T.C.
KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

ORMAN KESİM ARTIKLARINDAN MİKRODALGA EKSTRAKSİYONU YÖNTEMİ (MEY) İLE DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER (DÖÇ) KULLANILARAK ELDE EDİLEN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN KARAKTERİZASYONU

DİDEM VEREP

DOKTORA TEZİ

PROF. DR. SAİM ATEŞ

ŞUBAT - 2024
KASTAMONU

TEZ ONAYI

Didem VEREP tarafından hazırlanan "**Orman Kesim Artıklarından Mikrodalga Ekstraksiyonu Yöntemi (MEY) İle Derin Ötektik Çözücüler (DÖÇ) Kullanılarak Elde Edilen Biyoaktif Bileşenlerin Karakterizasyonu**" adlı tez çalışmasının savunma sınavı **15.02.2024** tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Kastamonu Üniversitesi **Orman Endüstri Mühendisliği Ana Bilim Dalı Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Prof. Dr. Saim ATEŞ Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Zekeriya YERLİKAYA Kastamonu Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Prof. Dr. Ayben KILIÇ PEKGÖZLÜ Bartın Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Doç. Dr. Sezgin Koray GÜLSOY Bartın Üniversitesi	.....
Jüri Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Çağrı OLGUN Kastamonu Üniversitesi	.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Enstitü Müdürü Doç. Dr. Selçuk MEMİŞ .....

TAAHHÜTNAME

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu; ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını, bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini bildirir ve taahhüt ederim.

Didem VEREP

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ORMAN KESİM ARTIKLARINDAN MİKRODALGA EKSTRAKSİYONU YÖNTEMİ (MEY) İLE DERİN ÖTEKTİK ÇÖZÜCÜLER (DÖÇ) KULLANILARAK ELDE EDİLEN BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN KARAKTERİZASYONU

DİDEM VEREP

KASTAMONU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ORMAN ENDÜSTRİ MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
DANIŞMAN: PROF. DR. SAİM ATEŞ
EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. EYYÜP KARAOĞUL

Günümüzde orman kesim artıkları birçok ürünün hammadde ihtiyacını karşılamakta önemli bir potansiyel olarak görülmektedir. Doğada bırakılması halinde oluşturacağı olumlu etkilerle birlikte en önemli sakınca da olarak, büyük bir potansiyelin atıl kalması yanında, kuruduklarında oluşturacakları yüksek miktarlardaki biyokütlenin yangın risklerini artırmasıdır. Orman ağaçlarının yıllık sürgün ve dallarının ekstraktif bileşenleri ve karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmasına karşın son zamanlarda geliştirilen çevre dostu, enerji, maliyet ve zaman açısından etkili yeni çözücü ve ekstraksiyon yöntemlerinin geliştirilmesiyle biyokütle bileşiminin kalitatif ve kantitatif olarak ne şekilde bir değişim göstereceği, farklı çözücülerin bu değişime etkilerinin araştırılması ihtiyacı ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada karaçam (*Pinus nigra*), meşe (*Quercus robur*), göknar (*Abies nordmanniana*) ve kayın (*Fagus orientalis*) ağaçlarının ibre, yaprak ve sürgünlerinden oluşan orman kesim atıklarından, Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi (MEY) ile farklı Derin Ötektik Çözücüler (DÖÇ) ve organik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstrakt ve uçucu yağların karakterizasyonu ve antimikrobiyal aktiviteleri gerçekleştirilmiştir. Uçucu bileşenlerin analizi GS-MS-SPME analizi, uçucu olmayan bileşenlerin tayini ise LC-MS/MS analizleri ile yapılmıştır. Elde edilen her bir ekstraktın şeker ve organik asit içeriği HPLC analizi ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon öncesi ve sonrası yaprak yüzeyleri, SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile görüntülenmiştir. Elde edilen ekstraktların, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde miktarları standart metodlar ile belirlenmiştir. Ekstrakt ve uçucu yağların antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH, ABTS ve CUPRAC analizleri gerçekleştirilmiş süpürme, trolox ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, ekstrakt ve uçucu yağların, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa ve Bacillus cereus* suşlarına karşı disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri de belirlenmiştir.

Ekstraksiyon işlemi sonucunda, derin ötektik çözücülerin kullanıldığı ekstraktların verimleri %29,56-72,57 aralığında bulunmştur. Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinde, uçucu bileşen analizine göre sırasıyla %14,19; %14,42; %17,76 ve %25,80 ile en yüksek oranları veren 1R-α-pinene bileşenine rastlanmıştır. LC-MS/MS analizi ile ekstraktlarda tespit edilen 23 bileşen içerisinde; en yüksek sonuçları şikimik asit ve kateşin bileşenleri vermiştir. Şikimik asit de 263,203 µg/L ile en yüksek değeri veren etanol+Kç;

kateşin için ise 11,495 µg/L ile en yüksek sonucu veren etanol+M numuneleri olmuştur. Döç-3+K numunesi 195,948 g/L turanoz; döç-3+K numunesi ise 82,393 g/L maltoz ile ekstraktlar içerisindeki en yüksek şeker içeriğini vermiştir. Toplam fenolik madde içeriği bakımından metanol ve etanol çözücülerinden elde edilen ekstraktlar sırasıyla 77,238-237,637 mg/L ve 183,316-242,436 mg/L aralığındaki değerlerle en yüksek içeriği vermiştir. Toplam flavonoid madde içeriği bakımından da benzer şekilde en yüksek sonuçları 68,072-192,517 mg/L ve 153,628-222,114 mg/L aralığında değerler veren sırasıyla metanol ve etanol çözücülerden elde edilen ekstraktlar olmuştur. Toplam antosiyanin madde içeriğinde ise aseton+M ve metanol+M sırasıyla 1,920 mg/L; 0,818 mg/L ile en yüksek içeriğin görüldüğü ekstraktlar olmuştur. IC_{50} değerlerine göre, DPPH analizinde sırasıyla 5,18 mg/L ve 7,72 mg/L değerlerine veren aseton+K ve etanol+M; ABTS analizinde sırasıyla 1,79 mg/L ve 8,82 mg/L sonuçlarını veren döç-1+K ile saf su+G ekstraktları en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermiştir. CUPRAC analizinde ise etanol+K ve metanol+M ekstraktları sırasıyla 116,077 mg/L ve 111,311 mg/L ile en yüksek trolox sonucunu vererek en yüksek antioksidan aktiviteyi göstermişlerdir. Tüm numuneler içerisinde en yüksek antibakteriyel aktiviteyi, *B. cereus*'a karşı 15 mm'lik zon oluşturan etanol+G ekstraktı göstermiştir.

Sonuç olarak yüksek verimlerin elde edildiği derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların, odunun ana bileşeninde, degradasyonundan kaynaklı yüksek şeker içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Organik çözücülerden elde edilen ekstraktların derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre daha düşük verim göstermelerine rağmen yüksek polaritede olmaları sebebiyle bitkide fenolik bileşenleri çözme kabiliyetinin daha iyi olduğu düşünülmektedir. Fenolik bileşenlerce zengin olan ekstraktların yüksek antioksidan, antibakteriyel ve antifungal aktivitede oldukları tespit edilmiştir. Endüstriyel alanda kullanımı yaygın olan karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçların yapraklı yıllık sürgünlerinden çevre dostu, daha az enerji ve süre kullanımı ile elde edilen ekstraktların antioksidan, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri bakımından farmakolojide, kozmetik sanayisinde ve takviye gıda olarak kullanılabileceği önerilmektedir. Bu sayede endüstriyel orman kesim artıklarının özellikle sağlık sektöründe değerlendirilmesi ile, hem orman kesim artıklarının geri dönüşümle değerlendirilerek yangınlar için büyük risk oluşturan önemli bir etmenin ortadan kaldırılabilmesi hem de toplumun doğal ve organik esaslı ürün kullanımına yönelik talebinin karşılanmasında katma değerli ürünlerin üretiminde rahatlıkla değerlendirilebilir.

ANAHTAR KELİMELER: Karaçam, Meşe, Göknar, Kayın, DÖÇ, MEY, Antioksidan aktivite, Antimikrobiyal aktivite

Şubat 2024, 333 Sayfa

ABSTRACT

PH.D THESIS

CHARACTERISATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OBTAINED FROM FOREST TRIMMINGS BY MICROWAVE ASSISTED EXTRACTION (MAE) USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS (DES)

DİDEM VEREP

KASTAMONU UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
DEPARTMENT OF FOREST INDUSTRIAL ENGINEERING
SUPERVISOR: PROF. DR. SAİM ATEŞ
CO-SUPERVISOR: ASSOC PROF. DR. EYYÜP KARAOĞUL

Today, forest cutting residues are seen as having an important potential to meet the raw material needs of many products. In addition to the positive effects of leaving them in nature, the most important drawback is that a great deal of potential remains idle, and the high amount of biomass they will form when they dry out increases the risk of fire. Although there are studies on the extractive components and characterization of annual shoots and branches of forest trees, with the recent development of new environmentally friendly, energy-, cost-, and time-effective solvents and extraction methods, the need to investigate how the composition of biomass will change qualitatively and quantitatively and the effects of different solvents on this change has emerged.

In this study, characterization and antimicrobial activities of extracts and essential oils obtained from forest-cutting wastes consisting of needles, leaves, and shoots of larch (*Pinus nigra*), oak (*Quercus robur*), fir (*Abies nordmanniana*), and beech (*Fagus orientalis*) trees were carried out by the Microwave-Assisted Extraction Method (MAE) using Deep Eutectic Solvents (DES) and organic solvents. Volatile components were analyzed by GS-MS-SPME, and non-volatile components were analyzed by LC-MS/MS. The sugar and organic acid content of each extract were determined by HPLC analysis. The leaf surfaces of the trees used before and after extraction with each solvent were imaged by SEM (Scanning Electron Microscopy). The total phenolic, flavonoid, and anthocyanidin contents of the extracts were determined by methods. DPPH, ABTS, and CUPRAC analyses were performed to determine the antioxidant activities of the extracts and essential oils, and scavenging, trolox, and IC50 values were calculated. In addition, by disk diffusion method, the extracts and essential oils were determined to have antimicrobial activities against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus cereus* strains.

As a result of the extraction process, the yields of the extracts using deep eutectic solvents were in the range of 29,56-72,57%. In the leafy annual shoots of larch, oak, fir, and beech trees, 1R-α pinene was found in the volatile component analysis with the highest percentages of 14,19%, 14,42%, 17,76%, and 25,80%, respectively. Among the 23 components detected in the extracts by LC-MS/MS analysis, shikimic acid and catechin components gave the highest results. Ethanol+Kç gave the highest value with 263,203 µg/L for shikimic acid, and ethanol+M samples gave the highest result with 11,495 µg/L for catechin. The döç-3+K

sample had the highest sugar content among the extracts, with 195,948 g/L of turanose and 82,393 g/L of maltose. In terms of total phenolic content, the extracts obtained from methanol and ethanol solvents had the highest content, with values in the range of 77,238–237,637 mg/L and 183,316–242,436 mg/L, respectively. Similarly, the highest results in terms of total flavonoid content were obtained from the extracts obtained from methanol and ethanol solvents, which gave values in the range of 68,072–192,517 mg/L and 153,628–222,114 mg/L, respectively. Acetone+M and methanol+M had the highest total anthocyanidin content, with 1,920 mg/L and 0,818 mg/L, respectively. According to IC_{50} values, acetone+K and ethanol+M gave values of 5,18 mg/L and 7,72 mg/L, respectively, in DPPH analysis; döç-1+K and purified water+G extracts, which gave results of 1,79 mg/L and 8,82 mg/L, respectively, in ABTS analysis, showed the highest antioxidant activity. In CUPRAC analysis, ethanol+K and methanol+M extracts showed the highest antioxidant activity, with the highest trolox result of 116,077 mg/L and 111,311 mg/L, respectively. ethanol+G extract showed the highest antibacterial activity among all samples, forming a 15 mm zone against *B. cereus*.

Consequently, high yield extracts, obtained from deep eutectic solvents, were found to have a high sugar content due to the degradation of the main components of wood. Although extracts obtained from organic solvents showed lower yields than from deep eutectic solvents that they are thought to have a better ability to dissolve phenolic components in the plant due to their high polarity. The extracts rich in phenolic compounds were found to have high antioxidant, antibacterial, and antifungal activities. It is suggested that the extracts obtained from the leafy annual shoots of larch, oak, fir, and beech trees, widely used in the industrial production, can be used in pharmacology, the cosmetics industry, and as food supplements in terms of antioxidant, antibacterial, and antifungal activities. In this way, it is suggested that by utilizing industrial forest trimming residues, especially in the health sector, both an important factor that poses a great risk for fires can be eliminated by recycling forest felling residues and value-added products can be produced to meet the demand of society for the use of natural and organic-based products.

KEYWORDS: Larch, Oak, Fir, Beech, DES, MAE, Antioxidant activity, Antimicrobial activity

February 2024, 333 Page

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim sırasında, tez danışmanlığımı üstlenip konumun planlanmasında ve değerlendirilmesi sırasında ilgi ve desteğini esirgemeyen, araştırmalarımın her safhasında bilgi, öneri ve yardımlarıyla bana yol gösteren, aynı zamanda akademik hayata beni hazırlamak için tecrübelerini paylaşarak sabırlı ve emin adımlarla ilerlemem için yüreklendiren sayın hocam Prof. Dr. Saim ATEŞ ve laboratuvar çalışmalarında bana en büyük desteği gösteren II. danışman hocam Doç. Dr. Eyyüp KARAOĞUL'a gönülden saygı ve şükranlarımı sunarım.

Doktora çalışmalarımda "BAP 06 Sanayi İşbirliği Projeleri" kapsamında KÜBAP-062020-02 nolu proje ile destekleyerek ihtiyacım olan maddi desteği bana sunan Kastamonu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (KÜBAP) ve bu projedeki sanayi ortağımız olan HAMDARD'a ve Dr. Shahinoor Rahman Dulal'e katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Doktoramın tez aşamasında çalışmamı "1002-B Acil Destek Modülü" kapsamında yürütücüsü olduğum 222O169 nolu proje ile destekleyerek ihtiyacım olan maddi desteği bana sunan, tez çalışmalarımda ve doktora sonrası çalışmalarımı gerçekleştirebileceğim bir laboratuvar ortamı oluşturmada ilk adımları atmamı sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

Tez aşamasında devam eden proje çalışmalarında desteklerinden ötürü Dr. Öğr. Üyesi Ekrem DURMAZ'a, tez çalışmamda gerçekleştirdiğim antioksidan aktivite analizlerini sağlıklı gerçekleştirebilmem için laboratuvar imkanlarından yararlanmam ve ortam şartlarını iyileştirilmesi bakımından desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Gjulten NEDJİP'e ve Harran Üniversitesinde gerçekleştirdiğim tüm laboratuvar çalışmalarımda beni yalnız bırakmayıp en büyük destekçim olan babam Eyüp VEREP'e teşekkürlerimi sunarım. Antimikrobiyal çalışmalarımı gerçekleştirdiğim aşamada bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım sayın Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayattaki en büyük başarının doğru ve iyi bir insan olmaktan geçtiğini niteleyen, sancılı dönemlerimde desteklerini benden esirgemeyerek ve her duruma güzel taraflarından bakıp mutlu olmayı öğreten, her başarımda gözlerindeki gururu görmekten büyük mutluluk duyduğum güzel aileme bu çalışmayı ithaf ediyorum.

Didem VEREP

Kastamonu, 2024

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... **ii**
TAAHHÜTNAME ..... **iii**
ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **vi**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiv**
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ ..... **xiv**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **xvi**
GRAFİKLER DİZİNİ ..... **xvii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xviii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **8**
2.1 Endüstriyel Orman Ağacı Kesim Artıklarının Değerlendirilmesi 8
2.2 Ekstraksiyon 11
2.2.1 Geleneksel Ekstraksiyon Yöntemleri 14
2.2.1.1 Maserasyon 14
2.2.1.2 İnfüzyon 15
2.2.1.3 Sindirim ekstraksiyonu 15
2.2.1.4 Presleme 16
2.2.1.5 Süzme 17
2.2.1.6 Kaynatma 18
2.2.1.7 Geri akış 19
2.2.1.8 Tentür 19
2.2.1.9 Damıtma 20
2.2.1.9.1 Sulu damıtma 20
2.2.1.9.2 Su buharlı damıtma 22
2.2.1.10 Soxhlet Ekstraksiyonu 23
2.2.2 Modern Ekstraksiyon Yöntemleri 27
2.2.2.1 Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (pressurized liquid extraction, PLE) 29
2.2.2.2 Mikrodalga destekli çözücü ekstraksiyonu (microwave-assisted extraction, MAE) 34
2.2.2.3 Ultrasonik destekli ekstraksiyon (ultrasonic-assisted extraction, UAE) 39
2.2.2.4 Süperkritik sıvı ekstraksiyon (supercritical fluid extraction, SFE) 40
2.2.2.5 Enzim destekli ekstraksiyon (enzyme assisted extraction, EAE) 43
2.3 Çevre Dostu Çözücüler 44
2.3.1 Ötektik Karışımlar 46
2.3.2 Derin Ötektik Çözücüler (Deep Eutectic Solvents-DES) 47
2.3.2.1 Doğal derin ötektik çözücüler (natural deep eutectic solvents-NADES) 49
2.3.2.2 Derin ötektik çözücülerin fizikokimyasal özellikler 51
2.3.2.2.1 Erime noktası 52
2.3.2.2.2 Kaynama noktası 52
2.3.2.2.3 Yoğunluk 53

2.3.2.2.4 Viskozite 54
2.3.2.2.5 İletkenlik 54
2.3.2.2.6 Polarite 55
2.3.2.2.7 Yüzey gerilimi 55
2.4 Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite 56
2.4.1 Antioksidan Aktivite 56
2.4.2 Fitokimyasallar 59
2.4.2.1 Fenolik bileşikler 60
2.4.2.1.1 Fenolik asitler 62
2.4.2.1.2 Flavonoidler 63
2.4.2.2 Tanenler 65
2.4.2.3 Stilbenler 66
2.4.2.4 Lignanlar 66
2.4.3 Antimikrobiyal Aktivite 66
3. LİTERATÜR ÖZETİ 69
4. MATERYAL ve METOT 92
4.1 Materyal 92
4.2 Metot 94
4.2.1 Ekstraksiyon 94
4.2.2 Uçucu Yağ Eldesi (Hidrodistilasyon) 97
4.2.3 Verim Tayini 98
4.2.4 GC-MS-SPME Analizi 99
4.2.5 HPLC Analizi 99
4.2.5.1 HPLC – Şeker analizi 99
4.2.5.2 HPLC – Organik asit analizi 100
4.2.6 LC-MS/MS Analizi 100
4.2.7 Taramalı Elektron Mikroskopu Görüntüleme (SEM) 103
4.2.8 Toplam Fenolik Madde Tayini 103
4.2.9 Toplam Flavonoid Madde Tayini 103
4.2.10 Toplam Antosiyanin Madde Tayini 104
4.2.11 Antioksidan Aktivite Yöntemleri 104
4.2.11.1 DPPH analizi 104
4.2.11.2 ABTS analizi 105
4.2.11.3 CUPRAC analizi 106
4.2.12 Antimikrobiyal Aktivite 107
4.2.12.1 Disk difüzyon metodu 107
4.2.13 İstatiksel Analiz 107
5. BULGULAR ve TARTIŞMA 109
5.1 Ekstraksiyon Verimleri 109
5.2 Uçucu Yağ Verim Sonuçları 115
5.3 GC-MS-SPME Yöntemi Analiz Sonuçları 116
5.4 HPLC Analiz Sonuçları 123
5.4.1 HPLC – Şeker Analiz Sonuçları 123
5.4.2 HPLC – Organik asit Analiz Sonuçları 129
5.5 LC-MS/MS Analiz Sonuçları 133
5.6 SEM Analiz Sonuçları 139
5.7 Toplam Fenolik Madde Tayini Analiz Sonuçları (mg/L) 143
5.8 Toplam Flavonoid Madde Tayini Analiz Sonuçları (mg/L) 149
5.9 Toplam Antosiyanin Madde Tayini Sonuçları (ppm) 154

5.10 Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları 159
5.10.1 DPPH Analiz Sonuçları 160
5.10.2 ABTS Analiz Sonuçları 174
5.10.3 CUPRAC Analiz Sonuçları 188
5.11 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları 194
5.11.1 Disk Difüzyon Metodu Sonuçları (mm) 194
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 204
KAYNAKLAR 211
EKLER 247
EK 1 Fenolik Bileşenler ve Kromatogram 248
EK 2 Döç-1+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 250
EK 3 Döç-1+M LC-MS/MS Kromatogramı 251
EK 4 Döç-1+G LC-MS/MS Kromatogramı 252
EK 5 Döç-1+K LC-MS/MS Kromatogramı 253
EK 6 Döç-2+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 254
EK 7 Döç-2+M LC-MS/MS Kromatogramı 255
EK 8 Döç-2+G LC-MS/MS Kromatogramı 256
EK 9 Döç-2+K LC-MS/MS Kromatogramı 257
EK 10 Döç-3+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 258
EK 11 Döç-3+M LC-MS/MS Kromatogramı 259
EK 12 Döç-3+G LC-MS/MS Kromatogramı 260
EK 13 Döç-3+K LC-MS/MS Kromatogramı 261
EK 14 Döç-4+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 262
EK 15 Döç-4+M LC-MS/MS Kromatogramı 263
EK 16 Döç-4+G LC-MS/MS Kromatogramı 264
EK 17 Döç-4+K LC-MS/MS Kromatogramı 265
EK 18 Aseton+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 266
EK 19 Aseton+M LC-MS/MS Kromatogramı 267
EK 20 Aseton+G LC-MS/MS Kromatogramı 268
EK 21 Aseton+K LC-MS/MS Kromatogramı 269
EK 22 Hekzan+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 270
EK 23 Hekzan+M LC-MS/MS Kromatogramı 271
EK 24 Hekzan+G LC-MS/MS Kromatogramı 272
EK 25 Hekzan+K LC-MS/MS Kromatogramı 273
EK 26 Metanol+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 274
EK 27 Metanol+M LC-MS/MS Kromatogramı 275
EK 28 Metanol+G LC-MS/MS Kromatogramı 276
EK 29 Metanol+K LC-MS/MS Kromatogramı 277
EK 30 Etanol+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 278
EK 31 Etanol+M LC-MS/MS Kromatogramı 279
EK 32 Etanol+G LC-MS/MS Kromatogramı 280
EK 33 Etanol+K LC-MS/MS Kromatogramı 281
EK 34 Saf su+Kç LC-MS/MS Kromatogramı 282
EK 35 Saf su+M LC-MS/MS Kromatogramı 283
EK 36 Saf su+G LC-MS/MS Kromatogramı 284
EK 37 Saf su+K LC-MS/MS Kromatogramı 285
EK 38 Döç-1+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 286
EK 39 Döç-1+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 287
EK 40 Döç-1+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 288

