K. Morsy, Enas Mekawi and Rasha Elsabagh, *Impact of pomegranate peel nanoparticles on quality attributes of meatballs during refrigerated storage*, **LWT** 89 (2018) 489-495.
- [115] Shun Wada and Xing Fang, *The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and α -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat*, **Journal of Food Processing and Preservation**, 16:4 (1992) 263-274.
- [116] M.P. Rahila, B. Surendra Nath, N. Laxmana Naik, H.A. Pushpadass, Manjunatha & M.E.E. Franklin, *Rosemary (Rosmarinus officinalis Linn.) extract: A source of natural antioxidants for imparting autoxidative and thermal stability to ghee*, **Journal of Food Processing and Preservation**, 42:2 (2018) e13443.
- [117] R. Carpenter, M.N. O'grady, Y.C. O'callaghan, N.M. O'brien & J.P. Kerry, *Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork*, **Meat Science**, 76:4 (2007) 604-610.
- [118] Paola Colindres and M. Susan Brewer, *Oxidative stability of cooked, frozen, reheated beef patties: effect of antioxidants*, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 91:5 (2011) 963-968.
- [119] G.B. Reddy, A.R. Sen, P.N. Nair, K.S. Reddy, K.K. Reddy & N. Kondaiah, *Effects of grape seed extract on the oxidative and microbial stability of restructured mutton slices*, **Meat Science**, 95:2 (2013) 288-294.
- [120] Meltem Serdaroğlu and Elvan Felekoğlu, *Effects of using rosemary extract and onion juice on oxidative stability of sardine (Sardina pilchardus) mince*, **Journal of Food Quality**, 28:2 (2005) 109-120.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyadı : Ayşe YILMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Adıyaman, 01.01.1995

E-Posta : ayseayse.ylmaz@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Lisans : İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi,
Gıda Mühendisliği (2012-2016)

Formasyon : İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Pedagojik
Formasyon Eğitimi (2016-2017)

Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı (2016-2019)