EK 41 Döç-1+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 289
EK 42 Döç-2+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 290
EK 43 Döç-2+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 291
EK 44 Döç-2+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 292
EK 45 Döç-2+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 293
EK 46 Döç-3+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 294
EK 47 Döç-3+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 295
EK 48 Döç-3+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 296
EK 49 Döç-3+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 297
EK 50 Döç-4+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 298
EK 51 Döç-4+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 299
EK 52 Döç-4+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 300
EK 53 Döç-4+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 301
EK 54 Aseton+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 302
EK 55 Aseton+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 303
EK 56 Aseton+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 304
EK 57 Aseton+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 305
EK 58 Hekzan+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 306
EK 59 Hekzan+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 307
EK 60 Hekzan+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 308
EK 61 Hekzan+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 309
EK 62 Metanol+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 310
EK 63 Metanol+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 311
EK 64 Metanol+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 312
EK 65 Metanol+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 313
EK 66 Etanol+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 314
EK 67 Etanol+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 315
EK 68 Etanol+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 316
EK 69 Etanol+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 317
EK 70 Saf su+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 318
EK 71 Saf su+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 319
EK 72 Saf su+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 320
EK 73 Saf su+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı 321
EK 74 Döç-1+Kç, Döç-1+M, Döç-1+G, Döç-1+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 322
EK 75 Döç-2+Kç, Döç-2+M, Döç-2+G, Döç-2+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 323
EK 76 Döç-3+Kç, Döç-3+M, Döç-3+G, Döç-3+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 324
EK 77 Döç-4+Kç, Döç-4+M, Döç-4+G, Döç-4+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 325
EK 78 Aseton+Kç, Aseton +M, Aseton +G, Aseton +K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 326
EK 79 Hekzan+Kç, Hekzan +M, Hekzan +G, Hekzan +K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 327
EK 80 Metanol+Kç, Metanol+M, Metanol+G, Metanol+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 328
EK 81 Etanol+Kç, Etanol+M, Etanol+G, Etanol+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 329

EK 82 Saf su+Kç, Saf su+M, Saf su+G, Saf su+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı 330
EK 83 Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın Örneklerinin SPME Yöntemi Uçucu Bileşen Analiz Kromatogramı 331
ÖZGEÇMİŞ 332

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Maserasyon düzeneği 14
Şekil 2.2 İnfüzyon aparatı 15
Şekil 2.3 Soğuk pres düzeneği 17
Şekil 2.4 Perkolatör 18
Şekil 2.5 Geri akış düzeneği 19
Şekil 2.6 Basit damıtma düzeneği 20
Şekil 2.7 Sulu damıtma düzeneği 21
Şekil 2.8 Su buharlı damıtma düzeneği 23
Şekil 2.9 Soxhlet düzeneği 25
Şekil 2.10 Basınçlı sıvı ekstraksiyon sistemi 32
Şekil 2.11 Örnek matriksinde bileşenin pozisyonu 34
Şekil 2.12 Mikrodalga destekli ekstraksiyonsistemi 37
Şekil 2.13 Ultrasonik destekli ekstraksiyon sistemi 40
Şekil 2.14 Süperkritik sıvı ekstraksiyon sistemi 42
Şekil 2.15 Enzim destekli ekstraksiyon sistemi 43
Şekil 2.16 Ötektik karışımlarda genel faz diyagramı 47
Şekil 2.17 Hidrojen bağ alıcı (HBA) bileşen örnek 51
Şekil 2.18 Hidrojen bağ donörü (HBD) bileşen örnek 51
Şekil 2.19 Reaktif oksijen türleri 57
Şekil 2.20 Fenol yapısı 61
Şekil 2.21 Fenolik asitler a) Hidroksibenzoik asit, b) Hidroksisinnamik asit 62
Şekil 2.22 Flavonoidlerin genel iskelet yapısı 63
Şekil 2.23 Antosiyanin pigmentlerinin genel iskelet yapısı 64
Şekil 2.24 Flavanonun genel iskelet yapısı 65
Şekil 5.1 Karaçam ağacı yapraklarının, ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (mag-1000x) 141
Şekil 5.2 Meşe ağacı yapraklarının, ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (mag-1000x) 142
Şekil 5.3 Göknar ağacı yapraklarının, ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (mag-1000x) 143
Şekil 5.4 Kayın ağacı yapraklarının, ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (mag-1000x) 144
Şekil 5.5 Toplam fenolik madde içerikleri (mg/L) ve istatiksel toplam fenolik madde taraması 149
Şekil 5.6 Toplam flavonoid madde içerikleri (mg/L) ve istatiksel toplam flavonoid madde taraması 154
Şekil 5.7 Toplam antosiyanin madde içerikleri (mg/L) ve istatiksel toplam antosiyanin madde taraması 159

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Sayfa

Fotoğraf 4.1 a) Karaçam, b) Meşe, c) Göknar, d) Kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünleri 93
Fotoğraf 4.2 Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı 94
Fotoğraf 4.3 a), b) Bitki örneği ve çözücü karışımı c) Mikrodalga cihazı iç haznesi d) Mikrodalga cihazı soxhlet düzeneği 97
Fotoğraf 4.4 a) Mikrodalga cihazı iç haznesi b) Mikrodalga cihazı su haznesi ve kontrol paneli 97
Fotoğraf 4.5 a), b) Amber şişelere alınan ekstrakt ve uçucu yağlar..... 98
Fotoğraf 4.6 a), b) SEM analizi için kurutulan bitki örnekleri..... 98
Fotoğraf 4.7 a) Mikrodalga destekli damıtma düzeneği, b) Ekstraktörde hazırlanan örnek ve saf su, c) Mikrodalga destekli damıtma iç haznesi 99
Fotoğraf 5.1 Metanol+G numunesinin *P. aeruginosa*'ya karşı disk difüzyon test sonucu 197
Fotoğraf 5.2 Aseton+Kç numunesinin *S. aureus*'a karşı disk difüzyon test sonucu 198
Fotoğraf 5.3 Aseton+G numunesinin *E. coli*'ye karşı disk difüzyon test sonucu.... 202
Fotoğraf 5.4 Aseton+Kç numunesinin *B. cereus*'a karşı disk difüzyon test sonucu 203
Fotoğraf 5.5 Des-3+M numunesinin *C. albicans*'a karşı disk difüzyon test sonucu 204

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1 DÖÇ hazırlamak için önerilen dört farklı kombinasyon. 48
Tablo 2.2 Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar 58
Tablo 4.1 Derin ötektik çözücülerin bileşimleri 95
Tablo 4.2 Ekstraksiyon ve uçucu yağ eldesi deney koşulları 96
Tablo 4.3 LC-MS/MS cihaz programı 102
Tablo 4.4 LC-MS/MS fenolik bileşen standart değerleri 102
Tablo 5.1 Çalışılan örneklere ait ekstrakt verimleri (%) 112
Tablo 5.2 Çalışılan örneklere ait uçucu yağ verimleri (%) 116
Tablo 5.3 SPME yöntemi ile karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçları yıllık sürgün uçucu bileşen analizi (%) 118
Tablo 5.4 HPLC şeker analizi (g/L) 125
Tablo 5.5 HPLC organik asit analizi (g/L) 131
Tablo 5.6 LC-MS/MS analizi (µg/L) 136
Tablo 5.7 Toplam fenolik madde miktarı (mg/L) 146
Tablo 5.8 Toplam flavonoid madde miktarı (mg/L) 151
Tablo 5.9 Toplam antosiyanin madde miktarı (mg/L) 156
Tablo 5.10 DPPH analiz verileri 163
Tablo 5.11 ABTS analiz verileri 178
Tablo 5.12 CUPRAC analizi trolox sonuçları (mg/L) 191
Tablo 5.13 Ekstraktların antibakteriyel ve antifungal aktivite sonuçları (mm) 199
Tablo 6.1 Karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların; verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı sonuçlarına göre karşılaştırılması 207
Tablo 6.2 Meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların; verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı sonuçlarına göre karşılaştırılması 208
Tablo 6.3 Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların; verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı sonuçlarına göre karşılaştırılması 209
Tablo 6.4 Kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların; verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı sonuçlarına göre karşılaştırılması 209

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 5.1 Karaçam yıllık sürgün ekstrakt verimi (%) ve istatiksel verim taraması. 113
Grafik 5.2 Meşe yıllık sürgün ekstrakt verimi (%) ve istatiksel verim taraması 114
Grafik 5.3 Göknar yıllık sürgün ekstrakt verimi (%) ve istatiksel verim taraması .. 115
Grafik 5.4 Kayın yıllık sürgün ekstrakt verimi (%) ve istatiksel verim taraması 116
Grafik 5.5 Çalışılan endüstriyel ağaç türlerinin yıllık sürgün uçucu yağ verimleri (%)..... 117
Grafik 5.6 Karaçam ağacından elde edilen ekstraktların HPLC şeker analizi (g/L) 127
Grafik 5.7 Meşe ağacından elde edilen ekstraktların HPLC şeker analizi (g/L) 128
Grafik 5.8 Göknar ağacından elde edilen ekstraktların HPLC şeker analizi (g/L) .. 129
Grafik 5.9 Kayın ağacından elde edilen ekstraktların HPLC şeker analizi (g/L) 130
Grafik 5.10 Karaçam ekstraktları ve uçucu yağı için DPPH analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortalama kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması 168
Grafik 5.11 Meşe ekstraktları ve uçucu yağı için DPPH analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortalama kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması..... 170
Grafik 5.12 Göknar ekstraktları ve uçucu yağı için DPPH analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortalama kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması 173
Grafik 5.13 Kayın ekstraktları ve uçucu yağı için DPPH analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortalama kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması..... 175
Grafik 5.14 Karaçam ekstraktları ve uçucu yağı için ABTS analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortalama kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması 182
Grafik 5.15 Meşe ekstraktları ve uçucu yağı için ABTS analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortalama kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması..... 184
Grafik 5.16 Göknar ekstraktları ve uçucu yağı için ABTS analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortalama kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması 187
Grafik 5.17 Kayın ekstraktları ve uçucu yağı için ABTS analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortalama kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması..... 188
Grafik 5.18 Karaçam, meşe, göknar ve kayın ekstraktları ve uçucu yağları için trolox cinsinden CUPRAC analiz sonuçları (mg/L) ve istatiksel trolox taraması 194

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

As	**:** Aseton
Döç-1	**:** Kolin klorür+1,4-Bütandiol
Döç-2	**:** Kolin klorür+1,4-Siklohekzandiol
Döç-3	**:** Kolin klorür+Maltoz
Döç-4	**:** Kolin klorür+ Etilen glikol
Et	**:** Etanol
G	**:** Göknar
Hk	**:** Hekzan
K	**:** Kayın
Kç	**:** Karaçam
M	**:** Meşe
Mt	**:** Metanol
Ss	**:** Saf su
U.Y.	**:** Uçucu yağ

Kısaltmalar

Çöz-İst	**:** Çözücülere göre numunelerin homojenlik grubu
DÖÇ	**:** Derin Ötektik Çözücüler
GC-ECD	**:** Gaz Kromatograf-elektron yakalama dedektörü
GC-MS/MS	**:** Gaz Kromatografisi/Kütle Spektroskopisi
HPLC	**:** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS	**:** Sıvı Kromatografi/Kütle Spektrometrisi
MEY	**:** Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi
NADPH	**:** Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
SEM	**:** Taramalı Elektron Mikroskobu
Tüm-İst	**:** Tüm numunelerin homojenlik grubu
Tür-İst	**:** Türe göre numunelerin homojenlik grubu
UEY	**:** Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihine baktığımızda, tıbbi özelliği bulunan bitkilerin ilaç olarak kullanılmasının insanlık tarihi kadar eski olduğunu söyleyebiliriz. Yerel halkın zor şartlar altında şifa bulmak için arayışlarıyla birlikte, bir bitkinin özünden elde edilen suyu yarasına süren ve bu uygulamanın iyileştirici sonuçlar verdiğini gören ilk insanla birlikte halk hekimliği de başlamıştır. Geçmişten günümüze kadar bitkilerle tedavi yöntemleri zaman zaman önem kazanıp kimi zaman da önemini etkisini azaltmış olmasına rağmen güncelliği korumuştur. Özellikle son yıllarda sentetik ilaçların olumsuz etkilerinden kurtulmak doğala yönelerek tedavi olmak isteyen insanların taleplerinin karşılanması ve bunu uygulamayı isteyen bilim insanlarının da etkisiyle alternatif tıbba olan ilgi alaka artmıştır. Bununla ilişkili olarak da alternatif tıbbın en önemli kategorilerinden biri olan bitkilerle tedavi ya da takviye gıda kullanımı önemli bir seviyeye gelmiştir. Bu konunun desteklenerek beslenebilmesi için bilimsel çalışmalar hız kazanmış ve çeşitlenmeye başlamıştır (Dönmez vd., 2016).

Tıbbi aromatik bitkilerin farklı sebeplerle tercih edilmesi çok eski zamanlara dayanmaktadır. Tıbbi aromatik bitkiler ve bunlardan hazırlanan ve içeriğinde bitki özütleri olan ilaçlar çağımızda dünyadaki birçok ülkede; bitkiseller, bitkisel ilaçlar, fitoterapötikler, fitofarmasötikler, takviye gıdalar ve geleneksel ilaçlar olarak farklı kategorilerde üretilmekte ve kullanılmaktadır. Farklı kategorilerde bulunan ancak temeli bitkiye dayanan bitkisel ürünlere, “Herbal Medicinal Products” (tıbbi bitkisel ürünler) ismi kullanımı uygun bulunmuştur. En basit ve açık haliyle tıbbi bitkisel ürünleri ifade etmek gerekirse: bitkilerin farklı kısımlarının, doğrudan kullanımı ya da aşamalı işlemlerden geçtikten sonra elde edilen ve sonrasında ticareti yapılan tıbbi aromatik ürünler olarak nitelendirebiliriz. Böyle üretimi gerçekleştirilen ürünler hastalıkların oluşmasına sebep olan durumları engellemek yani korunmak, hastalığa yakalanma durumunda etkisini azaltmak ya da tamamen iyileştirmek, hastalıkların tam tedavi edilemese de yoğunluğunun şiddetini azaltmak amacıyla tedavi sürecine yardımcı olmakta ya da hastalıkların belirlenmesi teşhis edilmesi aşamasında kullanılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013; Kartal, 2007).

Tıbbi bitkisel ürünler için tercih edilen bitkilerin kimyasal bileşenleri ve bununla bağlantılı olarak antioksidan, antimikrobiyal vb. birçok özelliğin hastalıklara olan etkileri birçok etmene bağlıdır. Bu etmenlerin başlıcalarını; bitkilerin temin edilmesi aşamasında bitkinin türü, organı, yetiştiği coğrafya ve toplandığı mevsim oluşturmaktadır (Javanmardi vd. 2003; Mohammed vd. 2019).

Kırsal kesimlerde, hastaların hastalıklarının kontrol altına alınabilmesi ya da tedavi edilebilmesi amacıyla yaygın olarak o çevrede bulunan ve bilgi sahibi olunan bitki türlerinin ya da faydalı olduğu düşünülen bitkilerin yetiştirilerek kullanıldığı bilinmektedir. Kırsalda yaşamayan ve kırsaldaki bu tarz doğal ürünler hakkında bilgisi olmayan, ulaşamayacak şehirlerde yaşayan insanlar ise hastalıkların tedavisinde kırsaldakilerin faydalı olduğunu düşünerek kullandıkları doğal ürünlerden üretilmiş takviye gıdalar ve bitkisel ilaçları aktar ya da eczanelerden temin edebilmektedirler. Bu tarzda üretimi yapılan ilaçlar ve takviye gıdalar, genel olarak çok uzun zamanlardan beri yerel halk tarafından kullanılan ve deneyimlenmiş doğal ürünlerin çeşitli bilimsel çalışmalardan sonra tasdik edilmesi ile çok tanınmış hale gelen, yabancı ya da yerli kökenli takviye gıdalar ve bitkisel ilaçlardır. Türkiye'de günümüzde alternatif tıbba hizmet eden tıbbi açıdan faydalı olduğu kanıtlanmış olan geçmişten günümüze kadar kullanılan doğal ürünlerden, çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilen özütler kullanılmakta ve ticari açıdan da fayda sağlanılarak ihracatı gerçekleştirilmektedir. Artık sentetik ilaçların zararlı etkilerinin görülmeye başlanması ve insanların doğala yönelmesine rağmen, ülke geneline bakıldığında faydalı olduğu tespit edilmiş ve onaylanmış olan bu bitkisel kaynakların yani bitkisel takviye gıda ve ilaçların yoğun taleplerle kullanıldığını söylemek pek de mümkün olmamaktadır (Doğan vd. 2012; Sütçü, 2018; Şahin, 2017).

Amerika'da 2000'li yıllardan itibaren doğal ürünlerden elde edilen bitkisel ilaçlara ve vitamin destek tabletlerine olan talep yaklaşık olarak %60 oranında artış göstermiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı çalışmalar neticesinde ulaştığı bilgilere göre toplumdaki insanların %80'nin alternatif tıp olarak da ifade edilen doğal yöntemlerle tedaviyi tercih ettikleri belirlenmiştir. Doğal yöntemlerle tedavi uygulamaları tüm Dünyada olduğu gibi Türkiye için de yüksek oranda tercih edilmektedir. Ülkemizde alternatif tıbba olan ilgi ile birlikte sağlıklı yaşama ve doğal ve organik ürünlere

yönelmede çok artış olduğu için tüketimi artan ürünler arasına; mineral, vitamin ve antioksidan madde içeren ürünlerin satışı oldukça yükselmiş ve bu tarz doğal takviye gıdaların üretiminin de artmasıyla yeni bir sektör ve pazar oluşmuştur. Özellikle sentetik ilaç ve gıdaların artış göstermesiyle birlikte insanların yedikleri ve içtikleri gıdalardan tat ve koku alma konusunda problemler yaşamaya başlamaları sonucunda insanlar, eski zamanlardan alışkın oldukları tatları ve kokuları alma ve aramaya başlamıştır. Bu sebeple de doğal gıdalara ve doğallığa olan ilginin artmasıyla, bu talebin karşılanabilmesi ve insanlığa bu konuda hizmet sunulması önemli hale gelmiştir. Bilim insanları tarafından bu tarz doğal takviye gıdalar veya hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek nitelikte olan doğal ürünlerin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar, araştırmalar hızlanmış ve artış göstermiştir (Diken, 2009; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013).

Dönemimizde insanların sentetik ilaç ve gıdaların zararlarıyla karşılaşmaları, olumsuz etkilerinden dolayı hayatlarının engellenmesi gibi nedenlerden dolayı daha çok araştırma, öğrenme ve bilinçlenme durumunda olduklarından bilime olan talepleri de değişmeye başlamıştır. Bilim insanlarının, bu yöndeki talepleri karşılamak amacıyla eski zamanlardan beri insanların tedavi amaçlı kullandıkları doğal ürünleri, bitkileri tespit etme ve kimyasal içeriklerini araştırma konusundaki çalışmalarını yoğunlaştırmalarıyla birlikte, doğal ürünler daha da önem kazanmaya başlamıştır. Bu düşünceler ışığında resmiyete dökülmesi ve birçok açıdan işlemlerin kolaylaştırılması amacıyla Sağlık Bakanlığı tarafından Resmi Gazetede 6 Ekim 2010 tarihinde "Geleneksel Bitkisel Tıbbi Ürünler Yönetmeliği" ve 27 Ekim 2014 tarihinde "Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliği" yayınlanmıştır. Yayınlanan bu yönetmeliklerin amacı; insan sağlığıyla ilgili ihtiyaç duyduğu doğal takviye ürünler, tedavi edici ya da muhtemel hastalıklara karşı koruyucu olan etkileri bakımından geleneksel yönden geçmişten günümüze kadar tercih edilen ve oldukça yaygın kullanım alanına sahip olan tıbbi özellikteki bitkilerden elde edilen bitkisel özütlerle hazırlanan bitkisel tıbbi ürünlerin kullanım ruhsatlarını vermek, etkilerini, kalitesini ve güvenlilik ile ilgili uyulması gereken yöntem ve kuralları belirlemek içindir. Yönetmelik ile ilgili gerekli olan bu konulara ilave olarak tedavi amaçlı ya da doğal takviye gıda olarak kullanılabilirliği kanıtlanmış olan doğal tıbbi ürünlerin endüstriyel olarak üretilmesine imkan sağlamak amaçlanmakta ve bu tarz ürünlerin

ithalatının gerçekleştirilmesi için gerekli prosedürler belirlenmektedir. Ayrıca bu ürünlerle ilgili ihtiyaç duyulan ruhsat başvuruların değerlendirilmesi ve ruhsat almış özel ya da tüzel kişilerin de takibinin yapılması yönetmeliğin bünyesinde gerçekleşmektedir (Öztürk vd. 2020; Tokaç, 2019).

Alternatif tıp olarak da bilinen Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları Yönetmeliğinin amacı, insan sağlığına yönelik tamamlayıcı tıp ve geleneksel uygulama yöntemlerini belirlemek, bu metotların uygulamasını yapacak olan kişilerin yetkinliklerinin incelenerek onaylanması ve eğitimleri ile alakalı bu tarz geleneksel yöntemli metotların uygulanacağı sağlık kuruluşlarının çalışma prosedür ve kurallarını kontrol etmektedir. Yönetmelik, tamamlayıcı tıp ve geleneksel uygulamaların gerçekleştirildiği özel ve kamu tüzel kişileri ile gerçek kişilere ait olan sağlık kurumlarını ve bu kurumlarda prosedürleri metotları uygulayacak yetkinliğe sahip olan kişileri kapsama almaktadır (Doğan vd. 2012; Uğurlu vd. 2016).

Modern tıbba alternatif olarak gündeme gelen tamamlayıcı tıp ve geleneksel metotların uygulama merkezlerinde gerçekleştirilebilecek uygulamalar arasında; akupunktur, apiterapi, fitoterapi, hipnoz, homeopati, kayropraktik, kupa uygulaması, larva uygulaması, mezoterapi, müzikterapi, osteopati, ozon uygulaması, proloterapi, refleksoloji ve sülük uygulaması yer almaktadır. Fitoterapi; geleneksel olarak geçmişten günümüze kadar insanlar tarafından kullanılan doğal bitkilerden elde edilen ilaçlar, bitkisel takviye gıdalar ve bitkisel tıbbi ürünler kullanılarak yapılan tıbbi bir tedavi yöntemidir. Fitoterapi ürünleri ile alakalı bilim komisyonunun görüşleri doğrultusunda tespit edilmiş olan belirtiler ışığında, bu ürünlerin kullanımıyla ilgili tüm konularla alakalı ruhsatların verilmesi aşamasında, sertifikalı hekimlerin önerileri doğrultusunda hareket edilmesi gerekmektedir. Fitoterapi ürünleriyle ilgili tedavilerde kullanılması planlanan tıbbi bitkiler ve bitkisel ürünlerin satışlarının yapılması ve ruhsatlandırılması konularıyla ilgili Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu söz sahibi olduğundan gerekli düzenlemeleri yapmakla yükümlüdür (Öztürk vd. 2020; Tekçi, 2017).

Dünya ve Türkiye'de tıbbi bitkilerin üretimi ve ticareti ile ilgili etkilere bakacak olursak: sanayileşme ile dünyada meydana gelen kitle üretimi neticesinde, geçmişten

beri alışılagelmiş bitkisel ürünler ile tedavinin yerini, ilaç sanayisindeki pozitif gelişmelerle hastalıkların sentetik ilaçlarla tedavi edilmesi sonucunda bu konuya olan ilgiyi artırmıştır. Fakat gelinen durumda yan etkilerinin oldukça fazla olduğu anlaşılan ve aynı zamanda bu etkilerden kaynaklı medikal ve ekonomik sorunların yaşanması, sentetik ilaçlar yerine bitkilerle tedavi yöntemlerini tekrardan popüler hale getirmiştir. Gelişmiş birçok ülkede bitkisel ilaç sanayisine ve bitkisel kökenli kozmetik ürünlerine olan ilginin ve talebin artmasıyla gelişmeler başlamış ve bilim insanları tarafından bu gelişmelerin yürütülebilmesi amacıyla bitki çeşitliliğinin artırılması için farklı bitki taksonlarıyla ilgili araştırmalara ağırlık verilmiştir (Özbek, 2005; Şengezer ve Güngör, 2008).

Günlük hayatımızda etkisini oldukça hissettiğimiz hava kirliliği ve küresel ısınma, içeriğiyle oynanmış yapısı değişmiş katkılı besinler, yeterli besin alamama ve obezite gibi sonuçlar insan vücudunun fizyolojisi ve kimyasındaki değişimler sebebiyle birçok hastalığa neden olmaktadır. Hücrelerimize zarar verebilecek maddelerin serbest halde vücudumuzda dolaşmaları neticesinde bağışıklık sistemimizde hasar oluşabilmektedir. Bu etkiye sebep olan ve vücudumuzun sağlıklı işleyiş sistemini bozan ve birçok hastalığın oluşmasına sebebiyet veren maddelere karşı direnç gösterme özelliğindeki yapılara antioksidan denilmektedir. Antioksidan maddelerin kelime anlamına baktığımızda, canlılardaki biyolojik değişimler neticesinde oluşumu gerçekleşen veya canlıların bünyesine dışarıdan alınan serbest radikalleri baskılayan ya da yok eden maddeler olduğunu görüyoruz. Antioksidan maddelerle ilgili daha geniş bir analiz yapmak istenirse, canlılarda oluşan serbest radikallerin oksidasyon işlemi neticesinde zarar görmüş hücrelerin çevresindeki hücrelerede verdiği zararları, engellemek amaçlı en aza indirmek ya da tamamen etkisini azaltmak sebebiyle vücuda faydası olan maddelerdir. Antioksidan aktivitenin fazla olduğu düşünülen bitki taksonları genel olarak yeşil ve kırmızı yapraklı bitki çeşitleridir. Ayrıca bununla ilişkili olarak bahsi geçen özellikteki bitki taksonlarında bulunan E, A ve C vitaminlerinin doğal antioksidan maddeler olduğu tespit edilmiştir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013; Küçüköner, 2006; Thomas, 2000; Yörük ve Danyer, 2016).

Serbest radikaller olarak adlandırılan birçok reaktif oksijen türünün oluşumu, insan vücudundaki fizyolojik ve biyokimyasal sürecin sonucunda meydana gelmektedir.

Vücutta serbest radikallerin fazlaca üretilmesi neticesinde biyolojik sistemin dengesinin bozulmasına sebep olmakta ve bunun sonucunda, olağan dışı ilerleyen yaşlılık, diyabet ve kanser gibi hastalıklar görülebilmektedir. Gelişen sanayinin ve artışta olan endüstrileşmenin getirdiği olumsuzluklar sebebiyle, doğal özellikte olmayan kimyasal madde olarak ifade edilebilecek sentetik antioksidanların fazlaca tercih edilip kullanılması sebebiyle olası hastalıkların oluşması ve artış göstermesi kaçınılmaz olmuştur (Borneo vd. 2009; Dönmez vd. 2016). Tüm bu sebeplerden oluşan kaçınılmaz sonuç ise; serbest radikallerce zengin gıdaların tüketimiyle vücuda alınan zararlı kimyasal maddelerin kötü etkilerinden kurtulmak ve hayatımızdan uzaklaştırmak amacıyla yapay olmayan doğal ürünlere yönelim ve talep artmıştır. Artış gösteren bu talebin karşılanmasına yönelik, yetiştirilen tıbbi bitkiler ve doğal gıda maddesi olarak tüketilen odun dışı orman ürünleri biyoaktif özelliklere sahiptir. Odun dışı orman ürünleri olarak ifade edilen odunsu ve otsu yapıdaki bitkilerin meyve, yaprak, kök ve filiz gibi bölgelerindeki doku içeriklerinde bulunan biyoaktif bileşiklerin temelini fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Taleplerin artması sonucunda bu konuya olan ilgi ve araştırmalarda artış gösterdiğinden, binlerce türü içeren zengin bitki çeşitliliği içerisinde fenolik bileşiklerin varlığıyla ve yoğunluğuyla ilgili birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya da devam etmektedir. Literatür incelemeri ve araştırmalar neticesinde çalışılmış birçok bitkinin fenolik bileşikler bakımından zengin olduğu belirlenmiş ve daha sonrasında da fenolik içeriğin olduğu düşünülen yeni bitki türleri ile araştırmalar yapılmaya sevk edilmiştir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2013; Karabulut ve Gülay, 2016).

Gıdalarda meydana gelen ve yaygın olarak karşılaşılan bir problem olan biyokimyasal reaksiyon yani oksidasyon olayı, ürünlerin üretimi ve sonrasındaki saklama, depolama aşamasında ürünün raf ömrünü kısaltma, gıdanın renginde, dokusunda ve lezzetinde bozulmalara sebep olmaktadır. Oksidasyon olayının gerçekleşmesiyle oluşan reaktif oksijen ortamından kaynaklı olarak ürünler üzerinde oluşan zararlı etkiler neticesinde insan sağlığı olumsuz yönde etkilenmektedir. Bu tarz olumsuz etkiye sebep olacak ürünler; yaşlanma, kanser ve kalp hastalığı ciddi hastalıkların başlangıç aşamasında tetikleyici olarak önemli rol oynamaktadırlar. Gıdalarda meydana gelen bozulmalara sebep olan mikrobiyal kontaminasyon neticesinde, gıda tüketiminden kaynaklı oluşan hastalıklarla sağlıklı bireylerin bu tarz hastalıklara yakalanma olasılığını artırıcı

önemli bir etki göstermektedir. Yapılan araştırmalar ve incelemeler sonucundaki çıkarımlar, çevre kirliliği ve mikrobiyal kontaminasyondan kaynaklanan gıda sebepli hastalıklarla karşılaşma olasılığının küresel ölçekte artabileceğine işaret etmektedir. Gıda endüstrisinde zararlı etkileri ortadan kaldırmak amaçlı sentetik antioksidanlar ve koruyucular yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak antioksidan özellik gösterse de yapay koruyucu olduklarından, güvenilirliği ve sağlık üzerindeki olası etkilerini belirlemek amacıyla araştırma ve çalışmalarda artış olmuştur. Bu araştırmalar neticesinde antioksidan özellik gösterse de sentetik olan ürünlere alternatif olabilecek doğal ürünlerin varlığıyla ilgili merakların giderilmesi için çalışmalar yapılmış ve yeni çalışmalar yapılmaya devam etmektedir (Borneo vd. 2009; Karpinska vd. 2001; Loizzo vd. 2010).

Üzerinde durulan konularla ilgili literatürde yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda bu çalışmada, üretimi ve endüstriyel kullanımı fazla olan karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının orman kesim artıklarının içeriğindeki etken bileşenlerinin doğal çözücüler olan DÖÇ'ler ve konvansiyonel çözücüler ile çevre dostu mikrodalga ekstraksiyon yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen ekstraktların verimi, LC-MS/MS analizi ile uçucu olmayan bileşenlerinin tespiti, HPLC analizi ile şeker ve organik asit içerikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile bitki örneği görüntüleri, bitki örneklerinin uçucu bileşenleri GC-MS/SPME analizi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen uçucu yağ ve ekstraktların toplam fenol, flavonoid ve antosiyanin madde miktarları, DPPH, ABTS ve CUPRAC analizleri antioksidan aktiviteleri, disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Ekstraksiyon verimleri, toplam fenol, flavonoid, antosiyanin madde miktarları ve antioksidan aktivite sonuçları belirlenerek gerekli istatiksel analizler yapılmıştır. Tez kapsamında planlanan bu çalışmalar ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden, bitkisel ilaç ve takviye gıda ürünlerinin endüstriyel üretim açısından değerlendirilebilirliği tartışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Endüstriyel Orman Ağacı Kesim Artıklarının Değerlendirilmesi

Endüstri alanında kullanılan ağaç türlerinden oldukça fazla elde edilen orman kesim artıkları "foliage" olarak da bilinmektedir. Foliageler öncelikli olarak ağaç türü olmak üzere, kesim zamanı, ağacın boyu, tepe boyu, göğüs yüksekliği çapı, tepe çapı, yaşı ve boniteti gibi pek çok farklı özelliğe bağlı olarak kategorize edilip değerlendirilmektedir. Günümüzde orman kesim artıkları birçok ürünün hammadde ihtiyacını karşılamak için önemli bir kaynak olarak kullanılmaktadır. Bu şekilde orman kesim artıkları; hayvan yemi veya katkısı, enerji üretimi, gübre, kağıt ve levha üretimi, kozmetik sanayi, kimya endüstrisi ve farmakoloji gibi alanlarda kullanılabilmektedir. (Ateş vd. 2007; Vurdu, 1989).

Doğal gıda katkı maddelerinin geliştirilmesinde orman kesim artıkları önemli bir yer tutmakta ve çam türlerinden elde edilen iğne yapraklar, kabuklar ile kozalaklar da bu alanda değerlendirilebilecek kapasite olduğu düşünülmektedir. Dünyadaki birçok insanın besin ihtiyacını karşılayabilmek için katma değerli yeni besinlerin elde edilmesi önem taşımaktadır (Yi vd. 2017; Zhang vd. 2010). *Pinus sylvestris, Pinus nigra* ve *Pinus brutia* gibi bazı çam türleri ile ilgili yapılan çalışmalarda orman kesim artıklarından katma değerli gıdaların üretilebileceği düşünülmüştür. Endüstriyel olarak çok üretimi olmasa da çam ağacının kesim artıklarınından elde edilen ekstraktlarda bulunan biyoaktif bileşikler sayesinde toz, özüt ya da kapsül gibi takviye gıda olarak tüketilebilecek katma değerli ürünler üretilebilinir. Fakat bu konunun gelişimi ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır (Burchi vd. 2011; Sadeghi vd. 2016; Zhang vd. 2017). Eski zamanlardan beri çamgiller ailesinin üyelerinin reçine, yaprak, sürgün ve kozalak gibi kısımlarından tedavi amaçlı yararlanılmıştır. Özellikle astım ve mide hastalıklarında olumlu etkilerinin görüldüğü bilinmektedir (Esmaeili vd., 2021; Yi vd. 2017; Zou vd. 2013).

Ülkemizin mevcut orman kesim artıklarının potansiyelinin belirlenmesi ve yıllık ya da başka belirlenmiş periyotlara göre ortaya çıkan ve çürümeye terk edilen orman kesim artıklarının miktarının belirlenebilmesi için çeşitli biyokütle hesabı çalışmaları

yapılmaktadır. Orman kesim artıkları içerisinde birincil olarak odun hammaddesine göre yaprak ve kabuk oranı oldukça fazla miktarlarda bulunmaktadır. Bu sebeple orman kesim artıklarının; kesim artıkları sanayi bölgelerine taşınması ve depolanması için yapılan giderler oldukça yüksek maliyetlere sebep olabilmektedir. Kesim sonrası ormanda çürümeye terkedilen ve büyük oranda böcek zararları ve yangın gibi risklerin oluşmasına sebebiyet veren olumsuzlukların ortadan kaldırılabilmesi için biyokütlelerin değerlendirilmesinde yüksek maliyete sebep olan etkenlerden nakliye ve depolama koşullarıyla ilgili iyileştirmelerin yapılabilmesi üzerine çalışmalar yürütülmüştür. Bu çalışmalardan birinde bu artıkların depolama ve nakliye masraflarını en aza indirmek açısından yerinde yongalama ve balyalama yöntemi ile ön işlemlerden geçirildikten sonra üretim tesislerine nakledilmesi taşıma giderlerini önemli ölçüde azaltabileceği sonucuna varılmıştır (Ateş, vd. 2007).

Ağacın ana gövdesi dışında kalan orman kesim artıkları denildiğinde kabuk, yaprak, çiçek, kozalak, meyve, ibre, sürgün ve 0,6 cm ye kadar olan bütün ince dallar akla gelmektedir (Alma vd. 2002; Vurdu, 1989). Orman kesim artıkları, kağıt endüstrisi, levha endüstrisi ve kereste hammadde kaynağı olarak üretim amaçlı ticari bir değeri olmayan tüm odun, kabuk, dal, sürgün, yaprak, çiçek ve tomurcukları kapsamaktadır. Orman kesim artıklarının geri dönüşümü yeni bir konu olmamasıyla birlikte zaman geçtikçe daha da önem kazanması ve değerlendirilme ihtiyacının doğmasından dolayı bu konu ile ilgili çok fazla araştırma bulunmaktadır (Cuchet vd., 2004).

Üretimde, hammaddesi ahşap olan sanayi kuruluşlarında temin edilen tomrukların üretime alınmadan önce kabuklarından arındırılması sonucunda açığa çıkan kabuklar, geri dönüşüme katkısı düşünüldüğünde oldukça önemli bir atık durumundadır. Genellikle levha üretiminin yapıldığı fabrikalarda hammaddedeki kabuk istenmeyen bir madde olduğundan, kabuğun temizlenmesi zorunluluğu ve çok fazla kabuk artığının birikmesi nedeniyle hem kabuk stoğundan kurtulmak hem de yarar sağlamak amacıyla kabuğun değerlendirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır (Feng vd. 2013; Özdemir, 2010). Kabuğun önemli bir biyokütle kaynağı olduğu bilindiğinden, bu biyokütle kaynağının ekonomiye kazandırılma ihtiyacı da kaçınılmaz olmuştur. Biyokütle kaynağı olarak kabuğun farklı üretim süreçlerinde çok yüksek oranda kullanılmasıyla yenilenebilir hammadde kaynağı olarak yararlanılmaktadır (Miranda

vd. 2012; Pasztory vd. 2016). Orman ürünleri üretiminin yapıldığı sanayi kuruluşlarında kabuk hammadde kalitesini düşürücü etkisinden dolayı tercih edilmemekte ve genel olarak yakılarak enerji üretiminde kullanılmaktadır. Fakat değişen dünya ve oluşan talepler neticesinde bazı ağaç türlerinin kimyasal bileşenleri ile içeriğinde bulunan ekstraktif maddelerin çeşitliliğinden değişik alanlarda kullanılabilme olanağı görülmüştür. Bu nedenle de ağaç türü atıkları olarak oluşan kabukların farklı sektörlerde değerlendirilebilmesi ve çeşitlendirilebilmesi için bu endüstriyel ağaç türlerinden elde edilen kabuk atıklarının anatomik yapısı ve kimyasal bileşenleri üzerine çalışmalar yürütülmeye başlanmıştır. Günümüzde bu çalışmaların sayısı artarak devam etmekte ve bu yöndeki araştırmalara yönelik elde edilen bilgilere ve ürünlere karşı da talep fazlalaşmaktadır (Feng vd. 2013; Kain vd. 2015; Özdemir, 2010; Şen vd. 2010).

Orman ürünleri üretimi denildiğinde akla ilk olarak ağaç gövdesinden elde edilen tomruk, kereste gibi ürünler gelmektedir. Bu sebeple ağacın gövdesi dışında kalan kabuk, kök, küçük dal, çiçek ve meyve gibi diğer önemli ürünlerin değerlendirilmemesi neticesinde atık ürünler olarak kesim sonunda orman arazisinde bırakılmaktadır. Yaklaşık %20 oranında kuru biyokütle ağırlığına sahip olan iğne yapraklı orman ağaçlarının kesim artıkları, geleneksel orman yönetim planlarında önemli bir yere sahiptir (Standish, 1988; Vurdu, 1983).

Orman kesim artıkları zengin içeriği bakımından yapısında, anatomisinde; genel olarak selüloz ve hemiselüloz olarak bilinen karbonhidratlar, monosakkaritler (glikozitler), lignin ve ekstraktif maddeler olarak bilinen; uçucu yağlar, vakslar, kitin, lignanlar, flavanoitler, fenolik asitler, fenolik glikozitler, klorofil, E ve C vitamini, provitamin A, karotin, β-karotin vb. maddeler ve mikroelementler olarak da kalsiyum, sodyum, çinko, fosfor, bakır, manganez, kobalt ve pinoprenoller bulunmaktadır (Hafızoğlu, 1983).

Orman kesim artıklarının geri dönüşümde değerlendirilme ihtiyacına sebep olan bir diğer etken de kesim artıklarının toprak üstü örtü kısmında birikmesi ve kuru halde olması orman yangınlarının başlama ve ilerlemesinde tehdit oluşturmasıdır. Ormanda kesim yapıldıktan sonra alanda bırakılan tüm kesim artıklarının arazideki örtüyü

kaplaması ve zamanla kuruması neticesinde orman yangınlarında başlayıcı en önemli üç unsurdan biri olan yanıcı madde miktarındaki fazlalığa sebebiyet vermektedir. Bu sebeple yangının başlama olasılığını artırması ve başlayan yangının daha büyük boyutlara ve alanlara yayılmasını sağladığından ormanlık arazilerde büyük tehlike oluşturmaktadır. Dolayısıyla şiddetli orman yangınlarının yaşanması toprak yangının oluşmasına ya da toprağın organik madde içeriğinin azalıp verimliliğinin ortadan kalkmasına sebep olabilmektedir. Özellikle yangın riski bakımından iğne yapraklı ağaç türlerinin bulunduğu ormanlardaki kesim artıkları zengin kimyasal içeriğe sahip olduklarından orman yangınlarının sıklığı ve şiddeti bakımından tehdit oluşturmaktadır (Ünal vd. 2004).

2.2 Ekstraksiyon

Bilimsel çalışmaların en önemli aşamasını oluşturan ve biyoaktif bileşenlerin bitki dokularının inert ve inaktif kısımlarından ayrılmasını sağlayan işlem basamaklarının tümüne ekstraksiyon denir. Biyoaktif bileşenleri elde etmek için birkaç adım gereklidir. İlk adımda, öğütülmüş katı ile çözücü birleştirilir ve çözücü numunenin matrisine nüfuz eder. Son olarak, çözünmüş maddeler çözücüye geçer. Tüm bu aşamalar incelendiğinde kütlenin taşınmasını ve çözünürlüğünü hızlandıran her unsur ekstraksiyonun kalitesini artırmaktadır (Oprescu vd. 2022). Bitkilerden elde edilen ekstraktlar; otsu ve odunsu bitkilerin yaprak, çiçek, kök, gövde, tohum, meyve veya kabuk gibi çeşitli kısımlarından bir ekstraksiyon yöntemine göre uygulanarak elde edilen etken madde veya bu bileşenlerin toplamı olarak ifade edilmektedir (Radosevic vd. 2015).

Bir numunenin ekstraksiyon işlemi dört farklı basamaktan geçmesiyle oluşmaktadır. Bu basamaklar; örneklemenin yapılması, örneklerin hazırlanması, örnek analizlerinin yapılması ve verilerin işlenip değerlendirilmesi şeklindedir. Numunelerin ön işlemleri basamağında örneklerin hazırlanması aşamasında seçilecek modern analitik metotlar çok önemli rol almaktadır. Hatta metodun belirlenmesi, çalışmada kullanılacak olan örneğin seçilmesi ve çeşitlendirilmesi aşamasında da yardımcı olabilmektedir. Örnek hazırlanma aşamasında seçilen metot ve uygulaması analiz için hata yapma payının en yüksek olduğu kısımdır. Numunelerin ön işlemle muamele edilmesindeki amaç,

analizin tayin edilebilirliğini, seçiciliğini, doğruluğunu, güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artırmak için elde edilmek istenen bileşenleri matriksten izole etmektir. Farklı bir bakış açısıyla numune hazırlama, kirli ya da karışık olarak ifade edilen bitki örneklerinin temizlenme işlemine tabi tutulması olarak da söylenebilmektedir. Bu işlemlerin yapılması aşamasında, elde edilmek istenen bileşenlerin ölçülebilen uygun seviyeye gelmesi ve yüksek oranlarda içerik saptanabilmesi için en doğru analitik yöntemin seçimi önemlidir. Çalışma için doğru numune hazırlama, bitki örneğinin kendi doğal yapısına ve uygulanan analitik yönteme bağlıdır. İlk başta bitki örnekleri matrikslerine göre, organik ya da inorganik olarak ayrılmakta ve katı, sıvı veya gaz olarak alt gruplara sınıflandırılmaktadır. Genellikle sonraki aşamada bitki örneklerinin ekstraksiyon işlemine geçmeden önce kurutulması ve boyutlandırılması yapılmaktadır. Daha sonrasındaki en önemlilerinden olan ön işlem basamağı ekstraksiyon işlemidir (Chemat vd. 2017; Kellner, vd. 2004; Rasul, 2018).

Bilimsel çalışmalarda kalitatif ve kantitatif sonuçlar elde edebilmek için en önemli ilk adım numunelerin ekstraksiyon yönteminin belirlenmesidir. Bitki özütünün elde edilmesi, çalışmanın nihai sonucu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. En uygun ekstraksiyon yönteminin seçilmesi sonucunda en iyi verinin elde edilmesi kolaylaşacaktır. Gıdalarda istenen bileşenlerin ekstraksiyonu için zaman içerisinde çok farklı yöntemler geliştirilmiştir (Fu vd. 2021). Otsu ve odunsu bitkilerde bulunan flavonoid ve fenolik bileşiklerin ekstraktları farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak elde edilebilmektedir. Farklı ekstraksiyon yöntemleri arasından en uygun yöntemin seçilmesinde çalışacağımız bitkinin kimyasal yapısı, bileşen miktarlarının değişkenliği, matrikslerin heterojenliği ve bileşenlerin polariteleri gibi birçok özellik göz önünde bulundurulmaktadır (Azmir vd. 2013).

Bilimsel araştırmalarda yürütülen çalışmalarla elde edilen ekstrakt ve yağların büyük bir bölümü ticari öneme sahiptirler. Ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen ekstrakt ve yağlar veya bu numunelerdeki etkin bileşenlerin bazıları tarımsal faaliyetlerde, kozmetik ve parfümeride, koruyucu ve lezzet verici olarak gıda sanayisinde, doğal tedavi amaçlı halk ilaçlarının kullanımında ve farmakolojide tercih edilmektedir. Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen özütlerin, antioksidan, antiseptik,

antioksijenik, antiviral, antienflamatuvar, sindirim uyarıcı, antifungal, antibakteriyel ve antiparazitik gibi çok yönlü özellikleri araştırılmaktadır. Günümüzde bu konu ile ilgili yapılan araştırmalar ve çalışmalarda çeşitli yöntemlerle bitki örneklerinden elde edilen özütlerdeki etkin bileşenlerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiş mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesi amacıyla oldukça yaygın hale gelmiştir. Elde edilen bileşiklerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmaların etkisizleştirilmesi üzerine yapılan çalışmalara ağırlık verilmiştir (Lawrence ve Lawrence, 2011).

Gerçekleştirilen birçok çalışmada en çok araştırması yapılan konu başlığı ekstraktların ve yağların antimikrobiyal özellikleri üzerine olmaktadır. Antimikrobiyal içeriklerin daha fazla araştırılmasına sebep, elde edilen özütlerin etkin maddelerindeki bileşenlerinde bulunan kompleks karışımlarından kaynaklanmaktadır. Elde edilen ekstrakt ve yağların bileşenlerinde bulunan maddelerin çeşitliliğine ve miktarına göre özütlerin etki dereceleri değişkenlik göstermektedir. Bu konularla ilgili yapılan çalışmalarda sonuçların değerlendirilmesi neticesinde yapılan çıkarımlara göre ekstrakt ve yağların kimyasal yapılarıyla ilişkili olduğu ve yağların lipofilik özelliklerinin de etkili olduğu tespit edilmiştir. Çeşitli yöntemlerle elde edilen yağlar pozitif veya negatif olarak mantar ve bakteriler de dahil olmak üzere birçok mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal, antibakteriyel ve antifungal özellikler göstermektedir. Örneğin; *Escherichia coli* O157 ve *Salmonella typhimurium* mikroorganizmalarına karşı, bitki numunelerinden elde edilen yağların bileşenlerinde bulunan fenilpropanoid kategorisindeki sinnamaldehit ile izomerik fenol sınıfında bulunan karvakrol ve timol yapılarının etkili olduğu görülmüştür (Beyaz, 2014).

İyi bir ekstraksiyon işlemi gerçekleştirmek için ucuz, kolay, hızlı ve çevre dostu bir yöntem seçmek ve istenen biyoaktif bileşenleri yüksek verimle elde etmek gerekmektedir. Bu nedenle gelişen teknolojiye paralel olarak çözücü seçimi ve numune hazırlama gibi yöntemlerde de gelişmeler olmuştur (Pawliszyn, 2003). Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi bazı modern ekstraksiyon yöntemleri, örneklerden biyoaktif bileşiklerin elde edilmesinde avantajlara sahiptir. Ekstraksiyon işleminde verimi etkileyen önemli parametreler; katı sıvı oranı, çözücü

tipi, sıcaklık, zaman, pH ve partikül boyutudur. Klasik (geleneksel) ve modern yöntemler olmak üzere iki farklı ekstraksiyon yöntemi başlığı bulunmaktadır (Calinescu vd. 2021).

2.2.1 Geleneksel Ekstraksiyon Yöntemleri

2.2.1.1 Maserasyon

Basit ekstraksiyon yöntemlerinden olan maserasyon yönteminde, otsu veya odunsu bitki örneği küçük parçalar halinde kesilir ve daha sonra çözücü ile birlikte bir kaba alınır. Hazırlanan karışım istenilen süre ve sıcaklığa bağlı olarak oda sıcaklığında veya inkübatörde tutulmaktadır. Belirlenen süre geçtikten sonra filtrasyon işlemi uygulanarak ekstraksiyon işlemi tamamlanmaktadır. Maserasyon işleminde daha etkili sonuçlar elde etmek için kabın karışımla birlikte çalkalanması, çözücünün numuneye daha iyi nüfuz etmesini sağlamaktatır (Zhang vd. 2018). Maserasyon işlemi 3 aşamada gerçekleşmektedir (Çopuroğlu, 2013);

Numune ve çözücü karıştırılmakta ve genellikle oda sıcaklığında olmak üzere belirli bir süre saklanmaktadır. Daha sonra sıvı, karışımdan süzülmektedir. Son aşamada filtrelenerek daha berrak bir sıvı haline getirilmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Maserasyon düzeneği (Kumar vd. 2023)

Diğer ekstraksiyon yöntemlerinde olduğu gibi maserasyon yönteminin de hem olumlu hem de olumsuz yönleri vardır. Kolay uygulanabilir bir yöntem ve basit deney düzeneğinin olması olumlu yönlerinden biridir. Ancak buna karşılık, uzun ekstraksiyon süreleri ve düşük verim dezavantajıdır. Ayrıca maserasyon yöntemi

genellikle ısıya dayanıklı bileşenlere sahip numunelere uygulanabilmektedir (Handa vd. 2008).

2.2.1.2 İnfüzyon

Maserasyona benzer geleneksel bir yöntemdir. İnfüzyon yönteminde çözücü, bitki örneğine sıcak veya soğuk olarak uygulanmaktadır. İnfüzyon işlemine başlamadan önce ekstrakte edilmek istenen bitki örneği toz haline getirilmektedir. Sonraki aşamada, toz haline getirilmiş bitki örneği temiz bir kaba alınarak üzerine sıcak veya soğuk ekstraksiyon çözücüsü eklenmektedir (Şekil 2.2). Ekstraktın kullanım amacına bağlı olarak, bitki örneği ve çözücü oranı genellikle 1:4 veya 1:16 oranına göre hazırlanmaktadır. Sonrasında, çözücü ile karıştırılan bitki örneği kısa bir süre bekletilmektedir. Bu yöntem daha çok, kolayca çözünebilen biyoaktif bileşenlerin bulunduğu bitki örneklerinde tercih edilmektedir. Ekstraktın kullanılmadan önce pratik bir şekilde hazırlanabiliyor olması infüzyon yönteminin yaygın olarak kullanılan geleneksel bir yöntem olmasını sağlamıştır (Abubakar ve Haque, 2020; Ergen vd. 2018).



Şekil 2.2. İnfüzyon aparatı (Belwal vd. 2018)

2.2.1.3 Sindirim ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işlemi esnasında 40-60°C aralığında ısının uygulandığı maserasyon yöntemine benzeyen geleneksel bir metotdur. Belirlenen aralıktaki sıcaklık sakıncalı olmadığından tercih edilmektedir. Yöntemin uygulanma prensibi; temiz bir kaba alınan ekstraksiyon çözücüsünün üzerine toz haline getirilmiş bitki materyali eklenmektedir. Sonrasında karışım 50°C civarında olan bir fırına ya da su banyosuna yerleştirilmektedir. Sıcaklık; çözücünün viskozitesinin azaltılması ve bitki örneğinden

sekonder metabolitlerin daha kolay ayrılması için kullanılmaktadır. Ekstraksiyon işlemi boyunca karışım, el ile çalkalanarak, mekanik veya manyetik karıştırıcılar yardımıyla karıştırılabilmektedir. 8-12 saat sonunda karışım süzülerek ekstrakt çözücüden ayrıştırılmaktadır. Bitki örneğinden tam verimle ekstrakt elde edilmesi için taze çözücü eklenerek süzme işlemi tamamlanmaktadır (Hussain vd. 2019; Jha ve Sit, 2022; Rasul, 2018).

2.2.1.4 Presleme

Presleme yöntemi, katı veya sıvı bir maddenin bir basınç uygulanarak filtrelenmesi tekniğine dayanır. Soğuk presleme ve sıcak presleme olmak üzere iki teknik vardır. Otsu ve odunsu bitkilerden uçucu yağ elde edilmesi sürecinde kullanılan damıtma yönteminde, sıcaklığın uçucu bileşenlere zarar vermesi nedeniyle soğuk presleme ile uçucu yağ elde edilmesi tercih nedenlerinden biridir (İmer ve Taşan, 2018).

Soğuk pres yönteminde numune herhangi bir kimyasalla muamele edilmez ve 40°C'lik bir ısıya maruz bırakılır. Sanayi kuruluşlarında yağlı tohumlardan yağ elde etmek için soğuk pres yöntemi 4 aşamada tamamlanmaktadır. Bu aşamalar sırasıyla; ön temizleme, kurutma, öğütme ve son adım olarak preslemedir (Campbell vd. 2016).

Basit presleme tekniğinde ise bazen süzülen bitki materyali bez torbalara konularak üzerine mekanik bir basınç uygulayacak hidrolik presler yardımıyla sıkıştırılmakta ve bu şekilde yağ çıkarma işlemi gerçekleştirilmektedir. Bazen de mekanik bir mekanizma vasıtasıyla, kapalı kabin içerisinde basınç uygulanmasına yardımcı olacak pistonun döndürülmesi ile bitki numunesinden yağ eldesi gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.3).



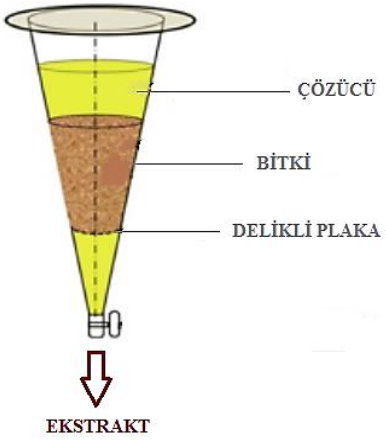
Şekil 2.3. Soğuk pres düzeneği (Geramitcioski vd. 2018)

Soğuk pres yönteminin en önemli avantajlarından birisi düşük enerji gerektirmesi ve çözücü kullanılmamasıdır. Presleme yöntemi sayesinde uçucu yağlardaki en önemli bileşenlerden olan polifenoller, diğer ekstraksiyon yöntemlerinde olduğu gibi çözücü kullanımı ve yüksek sıcaklık uygulaması olmadığı için yapısal olarak zarar görmezler. Fenolik bileşikler, bitkilerde yüksek antioksidan aktiviteye neden oldukları ve serbest radikallerin neden olduğu oksidatif bozulmayı önledikleri için büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle fenolik bileşen içeriği zengin olan yağ elde etme imkanı sağladığı için soğuk pres yöntemi tercih edilmektedir (Maier vd. 2009). Sıcak preslemede, mekanik işlem sürecinde bir ısıl işlem gerçekleşeceğinden numunedeki polifenollerin yapısal olarak ayrışması; yağın renk, koku ve tadında istenmeyen değişikliklere neden olacağından soğuk presleme tercih edilebilmektedir. Ancak soğuk presleme yöntemi ile elde edilen yağların verimi diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha düşük olmaktadır. Bu dezavantaj, ürünün sanayide kullanımında üretim kapasitesinde zorluklara neden olabilmektedir (Karabaş, 2013).

2.2.1.5 Süzme

Sıvı ekstraktların hazırlanmasında aktif bileşenlerin elde edilmesi için en sık kullanılan geleneksel yöntemlerden birisidir. Süzme işleminde, perkolatör olarak bilinen her iki ucu açık dar bir koni şeklinde olan cam bir malzeme kullanılmaktadır. Süzme işlemi için ilk olarak; kurutulmuş bitki örneği, öğütülüp toz haline getirilmektedir. Daha sonra toz haline getirilmiş bitki örneği temiz bir kapta ekstraksiyon çözücüsü ile karştırılarak 4 saat boyunca bitki materyalinin ıslatılması sağlanmaktadır. 4 saatin

sonunda karışım altı tıkalı perkolatöre aktarılmakta ve oda sıcaklığında 24 saat boyunca bekletilmektedir (Şekil 2.4) (Majekodunmi, 2015).



Şekil 2.4. Perkolatör (Alara vd. 2021)

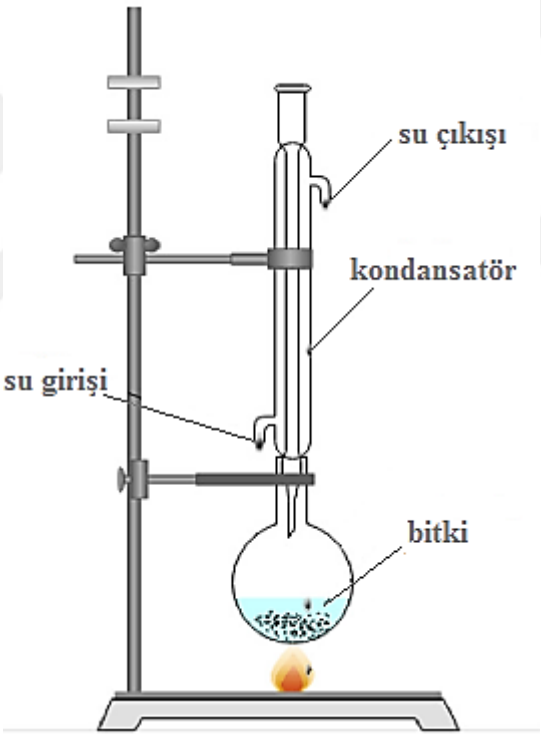
Karışım, üzerinden çözücü ilave edilerek tam doygun hale getirilmekte ve perkolatörün alt kısmı açılarak sıvının yavaşça damlaması sağlanmaktadır. Yerçekiminden yararlanılarak karışımdaki çözücünün süzülmesi için yüksek oranda ekstrakt kalıncaya kadar bir miktar çözücü ilavesi gerçekleştirilmektedir. Daha sonrasında ekstrakt filtrasyon yöntemi ile ayrılmaktadır (Belokurov vd. 2019; Zhang vd. 2018).

2.2.1.6 Kaynatma

Bitki örneğinin belirli hacimde suda kaynatılması prosedürüne dayanmaktadır. Ekstrakte edilmek istenen bitki örneği kurutulup öğütüldükten sonra toz haline getirilmektedir. Toz haline getirilmiş bitki örneği 15-20 dakika belirli hacimdeki suda kaynatılmaktadır. Ekstraktın kullanım amacına bağlı olarak bitki örneği ve çözücü oranı genellikle 1:4 ya da 1:16'dır. İşlemin hızlı olması ve ekstraksiyonun gerçekleşmesi için ekstraksiyon süresi boyunca ısı uygulanmaktadır. Uygulanan ısı ile birlikte ekstraksiyon süresince buharlaşmadan kaynaklı çözücü hacminde düşüş gerçekleşmektedir. Kaynatma işlemi tamamlandıktan sonra karışım soğutulmakta ve sonrasında süzülmektedir (Chemat vd. 2017; Hussain vd. 2019; Ingle vd. 2017).

2.2.1.7 Geri akış

Soxhlet düzeneğine benzeyen katı-sıvı ekstraksiyon yöntemidir. Geri akış; bitki örneğinin kaynayan bir çözücü ile sabit sıcaklıkta, çözücü kaybı olmadan belirli süre tekrarlanması işlemidir. Bitki örneği ve çözücü cam balon içerisine konulmakta ve cam şişe üzerine kondansatör yerleştirilmektedir (Şekil 2.5). Bu düzenek sayesinde çözücünün buharlaşma ve yoğunlaşma işlemi gerçekleşmektedir. Geri akış ekstraksiyonu kullanımı pratik, verimli ve düşük maliyetli olmasından dolayı bitki ekstraktı endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Chua vd. 2016; Zhang vd. 2018).



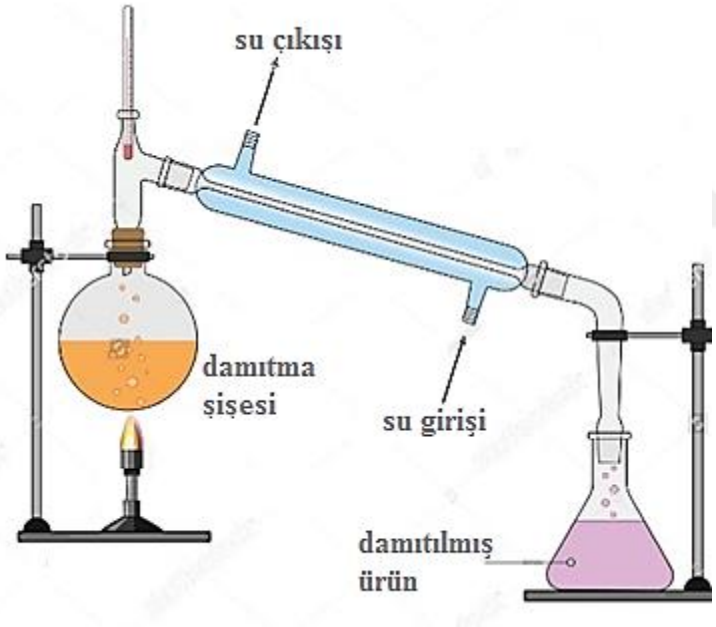
Şekil 2.5. Geri akış düzeneği (Abd Aziz vd. 2021)

2.2.1.8 Tentür

Bir veya birkaç bitki örneğinin alkol ile muamele edilmesiyle gerçekleşen ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntemde genel olarak taze bitki örneği etil alkol ile belirli bir oranda karıştırılarak gerçekleştirilmektedir. Alkolle karışmış halde bulunan ekstrakt (tentür) içeriğindeki alkolden dolayı oda sıcaklığında bozulmadan bekletilebilmektedir (Rasul, 2018).

2.2.1.9 Damıtma

Çalışma prensibi; iki veya daha fazla sıvı bileşenin kaynama noktalarının veya uçuculuklarının farkını kullanarak ayrıştırılması işlemine dayanmaktadır (Şekil 2.6). Farklı kaynama noktalarına sahip maddelerden oluşan karışımın kaynama noktalarına kadar ısıtılmasıyla, kaynama noktası düşük olan madde öncelikli olarak buharlaştırılmaktadır (Kaya ve Ergönül, 2015). Sonrasında, buharlaşan madde damıtma aparatının soğutma ünitesi tarafından yoğunlaştırılmaktadır. Damıtma yönteminde uçuculuk seviyelerinde büyük farklılıklar olan maddeleri ayırmak daha kolaydır. Bu yöntemin temel amacı; uçucu olmayan bir maddeden uçucu bir sıvıyı veya farklı uçuculuk seviyelerindeki sıvıları uzaklaştırmaktır (Cellat, 2011; Elguea-Culebras vd. 2022).

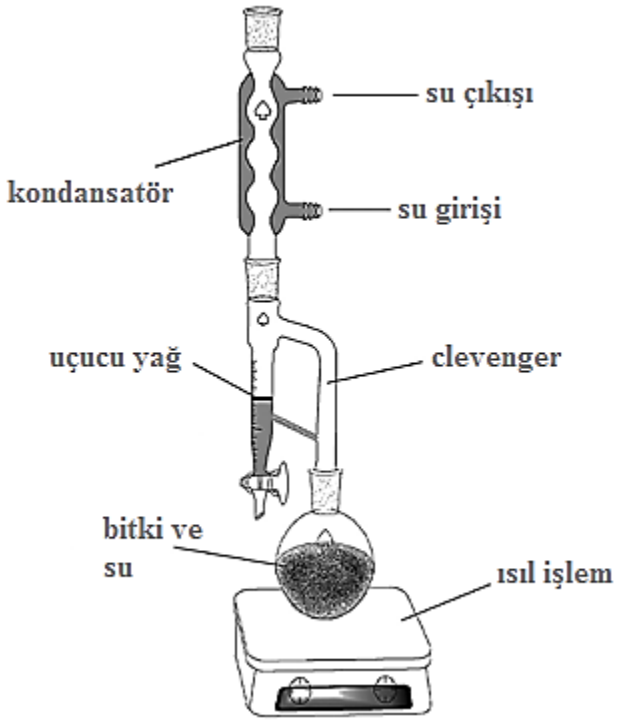


Şekil 2.6. Basit damıtma düzeneği (Gavahian ve Farahnaky, 2018)

2.2.1.9.1 Sulu damıtma

Uçucu bileşiklerin elde edilmesinde en yaygın kullanılan geleneksel yöntemlerden birisidir. Kaynama noktasına ulaştığında bozulmayan taze veya kuru bitki örneklerine uygulanabilmektedir. Genel olarak küçük boyutlu veya toz halindeki bitki örneklerinde yüksek verim göstermektedir (Gavahian ve Farahnaky, 2018). Bu yöntemde cam bir balon içerisinde su ile doğrudan temas halinde olan bitki örnekleri

bir ısıtıcı yardımıyla 2-8 saat süreyle kaynatılmaktadır. Kaynatma işleminin gerçekleşmesi ile numune içerisindeki yağ molekülleri buharlaşan su ile birlikte gelmekte ve daha sonra mekanizmanın soğutma ünitesi asyesinde yoğunlaşan moleküller, sudan ayrılmaktadır (Akdağ ve Öztürk, 2019). Laboratuvarlarda küçük ölçekli çalışmalarda gerçekleştirilen sulu damıtma Şekil 2.7'deki clevenger aparatı ile gerçekleştirilebilmektedir. Ancak endüstriyel üretim yapan işletmelerde büyük hacimlerde çalışmak üzere damıtma kazanları kullanılmaktadır (Elguea-Culebras vd. 2022).



Şekil 2.7. Sulu damıtma düzeneği (Elguea-Culebras vd. 2022)

Sulu damıtma yöntemi ile elde edilen uçucu yağların verimi yüksektir. Diğer damıtma yöntemlerine kıyasla su damıtma yöntemi ile elde edilen yağların renkleri daha koyu ve kokuları daha etkilidir. Uçucu yağ elde etmek için çok miktarda bitki örneğine ve çözücüye ihtiyaç duyulması yöntemin olumsuz özellikleri arasında yer almaktadır. Sulu damıtma ile yüksek verimli yağ elde edilse de yöntemin olumsuz etkisi, yüksek sıcaklıklarda uzun süreli kaynatmanın bitki örneğinden ekstrakte edilmek istenen uçucu bileşenlerin bozunmasına neden olmasıdır (Gavahian ve Farahnaky, 2018; Kant ve Kumar, 2022).

2.2.1.9.2 Su buharlı damıtma

Su buharlı damıtma yöntemi, tıbbi ve aromatik bitkilerden yağ elde etmek için yaygın olarak kullanılan geleneksel yöntemlerden biridir. Bu yöntem sayesinde bitkilerdeki uçucu yağ miktarının yaklaşık %93'ü elde edilebilmektedir. Su buharlı damıtmada uçucu yağ elde edilecek bitki, gelişimini tamamlamış bitkilerden seçilmelidir (Antosz vd. 2022; Radwan vd. 2020).

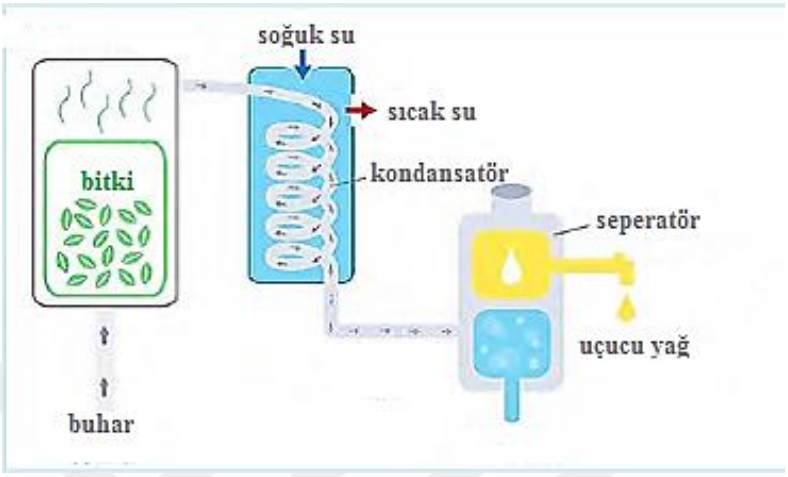
Su buharlı damıtma yöntemi, diğer yöntemlere kıyasla basit bir sisteme sahip kolay bir yöntemdir. Bir diğer avantajı ise; Su buharlı damıtmada çevreyi kirleten çözücüler yerine su buharının kullanılmasıdır. Bu sayede çevre dostu bir yöntem olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Avantajlarının yanı sıra, çalışmalarda ve üretimde olumsuz etkilere neden olan durumları da bulunmaktadır. Su buharlı damıtmanın en büyük dezavantajı; kullanılan tüm kaynakların miktarı yüksek olmasına rağmen düşük verimlerde uçucu yağ elde edilmesidir. Buna ek olarak damıtma işleminin çok uzun sürelerde gerçekleşmesi hem zaman kaybına hem de bitkiden elde edilmek istenen bileşenlerin yapısında bozulmalara neden olabilmektedir (Kant ve Kumar, 2022; Machado vd. 2022).

Su buharlı damıtmada buhar, damıtma kazanından ayrı bir yerde bulunan buhar jeneratörü tarafından üretilmektedir. Üretilen buhar, damıtma kazanına yerleştirilen tesisat içerisinden mekanizma sayesinde geçmektedir (Xavier vd. 2011). Su buharlı damıtma mekanizması damıtma prensibine göre çalışmaktadır. Buna göre, istenen bileşenleri ayırmak ve yoğunlaştırmak için sıvı karışım buhara dönüşene kadar ısıtılmaktadır (Kaya ve Ergönül, 2015).

Su buharlı damıtma aparatında karışmayan su ve uçucu yağ, olmak üzere iki sıvı bulunmaktadır. Sıvı karışımın kaynama noktası, Dalton'un kısmi basınç yasasına göre buhar basıncının toplam atmosfer basıncına eşit olduğu sıcaklıktır. Bu sayede, en uçucu bileşenin kaynama noktasından daha düşük bir sıcaklık oluşacaktır (Guntero vd. 2017).

Şekil 2.8'de Su buharlı damıtma düzeneği gösterilmektedir. Üretilen buhar bitki ile temas etmektedir. Kapalı kap içerisinde su ve uçucu yağ basınç altında sürüklenerek

kondansatöre iletilmekte ve orada yoğunlaştırılmaktadır. Yoğunlaşma sonucu toplama kabında biriken su ve uçucu yağ karışımı yoğunluk farkından dolayı ayrıştırılmaktadır (Cellat, 2011; Kant ve Kumar, 2022).



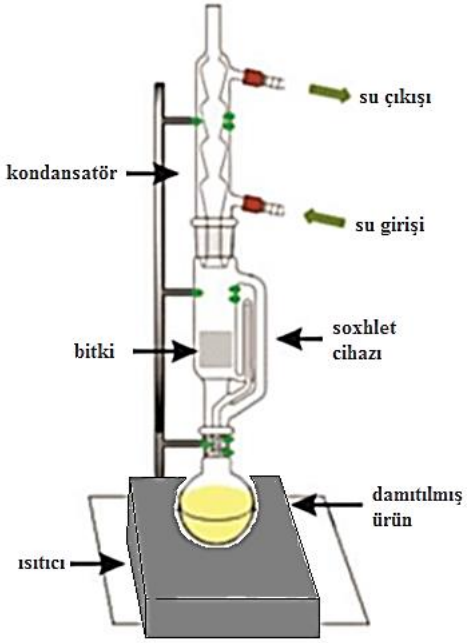
Şekil 2.8. Su buharlı damıtma düzeneği (Boukhatem, 2020)

Uçucu yağ üretimi endüstriyel anlamda değerlendirildiğinde, laboratuvar çalışmalarına kıyasla daha düşük verimle ürün elde edilmesi sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle sanayi kuruluşları olumsuz etkileri ortadan kaldırmak için Su buharlı damıtma eksikliklerini giderebilecek modifiye yöntemler geliştirmişlerdir (Hasinah Johari vd. 2020).

2.2.1.10 Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu, en eski ekstraksiyon yöntemlerinden birisi olmakla birlikte hala daha çalışmalarda geniş ölçüde kullanılmaktadır. Katı veya yarı katı örneklerin ekstraksiyonunda tercih edilen bu yöntem özel cihazıyla kurulu düzenek ile gerçekleşmektedir. Soxhlet ekstraktör düzeneğinde, soğuk su devir daimi ile soğutma işlemi yapan kondenser (yoğuşturucu), katı örneğin bulunduğu ve çözücü ile örneğin buluştuğu ve sıvı akış borusunun (sifon) bulunduğu sokselet, bir çözücü şişesi ve ısıtma işlemini gerçekleştiren cepli ocaktan meydana gelmektedir (Şekil 2.9). Ekstraksiyon işleminin gerçekleşmesi için başta özütü elde edilmek istenen katı örnek sokselet içerisine alınmaktadır. Soxhletin alt kısmından bağlantı yapılan çözücü şişesine de ekstraksiyonda kullanılacak çözücü alınır. Cepli ocak yardımıyla çözücü kaynama noktasının üzerinde sıcaklığa getirilir ve kaynamaya geçen çözücü

buharlaşarak kondensere geçer ve orada da yoğunlaşarak sokselet içerisinde bulunan örneğin üzerine damlamaya başlar. İşlemin devam etmesiyle örneği ıslatan çözücü sokseleti doldurmaya başlar ve sifonun üst seviyesine ulaştığında çözücü sokseletten boşalarak tekrar alt kısımdaki çözücü şişesine dolar. Bu şekilde sirkülasyonun gerçekleşmesiyle örnek, çözücü ile birkaç defa muamele olmaktadır. Her devir daimde ekstrakte olan bileşenler çözücü şişesine geçmekte ve burada kalmakta, çözücü şişesindeki sadece çözücü buharlaştığı için her devir daim de yalnızca temiz çözücü kullanılmaktadır. Geleneksel soxhlet ekstraksiyonunun zamanı 6 ile 24 saat arasında gerçekleşmektedir. Ekstrasiyon işlemi aşamasında kaç defa devir olduğunun ve ne kadar zaman sürdüğünün bilinmesi çalışma konusunda sonuçların rapor edilmesinde fayda sağlayacak bilgilerdendir. Ekstraksiyon işleminde çözücü şişesine eklenen çözücü hacmi 100-500 ml aralığında değişmektedir. Ekstraksiyon için genellikle saf organik çözücüler ya da bunların karışımından elde edilen çözücüler tercih edilmektedir. Soxhlet ekstraksiyonun asıl amacı, katı örneklerin içeriğinde bulunan organik bileşiklerin elde edilmesidir. Ekstrasiyon aşamasında örnekte bulunan organik bileşiklerin, çözücü kaynama sıcaklığına ulaştığında yapılarının bozunmaması yani kararlı olmaları gerekmektedir. Aynı anda birden fazla ekstraksiyon işleminin gerçekleşebileceği soxhlet düzenekleri bulunmaktadır. Soxhlet düzeneğinin ekstraksiyon işleminden sonra başka bitki türleri ile tekrar kullanılabilmesi için, örneğin çözücü ile muamele olduğu bölmesinin bir önceki işlemden herhangi bir kalıntı kalmayıncaya kadar temizlenmesi gerekmektedir (De Castro ve Priego-Capote, 2010; George vd., 2019; Kellner, vd. 2004; Oluwaseun vd., 2018).



Şekil 2.9. Soxhlet düzeneği (Guntero vd. 2017)

Geleneksel yöntemlerden biri olan soxhlet ekstraksiyonun bazı avantajları bulunmaktadır. Özütü elde edilmek istenen örnek sürekli temiz çözücü ile muamele olduğu için örneğin matriksinden bileşenlerin çekilmesi artmaktadır. Soxhlet düzeneğinde ekstraksiyon işleminin gerçekleşmesini sağlayan en temel etkenlerden biri olan ısının sağlandığı ocaklar sayesinde sıcaklık istenilen seviyede sürekli tutulabilmektedir. Ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen özütün içerisinde katı örnekten olmayacağı sadece sıvı çözelti olacağından filtrasyona ihtiyaç duyulmamaktadır. Düşük maliyetli ve basit ekipman kullanımının avantajı olarak, elde edilen özüt miktarını fazlalaştırabilmek için aynı sürede paralel olarak ekstraksiyon gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca soxhlet ekstraksiyon yöntemi çok uğraştırmayan basit bir tekniktir. Modern ekstraksiyon yöntemlerinin (mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyonu vb.) çoğundan daha fazla kütlede örnek kullanılarak ekstrakte edilmektedir (De Castro ve Priego-Capote, 2010; Luque-Garcia ve De Castro, 2004).

Katı örnek hazırlama için kullanılan ekstraksiyon yöntemlerine kıyasla soxhlet ekstraksiyonun dezavantajları bulunmaktadır. Çok fazla çözücü ihtiyacının olmasından dolayı bir zarar oluşturmasının haricinde çok miktardaki çözücünün zararsız hale getirilmesi maliyetli olmakta ve buna ilaveten çevresel problemlere

sebebiyet vermektedir. Ekstraksiyon sürelerinin çok uzun olması zaman kaybı açısından problem olmasının haricinde, örneklerin genellikle çözücünün kaynama noktasında uzun süre ekstrakte edilmesi ve bu aşamada düzeneğin ısısının sabit tutulamaması gibi sorunlarla karşılaşılması sebebiyle termal olarak kararsız olan hedef bileşiklerin yapısının bozulmasına yol açabilmektedir. Soxhlet düzeneğinde ekstraksiyon sürecini hızlandırmaya yarayacak çalkalama işlemi bulunmamaktadır. Soxhlet tekniğinde fazla miktarda çözücü kullanılması ve ekstraksiyon işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen çözelti içerisindeki özütün çekilebilmesi için ayrıca çözücünün buharlaştırılması aşamasının uygulanması gerekmektedir. Bu derişim işlemi aşamasında özütten kayıpların olması riski de bulunmaktadır. Ayrıca soxhlet ekstraksiyon yönteminde çözücü seçiminde kısıtlamaların olması ve düzeneğin otomasyonunda kontrol zor olduğu için çalışmalarda problemler yaşanabilmektedir (De Castro ve Garcia-Ayuso, 1998; De Castro ve Priego-Capote, 2010).

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden en çok tercih edilen soxhlet ekstraksiyon yönteminin uzun zamandır kullanımına sebep olan avantajları kanıtlanmıştır. Bu avantajların yanında bazı eksikliklerin bulunmasıyla yöntemin dezavantajları ile karşılaşılmıştır. Ancak bu eksikliklerin giderilmesi için yapılan revizeler ile modern versiyonlar geliştirilmiştir. Bu geliştirilen versiyonlar; otomatikleştirilmiş soxhlet ekstraksiyon, basınçlı soxhlet ekstraksiyon, ses dalgaları destekli soxhlet ekstraksiyon ve mikrodalga destekli soxhlet ekstraksiyonudur. Modern sürümler ile dezavantajların ortadan kaldırılması için:

1. Otomatikleştirilmiş soxhlet ekstraksiyonunda kullanılan değişik özellikteki birkaç ticari ekstraktörün buluştuğu ortak noktalar: çözücünün hacmini azaltma, ekstraksiyon süresini kısaltmak ve aynı zaman içerisinde birkaç örneğin ekstraksiyon işleminin yapılabilmesini sağlamaktır. Ancak bu cihazların en önemli dezavantajları çok yönlü, fonksiyonlu kullanılamamaları ve yüksek maliyetli olmalarıdır.

2. Basınçlı soxhlet ekstraksiyonunda, katı örneğin konulduğu kartuşa basınç uygulayarak ve bu uygulanan basıncı da artırarak, çözücünün kartuştaki örneğe daha kolay nüfuz etmesi sağlanmaktır. Bunun gerçekleştirilmesiyle birlikte kullanılan çözelti miktarı azalmış ve ekstraksiyon süresi de kısalmıştır. Fakat bu yöntem için

dezavantaj olarak yüksek basınçta çalışmak ve deneysel kurulumda zorluk yaşanması gibi sorunlarla da karşılaşılmıştır.

3. Soxhlet ekstraksiyonun dezavantajlarını gidermek ve en uygun düzeneği oluşturmak için tercih edilebilecek olan yenilik ise ekstraksiyonun mekanik düzeneğinin, mikrodalga kullanımı ve ultrasonik enerji gibi dış enerjilerle desteklenmesidir (George vd. 2019; Zhang vd. 2018).

Geçmişten günümüze kadar soxhlet ekstraksiyonu, gıda ve çevre analizlerinin yapıldığı çalışmalarda örnek hazırlama aşamasında kullanılan bir yöntem olmuştur. Falandysz ve arkadaşları balıkta bulunan poliklorlu bifenilleri tayin etmek için balıkların kas dokularını alıp homojenize etmişlerdir. Homojenize edilen örnekler petri kaplarında dondurulmuş ve sonrasında liyofilize edilmiştir. Sonrasında da soxhlet cihazının gelişmiş bir versiyonunda (Soxtec HT6) hekzan ile ekstrakte edilmiştir (Falandysz vd. 2004). Diagne ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, 10 g fasulye örneğini 200 ml diklormetan ile 24 saat boyunca diklormetanın kaynama sıcaklığına göre muamele ederek fasulyeden organofosforlu bir insektisit olan fenitrotiyon kalıntılarını ekstrakte etmişlerdir. Daha sonrasında elde edilen çözeltideki çözücüyü uçurarak elde edilen zengin özüt yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve GC-ECD ile tayin edilmiştir (Diagne vd. 2002).

2.2.2 Modern Ekstraksiyon Yöntemleri

Günümüzde ekstraksiyon yöntemleri geleneksel ve yeni teknoloji ekstraksiyon yöntemleri olarak iki başlık altında toplanabilir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri olarak çalışmalarda da karşılaştırılmaların yapılabilmesi amacıyla çokça tercih edilen teknikler soxhlet ve maserasyon yöntemleridir. Bu iki yöntemin uygulamada oluşturduğu en önemli sorun, uzun ekstraksiyon süreleri ve kullanılan çözücülerin hem miktar hemde içeriği bakımından çevreyi kirletici etkide olmasıdır. Yeni teknoloji ekstraksiyon yöntemlerinden en çok tercih edilen, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve süperkritik sıvı ekstraksiyonu son yıllarda geliştirilen kısa ekstraksiyon süreli ve verimde etkin olan modern yöntemlerdendir (Azmir vd. 2013; Hussain vd. 2019; Moyler,1993).

Nitel ve nicel analiz çalışmalarında, öncelikli olarak ölçümlerin yapılabileceği örnek hazırlama işlemine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu hazırlık aşamasında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri, çalışmanın olmazsa olmaz can alıcı noktalarından birisidir. Adını mucidinden alan soxhlet ekstraksiyonu, F. Soxhlet tarafından 1879 yılında geliştirilmiş ve 1980'li yıllara kadar çok popüler olarak kullanılmıştır. Günümüzde hala geleneksel yöntem olarak çoğu çalışmada soxhlet ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Eski zamanlardan beri kullanılan geleneksek ekstraksiyon yöntemlerinin olumsuzluklarını ortadan kaldırmak amaçlı son yıllarda gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerine talep artışı olmuştur. Bu durumun en büyük sebeplerinden birisi yeni ekstraksiyon tekniklerinin sürelerinin daha kısa olması, otomasyona uygunluk göstermesi, laboratuvarlarda kirliliğin azalması, organik çözücülerin kullanım miktarının azalması ve tüm bu olumlu katkıların sebep olduğu örnek hazırlama aşamasındaki maliyetin düşük olmasıdır (Eskilsson ve Björklund vd. 2000; Wan ve Wong, 1996).

Teknolojinin gelişimiyle paralel olarak ekstraksiyon yöntemlerinde gelişmeler ve yenilikler oluşmakta ve bu sayede uygulama alanlarına göre yöntem tercih edilmektedir. Sürekli gelişmekte olan teknolojiyle ve çevreye karşı duyarlılığın da artmasıyla birlikte, çalışmalardaki örneklerin hazırlanmasında yeni uygulamalara başlanmıştır. Tüm bu uygulamalar; minyatürleştirme, mikroekstraksiyon ve analitik yöntemlerde kullanılan kantitasyon, örnekleme ve ayırma işlemlerinin birbirine uyumlu hale getirilmesi, entegre edilmesiyle gerçekleşmektedir (Pawliszyn, 2003). Klasik ekstraksiyon yöntemlerinin yerine, gelişen teknolojiyle ve çevre duyarlılığıyla uyumlu geliştirilen yöntemlerle, çalışmalardaki örnek hazırlama aşamaları; mikrodalga destekli ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyon, ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyon, süperkritik sıvı ekstraksiyon ve sonikasyon destekli sıvı ekstraksiyon gibi tekniklerden oluşan ekstraksiyon yöntemleri ile gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Bu ekstraksiyon yöntemlerinin tercih edilmesine sebep olan en önemli benzer özellikleri; ekstraksiyon aşamasında yüksek basınç ve sıcaklıkta daha kısa sürede hazırlık aşamasının gerçekleştirilmesidir (Büyüktuncel, 2012; Wen vd. 2018).

Destilasyon yönteminin uygulamasında yüksek buhar sıcaklığının olması ve de stabil bir durumda kalamamasından dolayı, belirli saflıkta ve hoş bir aromaya sahip ürün

elde etmek için kullandığımız numunelerdeki aromatik bileşikler uygulama sırasında zarar görerek verimi düşürebilir. Bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda koku bileşenlerinin çiçeklerden ayrılmasını sağlayan farklı özelliklerde çözücüler kullanılabilmektedir. Bu sebeple amaca göre, uçucu olan ya da olmayan diye iki farklı çözücü türünden birisi uygulama için tercih edilebilmektedir. Uçucu olmayan çözücülerle gerçekleştirilen ekstraksiyon yöntemleri; enfloraj ve maserasyon'dur (El Maaiden vd. 2022; Polat ve Ötles, 1997).

2.2.2.1 Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (pressurized liquid extraction, PLE)

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu olarak da bilinen bu yöntem yeni teknikler içerisindedir. Geleneksel çözücülerin daha yüksek sıcaklıklarda kullanıldığı, örneğin yüksek basınç altında sızıntı yapmadan kalmasını sağlayan ekipmandan oluşmaktadır. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu yönteminde verimi en çok etkileyen faktörlerden biri ekstraksiyon sırasında uygulanan sıcaklıktır. Yüksek sıcaklıkta uygulama ile örnek matriksinde bulunan hidrojen bağı, dipol çekim ve van der Waals kuvvetleri gibi etkileşimlerin bozunmasına yardımcı olarak ekstraksiyon veriminin yüksek olmasını sağlamaktadır (Richter vd. 1996; Richter vd. 2000). Ekstraksiyon yönteminde sıcaklık kullanımı ile farklı moleküller arasında adhezyon, aynı moleküller arasında da kohezyonun oluşması sağlanmakta ve bu sayede de desorpsiyon aşamasında etkin duruma geçme için gerekli olan enerji ihtiyacı da azalmaktadır. Ekstraksiyon aşamasında sıcaklığın yükselmesi ile çözücünün, çözünen yapının ve matriksin yüzey gerilimi düşeceğinden örneğin ıslanma oranı artacaktır. Çözücünün yüzey geriliminin azalması örnekteki bileşenlerin çözücü içerisinde daha hızlı çözünmesini sağlamaktadır (Mockel vd. 1987). Sıcaklığı artan sıvı çözücünün viskozitesi azalacağından örneğin matriks partiküllerinin içerisine girmesi de daha kolay ve hızlı olmaktadır. Bu sayede güçlü bileşen ve matrikslerin etkileşimlerini kısa sürede bozulmasını sağlayarak denge difüzyona ulaştırabilmektedir. Bu özellik sayesinde difüzyon kontrollü örneklerde daha hızlı ekstraksiyonlar gerçekleştirilebilmektedir. Basınçlı sıvı ekstraksiyonda, yüksek difüzyon sıvıları kullanılarak ekstraksiyon süresini ve gerekli olan çözücü miktarını azaltmak fayda sağlayan özelliklerindendir. PLE yöntemi ile yüksek basınç ve sıcaklık kullanımıyla ekstraksiyon kinetiği

hızlandırılmakta ve sıvı ekstraksiyonu geliştirilmektedir (Kaufmann ve Christen, 2002; Moreno vd. 2007; Mustafa ve Turner, 2011).

Genel olarak ekstraksiyon işlemi çözücünün atmosferik kaynama noktasının üstünde bir sıcaklıkta gerçekleştirilmekte ve bu sayede de çözücü örnek matriksinin içine kolay nüfuz edebilmektedir. Çözücünün nüfuz ettiği örnekteki bileşenlerin yayılma gücü artmakta ve çözücünün bünyesine geçmektedir (Lundstedt vd. 2000; Richter vd. 1996). Ekstraksiyonun gerçekleşme aşamasında uygulanan basınç sayesinde sıcaklık çözücünün kaynama noktasını aşsa da çözücünün sıvı halde kalmasını sağlamaktadır. Ayrıca matriksde bulunan hava kabarcıklarının çözücünün bileşene ulaşmasını engelleyici durumu yüksek basınç uygulaması ile bertaraf edilebilmektedir (Rostagno vd. 2009).

Soxhlet ekstraksiyon yöntemine göre daha hızlı olan basınçlı sıvı ekstraksiyon yönteminde ısıtma işleminden sonra ekstraksiyon olayının gerçekleştiği bölmedeki sıcaklık, çözücünün kaynama sıcaklığı altına kadar düşürülmekte ve sonrasında ekstraksiyon bölmesine yüksek basınç uygulanmaktadır. Uygulanan bu basınç, çözücü ve ekstrakte edilmek istenen örneği bir filtreden geçirerek dışarı çıkarmaya çalışmaktadır. Ekstraksiyonda kinetiği artırmak için 200°C sıcaklığa kadar çıkılacağından, çözücünün kaynayıp buharlaşmasını önlemek amacıyla 20 MPa kadar basınç gerekmektedir. Geleneksel sıvı ekstraksiyon yöntemlerine nazaran bu ekstraksiyon yönteminde çok fazla çözücü ihtiyacı olmamaktadır. Basınçlı sıvı ekstraksiyon tekniğinde, ısısal kararlılığı olmayan örneklerle çalışmaya uygun olmaması bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Kellner, vd. 2004).

Basınçlı sıvı ekstraksiyonda yüksek basınç ve sıcaklığın olumlu yöndeki etkisinin yanı sıra tam tersi etki göstererek yüksek basınç ve sıcaklıktan dolayı bozunma etkisiyle verimin düşmesine de sebep olabilmektedir. Bu değişkenler haricinde ekstraksiyon verimini etkileyen birkaç önemli unsur bulunmakta ki bunlar; çözücü seçimi, çözücü hacmi, ekstraksiyon zamanı ve ekstrakte edilmek istenen örnek miktarıdır. Örneğin; bileşimindeki yapılar, nem miktarı, boyutu gibi özelliklerinin yanı sıra örneğin ekstraksiyon işlemi için hazırlanması (kurutma, boyutlandırma vb.) aşamaları da ekstraksiyon verimini etkileyen önemli değişkenlerdir (Björklund vd. 1999).

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu sabit yani statik seviyede, hareketli yani dinamik seviyede veya her iki seviyenin karışımı şeklinde gerçekleştirilebilmektedir. Hareketli seviyede, çözücü örneğin içinden akmaktadır. Kapalı bir kapta manuel olarak gerçekleşen statik basınçlı sıvı ekstraksiyonu, manuel olmasına rağmen daha çok otomatik ekipmanla gerçekleşmektedir. Yaygın olarak kullanılan basınçlı sıvı ekstraksiyon sisteminde bulunan ekipmanlar; bir fırın, ekstraksiyon hücresi, pompa ve basınç altında tutan sistem, toplama kapları ve birkaç vanadır (Şekil 2.10).

Statik basınçlı sıvı ekstraksiyon seviyesinin basamakları:

1. Ekstraksiyonun gerçekleşeceği hücreye örnek eklenmekte,

2. Ekstraksiyon hücresi organik çözücü ile doldurulmakta,

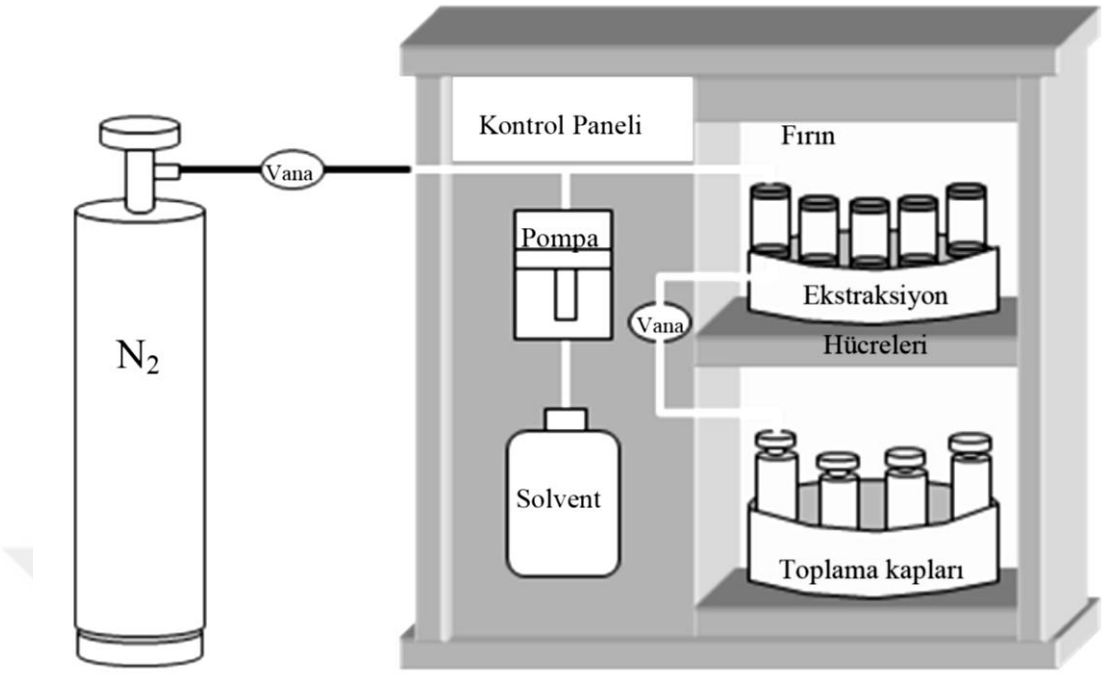
3. Ekstraksiyon hücresinin basınç ve sıcaklık ayarı yapılmakta,

4. Ekstraksiyon işlemi başlatılıp örnek belirli bir süre ekstrakte edilmekte,

5. Basınç serbest hale getirilerek çözücü toplama kabına transfer edilmektedir. Ekstraktın tamamının toplama kaplarına geçmesi için ekstraksiyon hücresi temiz çözücü ile yıkanmakta,

6. Numune için sorun olmayacak uygun bir gaz kullanarak örnekten çözücü çözücü atıkları temizlenmektedir.

Basınçlı sıvı ekstraksiyon sistemiyle toplanan numunenin hacim miktarı ekstraksiyonda kullanılan hücre büyüklüğüne göre değişkenlik göstermektedir. Bu hücrelerin hacmi 10-100 mL aralığında olabilmektedir (Camel, 2001).



Şekil 2.10. Basınçlı sıvı ekstraksiyon sistemi (Büyüktuncel, 2012)

Ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmek istediğimiz örneğin ekstraksiyon hücresine eklenmeden önce bir ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir. Örneğin yapısında bulunan su miktarı ekstraksiyonun verimini düşürdüğünden örneğin kurutulması oldukça önemlidir. Otsu, odunsu bitkiler ve toprak gibi örnekler dondurarak ya da 24-48 saat aralığında hava yoluyla kurutularak matrikslerindeki su miktarı düşürülmektedir (George vd. 2019). Örnekteki yüksek miktarda bulunan suyu azaltmak ve ekstraksiyon aşamasında sorun oluşturmaması için süperkritik akışkan ve soxhlet ekstraksiyonlarında, örneğe sodyum sülfat eklemesi yapılabilmektedir (Heemken vd. 1997). Ekstraksiyon öncesi ön işlem uygulamalarında kurutma işleminden sonra genel olarak örneğin; 100-1000 μm aralığında bir boyuta öğütülmesi veya elekler yardımıyla elenmesi işlemleri gerçekleştirilmektedir. Örnek daha küçük boyutlara getirildiğinde ekstraksiyon sisteminin etkileyen unsurlarıyla da ilişkili olarak çözücü ile örneğin muamelesi daha kolaylaşmakta ve difüzyon hızı da artmaktadır. Difüzyonun kolaylaşmasıyla örnekteki bileşenlerin eldesi de daha fazla olmaktadır (George vd. 2019).

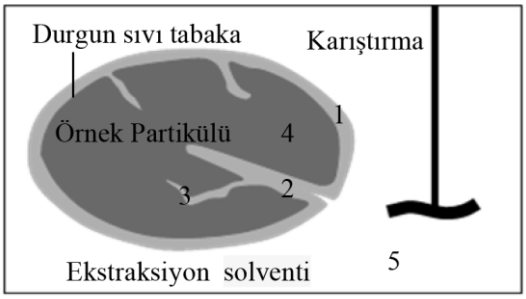
Ekstraksiyon veriminin belirlenmesinde, ekstrakte ettiğimiz örneğin matriksinin yapısı, ekstrakte edilen bileşen ve bileşenin matriks içindeki konumu yardımcı

olmaktadır. Pawliszyn'in 2003 yılında yapmış olduğu çalışmada oluşturduğu modelle heterojen örneklerin ekstraksiyon sürecini daha net ortaya koymuştur (Pawliszyn, 2003). Hazırlanan modele göre örnek parçacıklarının gözenekli olduğu ve doğal bir katman ile kaplı olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon işleminin gerçekleşmesinde temel amaç bileşenin örneğin matriksinden ayrılması, çekilmesi birkaç basamakla gerçekleşmektedir. İlk basamakta, elde edilmek istenen bileşen bileşiğin matriksin etkin bölgelerinden çekilerek bileşenin ekstraksiyon kabından uzaklaştırılma işlemi ile başlamaktadır. Sonrasında bileşik, matriks sıvı ara yüzeyine ulaşabilmek için matriksin organik kısmına doğru difüze olmaktadır. Bu aşamada porlar içerisinde bulunan bileşen, ekstraksiyon fazı arasından difüze olarak tamamen taşınmakta ve ekstraksiyon fazına geçmektedir. Bileşenin ekstraksiyon fazına geçme işlemi tamamlandıktan sonra ekstraksiyonun son aşaması olan ekstrakte edilen bileşenin tamamının toplanması gerçekleşmektedir (Camel, 2001; Pawliszyn, 2003).

Ekstraksiyon işleminde, bileşenin örnek matriksinde; ekstraksiyon çözücüsünde çözünmüş halde, matriksin mikro gözeneğinde adsorplanmış, matrikse kimyasal bağlı olarak, matriks yüzeyine adsorbe olarak veya bir çözücü gözeneğinde çözünmüş halde olmak üzere 5 farklı pozisyonda bulunması ekstraksiyon verimini belirleyen en önemli kritiklerdendir (Şekil 2.11) (Pawliszyn, 2003).

Basınçlı sıvı ekstraksiyon, genel olarak tortu, toprak ve gıda gibi katı ya da yarı katı haldeki örneklerin ekstraksiyonu için geliştirilmiş bir tekniktir. Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu veya kritik altı (subkritik) su ekstraksiyonu olarak da adlandırılan bu teknikte çözücü olarak su kullanımı da görülmektedir. Suyun çözücü olarak kullanılması özelliğinden dolayı yüksek sıcaklık ve basınçta değişkenlik göstermesi önemlidir. Ancak genel olarak çözücü olarak organik çözücüler kullanılmaktadır. Genellikle bitkisel ürünlerle yapılan ekstraksiyon işlemlerinde organik çözücüler tercih edilmekte ve bu organik çözücüler içinden en çok metanol kullanılmaktadır. Çam vd. (2010), tarafından yapılan bir çalışmada basınçlı su ekstraksiyonu kullanılarak polifenollerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya göre ekstraksiyon basamaklarında etkili olan en önemli faktörler; partikül ebatı, sıcaklık ve zaman olarak belirlenmiştir (Çam ve Hışıl, 2010). Çalışmanın sonuçları incelendiğinde, basınçlı su ekstraksiyonunun metanollü geleneksel ekstraksiyon

yöntemi kadar etkili olduğu görülmüştür. Bu sebeple basınçlı su ekstraksiyonun avantajları bakımından, katkılı ortamlar, sıvı ve çevresel örneklerdeki kirlenmeye sebep olan organik yapıların ekstrakte edilmesinde tercih edilebilmektedir (Ferrera vd. 2004).



Şekil 2.11. Örnek matriksinde bileşenin pozisyonu (Büyüktuncel, 2012)

Luthria ve arkadaşları, soxhlet, basınçlı sıvı ekstraksiyon, karıştırma, vorteksleme, çalkalama ve sonikasyon olmak üzere altı farklı ekstraksiyon tekniği ile, metanol-su; etanol-su; asetonitril-su; genapol-su; dimetilsulfoksit-asetonitril ve dimetilsulfoksit-etonol-su şeklinde hazırlanan karşım çözücüler ile soya fasulyesindeki isoflavonların ekstraksiyonu için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre soya fasulyesi örneklerinden en yüksek verim, basınçlı sıvı ekstraksiyon yöntemi ile dimetilsulfoksit-etonol-su (5:70:25, h/h/h) karışım çözücünün kullanıldığı sistem olarak belirlenmiştir (Luthria vd. 2007).

2.2.2.2 Mikrodalga destekli çözücü ekstraksiyonu (microwave-assisted extraction, MAE)

Percy Spencer'ın 2. Dünya savaşı sırasında askeri teçhizatlarla ilgili araştırma, üretim ve tasarım çalışmaları yürüttüğü sırada mikrodalga teknolojisinin de keşfini gerçekleştirdiği bilinmektedir. Mikrodalgalar, dalga boyu cetveline göre radyo dalgaları ile kızılötesi ışınlar arasında yer almaktadır. Mikrodalgalar, elektromanyetik spektrumda iyonize olmayan 300 MHz ile 300 GHz frekans aralığı ve 1 mm-1 m dalga boyu aralığında olan, dalgalardır (Osepchuk, 1984; Villanueva, 2018).

Mikrodalgalar, elektrik enerjisinin özel elektron tüpleri olan magnetron ile belirlenmiş bir dalga boyunda olan elektromanyetik radyasyona dönüştürülmesiyle elde edilir.

Mikrodalgada numune aplikatör denilen bölüme yerleştirilir; dalga kılavuzu, mikrodalga kaynağından mikrodalga boşluğuna doğru ışınları iletmektedir. Mikrodalga ekipmanları çok modlu ve tek modlu olmak üzere iki farklı ışınlama modundan oluşmaktadır. Deneysel çalışmalar için üretilmiş cihazlarla, deneysel çalışmalara uyumla hale getirilmiş ev tipi mikrodalga cihazları ya da günlük hayatta kullanılan elektronik eşya kategorisinde satışı yapılan mikrodalga cihazların çok modlu olduğu belirtilmektedir. Çoklu modda üretilen ve kullanılan cihazlarda bulunan döner tabla ve karıştırıcı fan sistemi sayesinde numunenin farklı alanlarda noktalarda da özdeş ısınmasını sağlamaktadır. Tek modlu çalışan mikrodalgalarda ısınma için oluşan elektromanyetik dalgalar sadece bir noktaya etki etmektedir (Tsubaki vd. 2018; Uslu ve Certel, 2006).

Gıda endüstrisinde mikrodalga teknolojisi kullanılarak, ısıtma, çözme, pişirme, temperleme, pastörizasyon, sterilizasyon, kurutma, dondurarak kurutma ve ekstrakte etme gibi çok işlem gerçekleştirilebilmektedir. Bu işlemler haricinde, kimyasal tepkimelerin hızlı gerçekleştirilmesinde, endüstriyel ürünleri eritme işleminde, endüstriyel ürünlerin kurutulmasında (kağıt, odun vb.), plazma üretimi, mineral prosesleri (kaya parçalama, ufalama), sinterleme işlemi (seramik, maden tozu vb.), atık arıtma sistemi ve geri dönüşüm prosesleri gibi çok çeşitli kullanım alanı da bulunmaktadır (Yılmaz vd. 2018). Gıda takviyeleri ve gıda katkı maddeleri, kozmetik ve ilaç sektöründeki üretimlerin gerçekleştirilmesinde mikrodalga yöntemiyle özüt elde etme aşamasında, hedeflenen bileşen ya da bileşenlerin bir çözücü yardımıyla numuneden ekstrakte edilebilmektedir (Şekil 2.12) (Mandal vd. 2008).

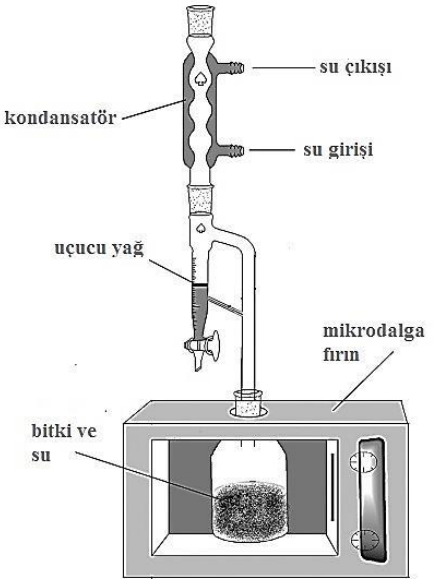
Numunenin molekülü üzerine mikrodalganın, iyonların iletimi ve dipol dönme (rotasyon) yöntemiyle etki göstermesi sonucunda mikrodalganın çalışma prensibi gerçekleşmektedir. Bu yöntemlerden ilki iyonik iletimin çalışma prensibinde, manyetik alanın uygulanmasından dolayı iyonların elektroforez yoluyla ayrılması ve yer değiştirmesi ile gerçekleşmektedir. Bu esnada çözücünün bu iyon göçüne karşı olmak için direnç göstermesi ile oluşan sürtünme sonucunda çözücü ısınmaktadır. Diğer yöntem olan dipol dönme ise, oluşturulan manyetik alan sonucunda dipollerin tekrardan düzene girmesini sağlamaktadır (Rodrigues vd. 2020; Xia vd. 2013).

Gıdaların içerisinde dağınık halde polar su molekülleri bulunmaktadır. Mikrodalgada numunede elektrik alan oluşturulduğunda, polar yapıdaki moleküller uygulanan elektrik alan yönünde hizalanırlar ve oluşan elektrik alanının, salınımına göre aynı yönde dönme hareketini gerçekleştirirler. Harekete geçen su moleküllerinin kendi aralarında ve ortamda bulunan diğer moleküllerle sürtünmesi sonucu da ısı açığa çıkmaktadır. Bu sebeple mikrodalga yöntemi kullanılarak ekstrakte edilmek istenen örneğin içeriğinde su moleküllerinin bulunması gerekmektedir (Chaturvedi, 2018).

Mikrodalga teknolojisini ekstraksiyon işleminde kullanarak bilimsel çalışmalar gerçekleştirmiş olan bilim insanlarından; İnce vd. (2014), yaptıkları çalışmada elektromanyetik enerjinin çoğunun ısıya dönüşmüş olmasından dolayı enerji tasarrufu gerçekleştiğini ve verimin yüksek olduğunu, Krishnan vd. (2016), ekstrakt veriminin yüksek olduğunu, Simic vd. (2016), mikrodalga cihazında işlemlerin kısa sürede, hızlı bir şekilde gerçekleştiğini, Ranic vd. (2014), toksik çözücü kullanımını azaltarak doğa dostu yeşil ekstraksiyon için yeni teknolojiye uygun olduğunu yaptıkları çalışmalarla belirlemişlerdir. Mikrodalga teknolojisinde eşit ısı dağılımlı homojen ısı oluşumu, yüzeyin aşırı ısınmaması, çok yüksek sıcaklıklara çıkılmadan kısa sürede ekstrakte olması ve örnek içeriğindeki fenolik maddeler başta olmak üzere önemli etken maddelerin zarar görmesininin engellenmesi bu teknolojinin olumlu yanlarını oluşturmaktadır (Alvarez vd. 2017; Barba vd. 2016).

Mikrodalga yöntemi ile ekstraksiyon işlemlerinde çözücünün kullanıldığı ya da çözücünün kullanılmadığı farklı yöntemler bulunmaktadır. Literatür taramalarında bu iki farklı yöntemin kullanım şekilleri ve sonuçlarının değerlendirildiği birçok çalışmaya rastlamak mümkündür. Çözücü kullanılarak gerçekleştirilen mikrodalga yöntemi ile ekstraksiyonda, mikrodalga enerjisi çözücü tarafından absorbe edilmektedir; polar yapıdaki çözücüler (etanol, metanol, su, vb.) kaynama noktası eşiğine kadar ısıtılmakta ve sonrasında bileşenlerini elde etmek istediğimiz örneğin matrisine yayılarak bileşenleri çözmektedir. Çözücüsüz gerçekleştirilen yöntemde ise mikrodalga cihazının reaktörüne sadece örnek (bitki vb.) yerleştirilmekte ve bu şekilde özüt elde edilmektedir. Çözücüsüz çalışmayı gerçekleştirebilmek için teknolojik gelişmelerin katkısıyla mikrodalga cihaza uyumlu yeni ekipmanlar oluşturulmuştur. Çözücüsüz ekstraksiyon yönteminde örneğin içinde bulunan su moleküllerinden

yararlanılmakta ve bu su moleküllerinin ısınması sonucu örnek hücreleri etkilenmektedir. Isınma etkisiyle, örnek içerisindeki metabolitler ve içten dışa aktarılan su serbest bırakılmaktadır. Mikrodalga yöntemi ile ekstrasiyon işlemi sırasında örneğin hücre duvarında oluşan basınç ve ani sıvı buharlaşması sonucu hücre yapısı bozulmakta ve hücre protoplazması daha geçirgen bir hale geçerek örnekteki bileşenlerin elde edilmesi daha da kolaylaşmaktadır (Li vd. 2013; Maran vd. 2014).



Şekil 2.12. Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi (Elguea-Culebras vd., 2022)

Mikrodalga işleminin süresi frekansa göre değişkenlik göstermektedir. İşlem esnasında cihazın frekansı arttıkça, elektromanyetik dalgaların hammaddeye olan nüfuzu da azalmaktadır. Bu sebeple özütü elde edilmek istenen hammaddeye göre frekans seçilmesi oldukça önemlidir (Chaturvedi, 2018). Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde diğer önemli etken ise mikrodalganın gücüdür. Endüstride genel olarak 5-100 kW aralığında mikrodalga gücü ile çalışılmaktadır. Mikrodalga gücünün artmasıyla paralel olarak cihazın ekstraksiyon hızı da genel olarak artmaktadır. Ekstraksiyon süresinin kısalması, gıda matrisinden hedef bileşenin çekilmesi daha kısa sürede olması kazanç olsa da mikrodalga gücünün artırılması enerji sarfiyatına sebep olmaktadır (Thirugnanasambandham vd. 2014). Ancak mikrodalga gücünün artırılması ve ekstraksiyon süresinin kısaltılması ile yüksek verimde ekstrakt elde edilecektir manasına gelmemektedir. Çünkü belli bir eşikten sonra yüksek güç biyokütle bileşenlerinde bozunmaya sebep olabilmektedir. Bu nedenle ekstrakte edilmek istenen bitki örneklerine ve bunlardan elde edilmek istenen

bileşenlere göre uygun mikrodalga gücün belirlenmesi gerekmektedir (Simic vd. 2016).

Ekstraksiyon verimini belirleyici bir diğer parametre mikrodalga gücüyle bağıntılı olan sıcaklıktır. Ekstraksiyon işlemi esnasında bitki örneğinin içinde bulunduğu çözücünün sıcaklığı da ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Yüksek sıcaklıklarda çözücünün, yüzey gerilimi ve viskozitesi düştüğü için çözme gücüde artmaktadır. Mikrodalga yöntemi sayesinde çözücünün, örneğin matrisine nüfuzu artarak bileşenlerin çözünmesi kolaylaşmaktadır. Ancak yüksek sıcaklığın hedef bileşenin yapısının bozunmasına sebep olması da göz önünde bulundurularak yöntem oluşturulmalıdır (Tsubaki vd. 2013).

Ekstraksiyon işleminde diğer bir önemli faktör ekstrakte edilmek istenen örneğin kütlesidir. Mikrodalga ekstraksiyon sisteminde aynı hacimde fakat farklı kütlelerdeki örneklerin ekstraksiyonunda fazla kütleli örneklerin daha fazla mikrodalga gücü absorbe ettiği belirlenmiştir. Basınç faktörü de göz önünde bulundurularak en uygun mikrodalga işlem koşullarının belirlenmesi gerekmektedir (Routray ve Orsat, 2012).

Mikrodalga ekstraksiyonundaki önemli özelliklerden biri de ekstrakte edilmek istenen bitki örneğinin içeriğindeki nem ya da su miktarının dalgaları absorplaması açısından belirleyici olmasıdır. Bitki örneklerindeki suyun bağlı ya da serbest olması mikrodalga etkinliğinde belirleyicidir. Bağlı suya nazaran serbest suda bulunan polar moleküller mikrodalgada oluşan elektrik alandan daha fazla etkilenmektedir. Bu sebeple ekstrakte edilecek bitki örneğinin kuru ya da taze olması ekstraksiyon verimini etkileyen önemli bir özellik olarak bilinmektedir (Chandrasekaran vd. 2013).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon sisteminde en önemli parametrelerden birisi doğru çözücünün belirlenmesidir. Mikrodalga ışınlarını iyi absorplayan, bileşenin matrisiyle güçlü etkileşimde olabilecek ve bileşeni çözebilen çözücülerin seçimi yapılmalıdır. Eğer çözücü dalgaları absorplayamıyorsa ısınamaz ve dolayısıyla ekstraksiyon işlemini de gerçekleştiremez. Mikrodalga ışıması ile hızlı ısınabilecek çözücüler, büyük dipol momente sahip çözücülerdir. Örneğin, metanolün mikrodalga enerjisini emerek ısıya dönüştürme kabiliyeti yüksektir (Eskilsson ve Björklund, 2000). Eğer

ekstraksiyon işleminde, çözücü olarak hekzan ve toluen gibi polar olmayan çözücüler kullanılacaksa, bu çözücülerin metanol, aseton ve su gibi yüksek dipol momente sahip polar çözücülerle karıştırılması iyi sonuçlar vermektedir (Büyüktuncel, 2012).

Fenolik bileşikler, değişik ortam şartlarına göre farklı sonuçlar gösterebilmekte ve bu şartları oluşturan parametrelerle hızlı şekilde bozunabilmektedir. Bu nedenle fenolik bileşenleri bulunduran özütlerin elde edilmesinde kullanılan yöntem ve yöntemlerdeki parametrelerin kontrol edilerek belirlenmesi gerekmektedir. Havuçla yapılan bir çalışmada mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile özüt elde edilmiştir. Özütteki *β*-karoten bileşeni sıcaklık artmasıyla birlikte artış göstermiştir. Fakat yöntemin sıcaklığı 58°C'yi geçtikten sonra *β*-karoten bileşeninde bozunma başlamıştır (Hiranvarachat ve Devahastin, 2014).

Liazid vd. (2011), yaptıkları bir çalışmada, 50°C'de 20 dk. ve 100 W güçte uygulanan mikrodalga uygulaması ile üzümden (*Vitis vinifera* L.) antosiyanin eldesi gerçekleştirmişlerdir. Mikrodalga uygulaması ile glukozitlerden %100 geri kazanım sağlanabildiğini belirtmişlerdir. Bu sayede mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminin fenolikler açısından verim etkisini göstermişlerdir.

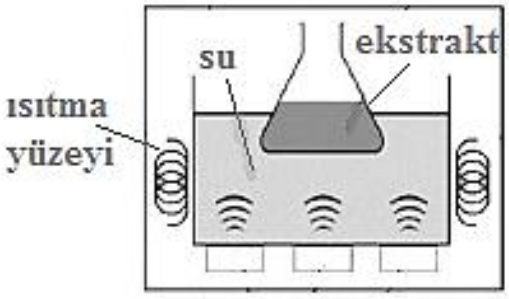
2.2.2.3 Ultrasonik destekli ekstraksiyon (ultrasonic-assisted extraction, UAE)

Ses dalgaları destekli sıvı ekstraksiyonu olarak da adlandırılmaktadır. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde, ultrasonik ses üreten cihazlar yardımıyla ses dalgaları ortama yayılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Ekstraksiyon yönteminde kullanılan bu cihazlar genellikle 20-50 kHz aralığındaki frekanslarla çalışmaktadır. Ultrasonik ekstraksiyon işleminin temel çalışma prensibinde oluşturulan ses dalgaları numunedeki hücre duvarının mekanik deformasyonuna ve dolayısıyla malzemenin numune içerisine geçmesine neden olmaktadır (Şekil 2.13). Bu yöntem, hücre içindeki aktif bileşenlerin çözücü ile temas etmesini ve çözücüye kolayca geçmesini sağlamak amacıyla, geleneksel yöntemlere göre tercih edilmektedir (Avşar vd. 2014; Daud vd. 2022).

Gıdalarda ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışmalarında yüksek ve düşük enerjili olmak üzere iki farklı ultrason türü kullanılmaktadır. Gıdalarda mikrobiyal ve

enzimatik aktivitenin sonlandırılması için yüksek enerjili ultrasonik uygulamalar tercih edilmektedir. Gıdanın bileşimi, sertliği ve olgunluğu gibi fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesinde düşük enerjili ultrasonik uygulama tercih edilmektedir. Çünkü az miktarda enerji çıkışı, dalgadan etkilenen malzemede kimyasal ve fiziksel bozulmaya neden olmayacaktır (Dedebaş vd. 2021; Ercan ve Soysal, 2011).

Ultrasonik destekli ekstraksiyon, 20 ila 200 ml aralığında çözücüler kullanılan ve 2-20 dakika aralığında süren bir yöntemdir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sistemi sabit veya aktif bir sistem olabilir. Aktif ekstraksiyon yönteminde, numunedeki aktif bileşenler çözücüye geçer geçmez uzaklaştırıldığı için avantajlıdır. Dinamik ekstraksiyonun bir diğer faydası da numunenin sürekli olarak taze çözücüye maruz kalmasıdır. Sürekli olarak taze çözücü ile muamele edildiğinden, numune matrisinden çözücüye geçiş daha fazladır (Tadeo vd. 2010; Yusoff vd. 2022).



Şekil 2.13. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sistemi (Samaram vd. 2014)

Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi, gıda kalitesini artırmak, gıdalardaki besin kaybını en aza indirmek ve vitaminleri kısmen korumak için kullanılır. Ses dalgaları ekstraksiyon, emülsiyon, kristalizasyon, kurutma, fermantasyon, gıda endüstrisinde oksidasyonun hızlandırılması, dondurulmuş gıdalarda filtreleme ve gaz giderme ve enzim aktivitesinin engellenmesinde kullanılabilmektedir (Chemat vd. 2011).

2.2.2.4 Süperkritik sıvı ekstraksiyon (supercritical fluid extraction, SFE)

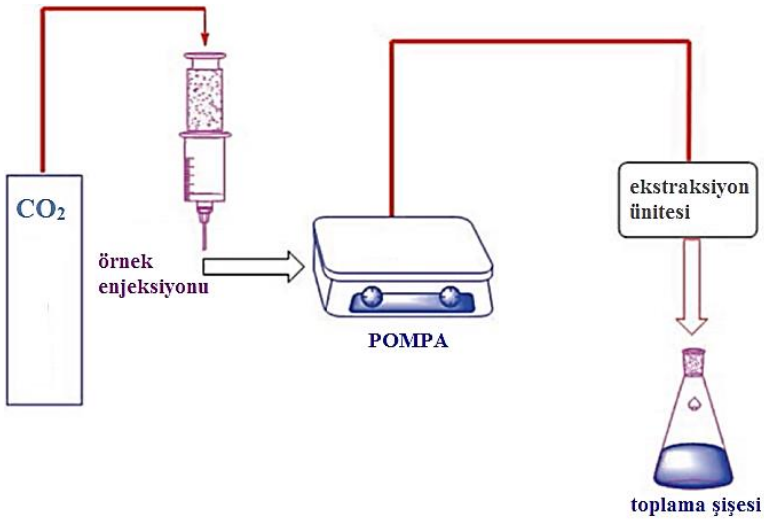
Süperkritik akışkan, olarak ifade edilen ve ekstraksiyon esnasında kullanılan kendi kritik sıcaklığı ve basıncın üstünde seviyelerle uygulanabilen madde, karışım ya da element olarak ifade edilmektedir. Süperkritik akışkanlar, gaz ve sıvı haller arasında

bir yapıdadır. Tek bir faz halinde bulunan süperkritik akışkanlar, sıcaklık ya da basınçtaki artış ile sıvı veya buhar hale geçmemektedir (Zougagh vd. 2004).

Süperkritik akışkanlar, özellikleri bakımından gaz gibi düşük viskozite, sıfır yüzey gerilimi, sıvınınki gibi yüksek yoğunluk ve çözme gücüne, sahiptir. Gazın ve sıvının bu özelliklerini almış olması süperkritik akışkanın uygulandığı bileşenler için yüksek difüzyon sağlamaktadır. Düşük viskozitede olması ve yüksek difüzyon katsayılarında etkili olması sebebiyle katı gözenekli materyallere nüfuzu daha kolay olmaktadır. Bu sebepten yayılma gücünün ve çözme kabiliyetinin sıvıdan daha yüksek olması daha hızlı reaksiyon oluşumlarına sebep olmaktadır (Başer, 2010).

Süperkritik akışkanlar normal sıvılara göre sıkıştırılabilir olduklarından yoğunlukları geniş aralıklarda değiştirilebilmektedir. Süperkritik akışkanın daha yüksek yoğunlukta olması onun yüksek çözme kabiliyetinde olmasını sağlamaktadır. Bu bakımdan yoğunluk ve diğer özelliklerin, istenilen şekilde ayarlanıp değiştirilebilmesi için sıcaklık ve basınç ayarlamaları yapılmaktadır. Muazzam bir ekstraksiyon ortamı sağlaması sebebiyle süperkritik akışkanlar farklı örneklerdeki matriksler için tercih edilebilmektedir. Ayrıca çözme gücü için sıcaklık ve basınç değiştirilme imkanının olması klasik ekstraksiyon metotlarına göre bu yöntemi daha tercih edilir kılmaktadır (Büyüktuncel, 2012; Kant ve Kumar, 2022).

Süperkritik sıvı ekstraksiyon sisteminde, numunenin içinde bulunduğu bir basınç hücresi, sistemdeki basıncı kontrol etmek için bir basınç bakım cihazı, CO_2 enjeksiyonu için bir pompa ve bir toplama kabı bulunmaktadır (Şekil 2.14) (Hussain vd. 2019).



Şekil 2.14. Süperkritik sıvı ekstrksiyon sistemi (Hussain vd. 2019)

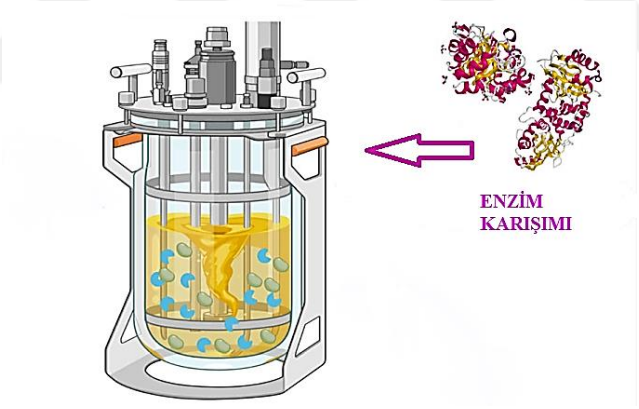
Süperkritik akışkanın oluşması; basınç, sıcaklık ve akış hızının kontrol edilebildiği bir ekipmanla gerçekleştirilmektedir. Dinamik, statik ya da statik/dinamik modlarda çalıştırılma özelliği olan cihaz, genel olarak dinamik mod ekstraksiyonunda çalıştırılmaktadır. Ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen ekstrakt, cihazın tuzak ünitesinde veya belirlenmiş bir çözücü içerisinde birikmektedir. 10 ile 20 ml aralığında çözücü ihtiyacı bulunan sistemde ekstraksiyon 20-60 dakika aralığında gerçekleşmektedir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine nazaran kısa sürede ve az çözücü ile gerçekleştirilebilmektedir. Soxhlet ekstraksiyonu ile kıyaslandığında ekstraksiyon süresi ve çözücü kullanımı bakımından daha yüksek verimde sonuçlar elde edilmektedir (Eisenmenger ve Dunford, 2008).

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, gıda analizlerinde, farmasötik, polimer ve çevresel birçok alanda kullanılmaktadır. Ham sebze yağları endüstrisinde geniş bir kullanım alanı bulunmaktadır. Yağ üretiminde içeriğindeki istenmeyen bileşiklerin uzaklaştırılması için tüketilmeden önce rafinasyon gerçekleştirilmelidir. Bu işlem sırasında yağdaki faydalı bileşiklerinde kaybolmasını engellemek amaçlı SFE yöntemi daha çok tercih edilir olmaktadır. Taneli buğdayın yağında, sıkıştırılmış yeşil kahve yağında ve saf palmiye yağında önemli olan bileşiklerce zengin ekstraktlar elde etmek için alternatif yöntemlerden biridir (De Azevedo vd. 2008).

2.2.2.5 Enzim destekli ekstraksiyon (enzyme assisted extraction, EAE)

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, enzim destekli ekstraksiyon daha özel bir yöntemdir (Şekil 2.15). Geleneksel yöntemin eksikliklerini iyileştirmek için enzim destekli ekstraksiyon yöntemi düşük enerji, düşük kimyasal veya su kullanımı ve hızlı hareket sağlamaktadır. Bu yöntem, katma değeri yüksek peptit, kitin veya pigment gibi ürünlerin geri kazanımında kullanılır. Ayrıca, polisakkaritin depolimerizasyonunu sağlayan kimyasal işlemlerle yüksek kaliteli kitin elde edilebilmektedir (Olaiya vd. 2022).

Enzim destekli ekstraksiyon yönteminde, hücre duvarı ve matriksindeki bileşenleri hidrolize edebilen enzimler avantajlıdır. Bu sayede doğal ürünlerdeki hücre içi makromoleküller, yüksek verimle elde edilebilmektedir. Enzim destekli ekstraksiyonda genellikle α amilaz, selüloz ve pektinaz kullanılmaktadır (Mohan vd. 2022; Song vd. 2020).



Şekil 2.15. Enzim destekli ekstraksiyon sistemi (Diestra vd. 2020)

Chen vd. (2014), *Astragalus membranaceus* bitkisini glukoz oksidaz, amiloglukozidaz, hemiselülaz, bakteriyel amilaz, fungal amilaz, pektinaz, selüloz ve vinozim enzimlerini kullanarak enzim destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte etmişlerdir. Bitkiden elde edilen ekstraktlarda polisakkarit içeriği araştırılmıştır. Enzim destekli ekstraksiyon yönteminde kullanılan enzimler arasında en iyi etkinliği glukoz oksidaz göstermiştir. Ayrıca glukoz oksidaz kullanılan enzim destekli ekstraksiyon yönteminde polisakkarit verimi, enzim kullanılmayan yönteme kıyasla %250'den fazla sonuç vermiştir.

Yapılan bir çalışmada, *Eucommia ulmoides* bitkisinin yapraklarından iyonik sıvılar ve selülaz kullanılarak enzim destekli ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktda klorojenik asit verimi yüksek bulunmuştur (Liu vd. 2016).

Strati vd. (2015) domates atıkları ile yaptıkları çalışmada selülaz ve pektinaz enzimleri ile enzim destekli ekstraksiyon yöntemini kullanarak ekstraktlar elde etmişlerdir. Elde edilen ekstraktlarda likopen ve karotenoid verimleri yüksek değerlerde elde edilmiştir. Selülaz ve pektinaz enzimlerinin kullanıldığı ekstraksiyon yöntemi ile likopen ve karotenoid bileşenleri enzimsiz çözücü ekstraksiyon yöntemine göre 10 kat daha yüksek verimle elde edilmiştir.

2.3 Çevre Dostu Çözücüler

"Solvent" kelimesi, latince "gevşetmek" manasına gelen bir terimden gelmektedir. Normalde yüksek akışkanlıkta olan çözücüler tek başına ya da farklı çözücülerle karıştırılarak da, herhangi bir maddeyi parçalamak, zayıflatmak veya maddeden çekilmek istenen farklı bileşenleri çıkarmak için kullanılmaktadır. Çözücüler birçok alanda farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Genel olarak çözücüler; farmasötik, test, sentez, lezzet bilimi, beslenme, malzeme ve boya endüstrisi dahil olmak üzere bilimin çoğu alanında etkin olarak kullanılmaktadır. Çözücülerin bilimsel çalışmalarda en etkin kullanımı ise, aktif farmasötik bileşenlerin ve farklı yardımcı maddelerin çözülmesi işlemleriyle gerçekleşmektedir (Abbott vd. 2003; Sekharan vd. 2022).

İnsanların çözücüleri ayrıştırıcı olarak kullanmaya başladığı zamanlardan beri en yaygın olarak kullanılan çözücü su olmuştur. Suyun en yaygın çözücü olarak kullanılmasında belirleyici olan bazı önemli noktalar bulunmaktadır. Bunlar; katkısız, doğal ve kolay ulaşılabilir olması, ucuz olması, viskozitesi ve yoğunluğunun ideal bir durumda olması, zararlı içeriğinin olmaması sebebiyle doğaya ya da insana zarar verici etkide olmayan bir sıvıdır. Ayrıca filtrasyon ve kristalizasyon gibi işlemlerin kolaylıkla gerçekleşmesinde yardımcı olmanın yanısıra, numunenin yapısında bulunan çeşitli bileşenlerin çözünmesinde kullanılabilmektedir (Davis, 2015; Plotka-Wasylka vd. 2020).

Ancak, numunelerden elde edilen bileşenlerdeki çeşitlilikler üzerine yapılan araştırmalarda çözücü olarak sadece suyun istenilen bileşenleri elde etmede yeterli olmadığı görülmüştür. Yani, çok sayıda numune, su ile çözünemeyip suya karşı koyabilmektedir. Bu da suyu her türlü çalışmada kullanılabilecek pratik bir çözücü olmaktan çıkarmıştır. Bazı farmakopelerde kayıtlı olan ilaçların reçetelerindeki bileşenlerin büyük bir kısmının suda çözünürlüğünün düşük ya da çözünmez olarak ifade edilmesine sebep olmuştur. Bu sebepten sektördeki bu açığın kapatılabilmesi, çözücü noktasında özellik itibariyle yaşanan eksikliklerin giderilebilmesi amacıyla farklı çözücü ve sistemlere ihtiyaç oluşmuştur. Suda çözünmeyen ilaçlar, yardımcı maddeler ve diğer maddelerin alternatif olarak geleneksel organik çözücülerde çözünebildiği gözlenmiştir. Geleneksel organik çözücüler olarak nitelendirilen çözücüler, genel olarak uçucu organik bileşikler olarak bilinen kimyasallardır (Hansen vd. 2021; Morgan, 2014; Wang vd. 2014).

Bazı ürünlerin çözücülerle ayrıştırılarak içeriğindeki biyoaktif bileşenlerin elde edilebilmesinde geleneksel organik çözücüler ve petrokimyasal çözücüler kullanılmaktadır. Ancak, bu tür çözücülerin kullanımından kaynaklı oluşabilecek zararlar söz konusu olduğu için kullanımlarının kısıtlanması ya da tamamen bırakılması gerekmektedir. Örneğin çözücülerin oda sıcaklığında buharlaşabilir özellikte olmaları işlem esnasında problemlerin yaşanmasına sebebiyet verebilmektedir. Yine aynı şekilde çözücülerin; kararsız yapıda olmaları, yanıcı ve oldukça tehlikeli yapıları sebebiyle ölümcül olmaları kullanımlarının azaltılması zorunluluğunu getirmektedir. Bu olumsuz olgular neticesinde zararlı etkideki bu çözücülerin kullanıldığı endüstrilerde çalışan işçilerin sağlıklarının büyük oranda etkilendiği görülmüştür (Owczarek vd. 2016; Wang vd. 2014). Tüm bunların dışında zararlı etkideki bu organik çözücülerin kullanımı neticesinde doğa ve etkileşimde olan bütün canlılar direk ya da dolaylı olarak bundan etkilenmekte ve gün geçtikçe bu kimyasalların yol açtığı degredasyon daha da derinleşmektedir. Bu sebepten bu tehlikenin bertaraf edilerek zararlı etkideki çözücülerin yerine çevre dostu yeşil kimya olarak nitelendirilen yeni nesil çözücülerin kullanılması gerekliliği söz konusu olmuştur (Ma ve Yu, 2004; Nafchi vd. 2013).

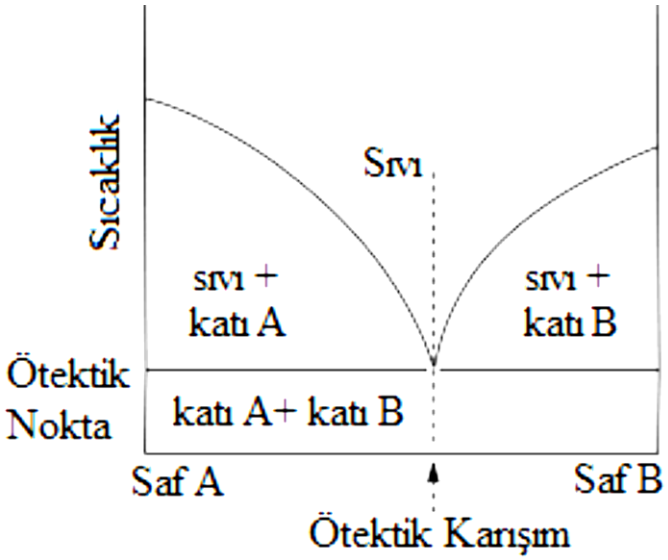
Ekstraksiyon yönteminin haricinde hammaddeden ekstrak elde edilmesinde ve numune içeriğindeki kimyasal bileşenlerin bozunmadan verimi yüksek bir şekilde elde edilebilmesi açısından kullanılan çözücü tercihinin iyi yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle son birkaç yıldır üzerinde çalışmaların yoğunlaştığı, çevre dostu olarak nitelendirilen gelişmelerin en önemli özelliği, toksik etki gösterdikleri bilinen çözücülerin yerine doğa dostu olan ve birçok kimyasal sürecin uygulandığı sektörde kullanılabilecek çözücülerin tercih edilmesi söz konusu olmuştur. Yeşil kimya olarak nitelendirilen çevre dostu çözücüler, ön işlemlerden geçerek hazırlanan kimyasal ürünler olarak ifade edilmektedir. Bu kimyasallarla ilgili genel prosedür, tehlikeli kimyasalların kullanımını azaltmak veya tamamen ortadan kaldırmak üzere oluşturulmuştur (O'Neil vd. 2021; Plotka-Wasylka vd. 2020). Doğa dostu olmayan zararlı kimyasal çözücülerin yerine daha iyi özelliklerde, sağlıklı koruyucu ve çevre dostu çözücülerin geliştirilmesi üzerine çalışılmaktadır. Çevre dostu özelliği olan iyonik sıvılar, derin ötektik çözücüler, süperkritik sıvılar, süperkritik su, değiştirilebilir çözücüler, supramoleküler çözücüler, yüzey aktif maddeler vb. çözücülerin tekrar kullanılabilir olması ve yanıcı olmamaları sebebiyle kullanımları artmıştır. Fakat iyonik sıvılar içerisinden piridin ve imidazol, geçmişten günümüze kadar yaygın olarak kullanılan organik çözücülerden daha pahalı olması sebebiyle ekonomik açıdan değerlendirildiğinde pek avantajlı görülmemiştir (Hansen vd., 2021; Radosevic vd. 2015).

2.3.1 Ötektik Karışımlar

Ötektik karışımlar tabiri, yunancada kolay eriyen anlamında kullanılan "eutēktos" kelimesinden gelmektedir. Ötektik nokta, iki katı maddenin karışımının, her iki bileşiğin erime noktasından daha düşük erime sıcaklığında tamamen erimiş hale geldiği sıcaklığı ve kimyasal bileşimi ifade etmektedir. Ötektik karışımlarla ilgili formüller ilk olarak, ilaç çözünürlükleri ve absorpsiyonunu iyileştirmek için kullanılmıştır (Morgan, 2014; Zhang vd. 2012).

Ötektik karışımlar saf bileşikler değil, iki veya daha fazla saf bileşiğin birleşimidir. Ötektik karışımların sisteminde, temel unsur erime sıcaklığını gösteren katı-sıvı faz diyagramının karışımdaki fonksiyonundan kaynaklanmaktadır Lewis ya da Bronsted

asitleri ve bazları olarak bilinen katı maddelerin karşımları ile derin ötektik çözücüler hazırlanmaktadır. Karşımdaki bileşenlerden birisi hidrojen bağ alıcısı, diğeri hidrojen bağ vericisi olarak görev yapmaktadır. Derin ötektik çözücüler hazırlanırken farklı katyonik ve anyonik bileşenler kullanılabilmektedir. Bu aşamada en önemli olan olay karışımda bulunan her bir bileşenin erime noktasından daha düşük erime noktasında yeni bir bileşenin elde edilmesidir. Termal denge oluşana kadar geçen sürede, karıştırılan iki ya da daha fazla katı bileşenler ötektik sıcaklıklarda sıvı faz oluşturmaktadırlar (Şekil 2.16) (Calvo-Flores ve Mingorance-Sanchez, 2021).



Şekil 2.16. Ötektik karışımlarda genel faz diyagramı (Alonso vd. 2016)

2.3.2 Derin Ötektik Çözücüler (Deep Eutectic Solvents-DES)

Çevre dostu çözücülerde derin ötektik çözücülerin keşfedilmiş olması büyük bir atılım olmuştur. Derin ötektik çözücüler genel olarak, ikili veya üçlü hidrojen bağları yoluyla birleşebilen bileşiklerin karışımları olarak tanımlanmaktadır. Bu bileşikler belirli molar oranlarda birleştirilerek ötektik bir karışım elde edilmektedir (Cunha ve Fernandes, 2018; Zhang vd. 2012).

Derin ötektik çözücüler açıklanırken bunun üzerine fikir ayrılıkları oluşup yeni araştırmalara ve tanımlara ihtiyaç duyulmuştur. Karıştırılan katı kimyasalların oluşturduğu her bir karışımda bir ötektik nokta oluşturması ve yine hidrojen bağ oluşturmaları sebebiyle derin ötektik çözücülerin diğer çözücülerden ayrımının

yapılabilmesi için farklı özelliklerini de ifade eden tanımlara ihtiyaç duyulmuştur (Coutinho ve Pinho, 2017). Derin ötektik çözücülerin tanımlaması yapılırken, karıştırılan bileşenler arasındaki hidrojen bağ oluşumu ya da bir ötektik noktanın olması yeterli olmadığından derin ötektik çözücülerle ilgili spesifik özelliğini ortaya koymak isteyen bilim insanları bir araştırma gerçekleştirmiştir. Bu araştırmada ötektik nokta sıcaklığının, ideal sıvı karışımı sıcaklığı altında olduğunu ispatlamak amacıyla çalışmalar gerçekleştirmişler ve bunun neticesinde iki ya da daha fazla saf kimyasal maddenin karışımıyla elde edilen çözeltinin, ideal sıvı karışım sıcaklıklarından oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir (Martins vd. 2019).

Derin ötektik çözücüler özellikle son yıllarda kapsamlı bir şekilde incelenmiş olsa da, derin ötektik çözücünün oluşumları ve özellikleriyle ilgili konuların anlaşılmasında hala daha eksiklikler bulunmaktadır. Her şey neredeyse Abbott ve arkadaşlarının bazı yaygın iyonik sıvıların nem hassasiyeti ve yüksek maliyetinin üstesinden gelebilecek sıvılar aramasıyla başlamış ve iyonik sıvıların yerine kullanılabilecek yine doğa dostu olan Derin Ötektik Çözücüleri (DÖÇ) keşfetmişlerdir. Abbott vd. (2004a) yaptıkları bir çalışmada, hidrojen bağ alıcı olarak kolin klorür, hidrojen bağ vericisi olarak farklı karboksilik asit türevlerini kullanarak derin ötektik çözücüler hazırlamışlardır. Yaptıkları bu çalışmada, hidrojen bağ alıcı ve vericilerini karıştırmadan önce, karboksilik asit türevlerini vakum yardımıyla kurutmuşlar ve kolin klorürü de etanol içerisinde kristallendirmişlerdir. Bu işlemlerden sonra hidrojen bağ alıcı ve verici belirli hassas oranlarda alınıp 100°C de ısıtılıp renksiz ve homojen bir hale gelene kadar bekletilmiştir. 2007 yılında yine Abbott ve arkadaşları Tablo 2.1'de belirtilen dört farklı kombinasyona göre DÖÇ hazırlamışlardır (Abbott vd. 2007; Dai vd. 2013).

Tablo 2.1. DÖÇ hazırlamak için önerilen dört farklı kombinasyon (Abbott vd. 2007)

Seçenek	Örnek
1. Metal tuzu + Organik tuz	ZnCl2 + Kolin klorür
2. Organik tuz + Hidrojen bağ donörü	Kolin klorür + Üre
3. Metal hidrat tuzu + organik tuz	CoCl26H2O + Kolin klorür
4. Metal hidrat tuzu + Hidrojen bağ donorü	ZnCl2 + Üre

Yapılan bu çalışmada, farklı metal tuzları ve kuaterner amonyum tuzları ile çok fazla sayıda karışım gerçekleştirerek test etmişlerdir. Çinko klorür ve kolin klorür 1:2 molar oranında karıştırıldığında elde edilen çözücünün donma noktasının 23-25°C aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonrasında, yine aynı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda hidrojen bağı donörleri ile kuaterner amonyum tuzlarının ötektik karışımları incelenmiş ve bunlara "derin ötektik çözücüler" adı verilmiştir. Çalışmalarda gerçekleştirilen testlerde 1:2 molar oranında karıştırılan kolin klorür ve ürenin diğer örnekler arasında 12°C ile en düşük donma noktasını verdiğini belirlemişlerdir (Abbott vd. 2003; Martins vd. 2019).

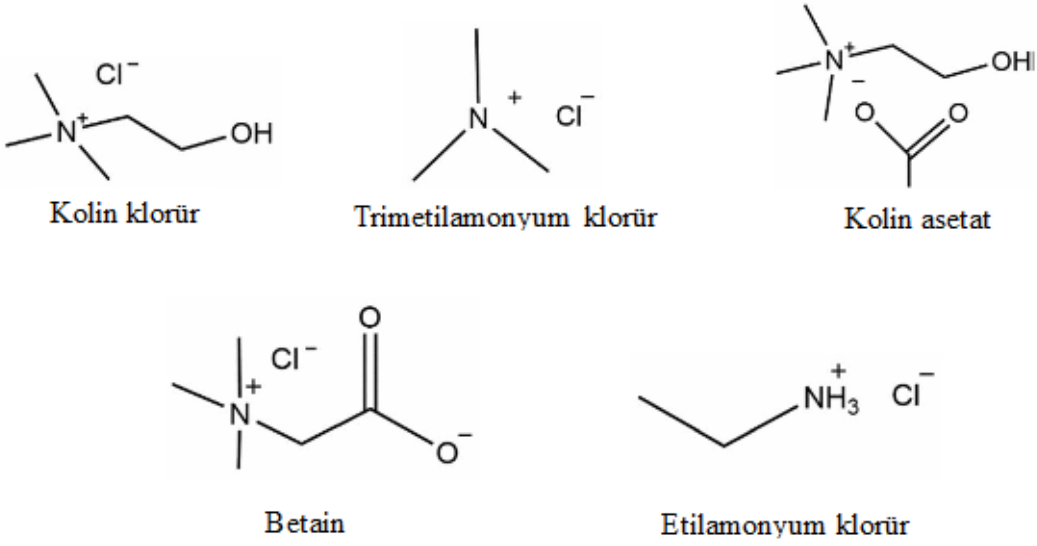
Donma noktaları sırasıyla 302°C; 133°C olan kolin klorür ve ürenin karıştırıldığında elde edilen çözücünün donma noktasının 12°C'ye düşmesi nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile kanıtlanmıştır. Donma noktasındaki bu düşüşe sebep olan durum, kolin klorür iyonu ve üre molekülleri arasındaki hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. Normalde oda sıcaklığında katı olan ancak karıştırıldığında oda sıcaklığında sıvı halde bulunan bu çözücülerle ilgili ilginç olan bir başka şey ise, aynı zamanda ayarlanabilir ve yüksek oranda çözünebilir olmalarıdır. Derin ötektik çözücüler ile ilgili yapılan başka karışım örneklerinde, kolin klorür ve karboksilik asitlerin karıştırılmasıyla elde edilen çözücülerin bazı metal oksitlere karşı önemli çözündürme kabiliyetinde olduğu gözlenmiştir (Abbott vd. 2004b). Kolin klorür ile krom (III) klorür hekzahidrat gibi hidratlı bir metal tuzu karıştırıldığında başka sıvılar da elde edilmiştir. Daha sonra, hidrojen bağ donörü olarak; dioller (etilen glikol ve 1,6-hekzandiol), metal tuzları ve amidler (üre ve asetamid) gibi karışımlar hazırlanıp farklı çözücüler elde edilmiştir (Abbott vd. 2007; Mamashli vd. 2019; Smith vd. 2014).

2.3.2.1 Doğal derin ötektik çözücüler (natural deep eutectic solvents-NADES)

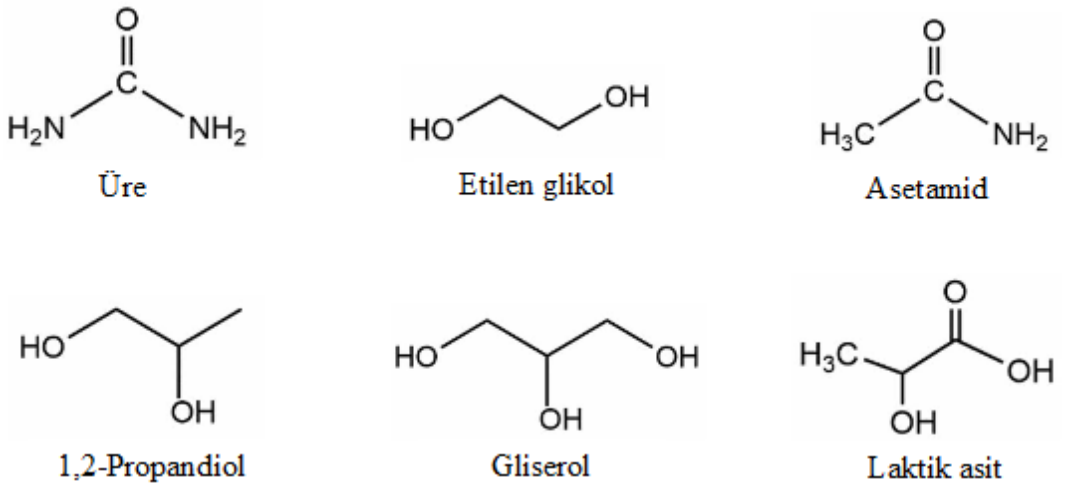
İyonik sıvıların ve derin ötektik çözücülerin, geleneksel olarak kullanılan organik çözücülere göre daha iyi ve çevre dostu olduğu kanıtlanmış olsa da toksisitelerinin olması ve biyolojik olarak parçalanmada problem yaratmaları sebebiyle endüstrideki kullanımı çok yaygınlaşamamıştır. Choi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, derin ötektik çözücülerin yapısında bulunan bileşenlerin çoğunun bitkilerde bulunabildiğini ve doğal derin ötektik çözücülerin, canlı hücrelerde suda çözünemeyen makromolekül

ve metabolitlerin sentezinde ve depolanmasında etkin olduğunu belirlemişlerdir. Alternatif olabilecek bu ortam sebebiyle, aşırı soğuk, sıcak ve kuraklık gibi zorlu hava koşullarında bile bitki yaşamını sürdürebilmektedir (Choi vd. 2011; Dai vd. 2013).

Derin ötektik çözücüler içerisinde doğal derin ötektik çözücüler en ilgi çekici olanlarıdır. Doğal olarak elde edilen asidik, bazik ya da nötr bileşenlerle hazırlanan derin ötektik çözücülere, doğal derin ötektik çözücü denilmektedir. Amino asit, organik asit ve şeker gibi doğal bileşenleri içeren doğal derin ötektik çözücüler doğa dostu uygulamalarda kullanılmasıyla yaygınlaşmaya başlamıştır (Velasquez vd. 2021; Yue vd. 2020). Doğal derin ötektik çözücüler; genellikle hidrojen bağ alıcı olarak kolin klorür, betain hidroklorür, trioktil amonyum klorür, tetrabütilamonyum klorür ve hidrojen bağ donörü olarak da karboksilik asitler, amino asitler, şekerler ve şeker alkolleri gibi doğal bitki bazlı organik türler karıştırılarak hazırlanmaktadır. Hidrojen bağ alıcı ve hidrojen bağ donörü hazırlanırken belirli molar oranlarda ve farklı sıcaklıklarda karıştırılmaktadır (Altunay vd. 2019; Duarte vd. 2017). Henüz başlangıç aşamasında olsa da, NADES'lerle ilgili çalışmalar üstel bir büyüme ile yeni oluşmaya başlamış, ilgi çekici ve çeşitli alanlarda kullanım potansiyeli göstermektedir. Doğal derin ötektik çözücüler; kimyasal ve termal olarak kararlı, yanıcı olmayan, atmosferik koşullar altında uçucu olmayan ve farklı organik bileşikleri çözebilecek kabiliyettedir. Fizikokimyasal özellikleri itibariyla bazı derin ötektik çözücülerin oda sıcaklığında yüksek viskoziteye sahip olması, ekstraksiyon işleminde sorun yaratabilmekte ve bunun giderilmesi için doğal derin ötektik çözücülerin kullanımı yaygınlaşabilmektedir. NADES çok sayıda kombinasyonda hazırlanabilir. NADES'lerle izole edilen birkaç bileşik Şekil 2.17 ve Şekil 2.18'de gösterilmiştir (Achkar vd. 2021; Razborsek vd. 2020; Velasquez vd. 2021).



Şekil 2.17. Hidrojen bağ alıcı (HBA) bileşen örnek



Şekil 2.18. Hidrojen bağ donörü (HBD) bileşen örnek

2.3.2.2 Derin ötektik çözücülerin fizikokimyasal özellikler

Araştırmacıların derin ötektik çözücülere olan ilgisinin ve merakının artmasındaki temel unsur bu çözücülerin sahip olduğu fizikokimyasal özellikleridir. Geleneksel olarak kullanılan organik çözücülere nazaran; kimyasal ve termal kararlılığı, yanıcı olmamaları, düşük buhar basıncı ve düşük uçuculuğa sahip olmaları derin ötektik çözücüleri avantajlı kılmaktadır. Ayrıca derin ötektik çözücüleri oluşturan bileşiklerin çok çeşitli olması ve farklı özelliklere cevap verebilmek adına kimyasal olarak ayarlanabilmesi bu çözücüleri farklı kılmaktadır (Cunha ve Fernandes, 2018).

2.3.2.2.1 Erime noktası

Derin ötektik çözücüler için erime noktası en önemli özelliklerden birisidir ve ideal olan ötektik sıcaklıktan daha düşük olan karışımları kapsamaktadır. Ayrıca derin ötektik çözücü olarak hazırlanan karışımların çalışma esnasında sıvı halde olmaları gerekmektedir. Bu sebepten derin ötektik çözücü hazırlanırken kullanılan saf bileşenlerin erime noktalarını bilmek bileşenin çözünürlük eğrisinin belirlenmesinde fayda sağlayabilecektir. Farklı bileşenlerin karışımı ile elde edilen derin ötektik çözücüler, karışımı oluşturan her bir bileşenden daha düşük erime noktasına sahiptir. Hidrojen bağ vericisi ve hidrojen bağ alıcısı karışım sürecinde gerçekleşen güçlü etkileşim sonucu oluşan yeni bileşenin erime noktasının düşüşüne sebep olmaktadır. Özellikle erime noktası 50°C'nin altında olan derin ötektik çözücüler; düşük maliyetli olmaları ve güvenlikleri sebebiyle endüstriyel kullanımda daha fazla tercih edildiğinden birçok araştırmacı tarafından daha çok araştırılmaktadır. Hidrojen bağ alıcı olarak karışıma katılan kolin tuzunun farklı türevlerinin hidrojen bağ alıcısı olarak kullanılan sabit bir bileşenle aynı oranla karışımları neticesinde erime noktalarında değişikliklerin olduğu görülmektedir. Bu durum da güçlü hidrojen bağ kuvvetinin erime noktası üzerindeki etkisini ifade etmektedir (Abbott vd. 2003; Martins vd. 2019).

2.3.2.2.2 Kaynama noktası

Derin ötektik çözücülerin bir diğer önemli fiziksel özelliği kaynama noktasıdır. Fakat bugüne kadar yapılmış çalışmalarda derin ötektik çözücülerin ısı kapasitesinin net bir şekilde belirlenebildiğini ifade eden bir modele rastlanılmamıştır. Kimi araştırmacılar çalışmalarında bazı derin ötektik çözücülerin kaynama noktalarını deneysel ölçümlerle tespit etmeye çalışmış ve elde ettikleri verileri sadece çalıştıkları çözücünün korelasyonunda değerlendirebilmişlerdir. Yani tüm derin ötektik çözücülerin kaynama noktalarının tespit edilebilmesi için gerekli olan genel bir metot belirlenememiştir (Siongco vd. 2013; Taherzadeh vd. 2020).

Derin ötektik çözücülerin kaynama noktalarının belirlenmesinde kullanılabilecek metotlar, çözücülerin sıcaklık aralığını, toksisitesini, bozunabilecek bileşiklerin tanımlanabilmesini ve uygulanabilirliğini de ortaya koymakta yardımcı olabilecek

çalışmalardır (Tang vd. 2015). Derin ötektik çözücülerin termal kararlılıklarının değerlendirilmesi için geçerli olan temel kavramlardan bahsedilmekte ve bu kavramlar konuyla alakalı evrensel klavuzlar olarak nitelendirilmektedir. Özellikle, derin ötektik çözücülerin termal kararlılığının değerlendirilmesinde tercih edilen termogravimetrik analiz için önemli olan bazı kriterler bulunmaktadır. Bunlar; çözücünün oluşturulmasında karıştırılan çözücülerin saflığı, çözücünün hazırlanmasındaki prosedür, hazırlanan çözücünün içeriğindeki su miktarı, termogravimetrik analizin deney koşulları ve en iyi ısıtma oranının belirlenmesidir. Tüm bunlar göz önünde bulundurulup hassas bir çalışma gerçekleştirildiğinde derin ötektik çözücüler için uygun çalışma aralığının belirlenebilmesi mümkün olabilmektedir (Gilmore vd. 2019; Gonzalez vd. 2022).

2.3.2.2.3 Yoğunluk

Sıvılardaki temel fiziksel özelliklerden birisi yoğunluktur. Bazı hidrofobik derin ötektik çözücüler hariç, çoğu derin ötektik çözücünün yoğunluğu sudan daha yüksektir. Hidrofobik derin ötektik çözücüler ise sudan daha düşük yoğunluğa sahiptirler (Florindo vd. 2019). Derin ötektik çözücülerin yoğunluğu, moleküler yapılarına bağlı olmakla birlikte bileşenin içerisinde boşluklu yapı belirleyici olmaktadır. Hidrojen bağ alıcı ve hidrojen bağ verici bileşenlerin seçimi ve farklı molar oranlardaki karışımlarının derin ötektik çözücülerin yoğunluğunu belirleyici etkisi bulunmaktadır. Bu etkiye sebep olan durumun bileşendeki alkil zincirlerin uzunluğunda meydana gelen uzamadan kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Cui vd. 2017; Garcia vd. 2015; Montalban vd. 2015). 25°C'de olan çoğu derin ötektik çözücünün yoğunluğu 1 ile 1,3 g/cm^3 arasında değişmektedir. Metal tuzlardan elde edilen derin ötektik çözücülerin ise, 1,3 ile 1,6 g/cm^3 aralığında yoğunluklarının olduğu bilinmektedir. Derin ötektik çözücülerin yoğunluğundaki değişime sebep olan bir diğer etken ise sıcaklıktır. Sıcaklığın artmasıyla birlikte derin ötektik çözücünün yoğunluğunda doğrusal olarak bir azalma meydana gelmektedir (Cui vd. 2017; Florindo vd. 2014; İbrahim vd. 2019; Shahbaz vd. 2012; Tang ve Row, 2013).

2.3.2.2.4 Viskozite

Sıvılarda akmaya karşı gösterilen direnç olarak tanımlanan viskozite, derin ötektik çözücülerle çalışma esnasında önemli yeri olan bir diğer belirleyici unsurdur. Derin ötektik çözücülerin çoğu oda sıcaklığında viskoz bir sıvı olarak bulunmaktadır. Viskozite özelliği; derin ötektik çözücülerin uygulama esnasında taşıma özelliğinin ve iletkenliklerinin belirlenmesinde önemli bir etkendir. Derin ötektik çözücülerin bileşeninde bulunan hidrojen bağ alıcılılar ile hidrojen bağ vericileri arasındaki van der walls ve elektrostatik kuvvetlerin oluşturduğu hidrojen bağlarının, az boşluklu hacimdeki karışımı oluşturması yüksek viskozite ve düşük iyonik hareketliliğe sebep olmaktadır. Derin ötektik çözcülerin viskozitesini; karışımı oluşturan her bir bileşenin yapısı, su içeriği, sıcaklık ve molar oranları belirlemektedir (Abbott vd. 2011; Dai vd. 2015; D'Agostino vd. 2015; Du vd. 2016; Florindo vd. 2014). Ayrıca derin ötektik çözücüler geniş bir viskozite aralığı vermektedir. Örneğin; 1:2 molar oranında karıştırılan kolin klorür etilen glikol bileşenlerinin 25°C'deki viskozitesi 37 mPa.s gibi düşük bir vizkozitede iken, şeker bazlı derin ötektik çözücülerden 1:1 molar oranında karıştırılan kolin klorür ve sorbitol'ün 30°C'deki viskozitesi 12.730 mPa.s değerinde oldukça yüksek bir viskozitededir. 1:2 molar oranında kolin klorür ve çinko klorür örneğindeki metal tuzları ile elde edilen derin ötektik çözücülerde ise 85.000 mPa.s değerinde oldukça yüksek viskozite elde edilirken, hidrofobik derin ötektik çözücülerin oldukça düşük viskozitede oldukları görülmüştür. Derin ötektik çözücülerin viskozitesinin belirlenmesinde sadece hazırlama yöntemi değil, karışımdaki bileşenlerin safsızlığı ve uygulanan deneyin metodu da etkili olmaktadır (Garcia vd. 2015; Nunes vd. 2019; Ribeiro vd. 2015; Zhang vd. 2012).

2.3.2.2.5 İletkenlik

İletkenliği etkileyen en önemli unsur viskozitedir. Derin ötektik çözücüler oda sıcaklığında yüksek viskoziteye sahip olmaları sebebiyle iyonik iletkenlikleri de düşüktür. Viskozitenin değişimine sebep olan sıcaklık, iletkenlik üzerinde de belirleyici olmaktadır. Yani sıcaklığın artırılmasıyla birlikte viskozite azalacağından iletkenliğin artmasına sebep olacaktır. Sıcaklık etkisinin yanı sıra, derin ötektik çözücüyü oluşturan hidrojen bağ alıcısı ve hidrojen bağ vericisi bileşenlerinin molar

oranları ve alkil zincirin uzunluğu da iletkenliğin belirlenmesinde önemli yeri bulunmaktadır. Ayrıca hidrojen bağ alıcısı ve hidrojen bağ vericisinin karakteristik yapısından ve tuzun anyonunun da iletkenlik üzerinde etkisi bulunmaktadır. İletkenliğin belirlenmesinde tüm bu parametrelere ilave olarak derin ötektik çözücü hazırlanırken karışıma ilave edilen suyun da iletkenliğe etkisi bulunmaktadır (Dai vd. 2015; Lapena vd. 2019; Zhang vd. 2012).

2.3.2.2.6 Polarite

Ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücülerin, çözme kabiliyetini belirlemesi açısından polarite büyük önem taşımaktadır. Polaritenin önemli olmasına rağmen derin ötektik çözücülerin polaritesi üzerine son zamanlarda çok fazla araştırma yapılmamıştır. Ancak büyük oranda derin ötektik çözücülerin polar yapıda oldukları bilinmektedir. Çözücülerin polaritesinin belirlenmesinde yaygın olarak negatif solvatokrimik boya olan Reichardt'ın betain boyası ile pozitif solvatokromik boya olan nil kırmızısı kullanılmaktadır. Dimroth ve Reichardt polarite ölçekleri (ET ve ETN) en fazla kullanılan ölçeklerdir. Polarite ölçekleri, proba bağlı olduklarından evrensel olarak değerlendirilememektedir. Bu sebeple, çözücülerin polarite parametrelerinin karşılaştırmasının yapılması gerçekleştirilememektedir. Derin ötektik çözücülerin yapısında bulunan hidrojen bağ alıcılar ile hidrojen bağ vericilerin arasındaki etkileşim polaritenin artmasına sebep olmaktadır (Reichardt, 1994; Valvi vd. 2017).

2.3.2.2.7 Yüzey gerilimi

Derin ötektik çözücülerin yüzey gerilimleri ilgili araştırmalar çok geniş alana yayılmayıp sınırlı kalmıştır. Fizikokimyasal özelliklerden yüzey gerilimi için; derin ötektik çözücüleri oluşturan hidrojen bağ alıcı ve hidrojen bağ vericilerin etkileşimlerinin oluşan bileşenin moleküler yapısındaki yoğunluğu etkilemesi sebebiyle bir farklılığa neden olmaktadır. Yani hidrojen bağ alıcısı ve hidrojen bağ vericisi molekülleri arasındaki etkileşim yüzey gerilim miktarını belirlemektedir. İletkenlik de olduğu gibi yüzey geriliminin belirlenmesinde viskozite belirleyici olmaktadır. Yüksek viskoziteye sahip olan derin ötektik çözücülerin yüzey gerilimleri de yüksek olmaktadır. Derin ötektik çözücüler içerisinde şeker bazlı olanların

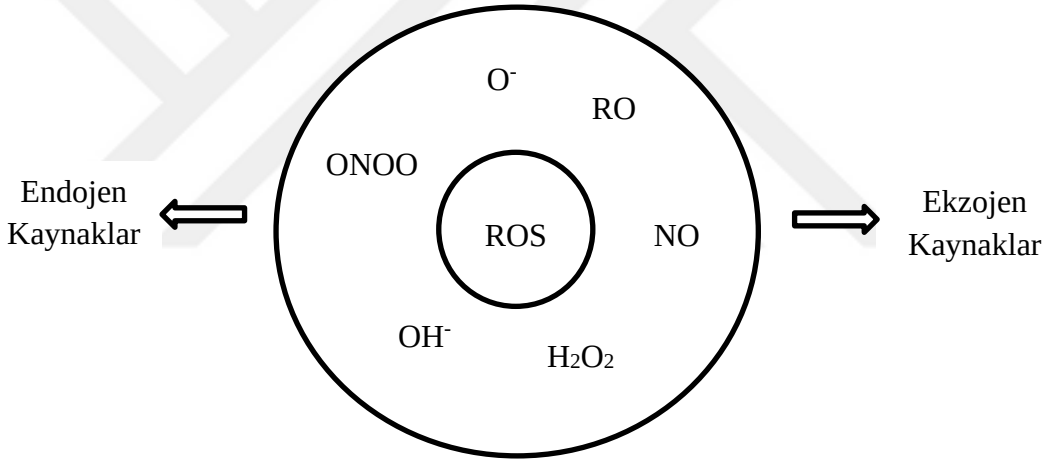
viskoziteleri yüksek olduğu için otomatikman yüzey gerilimleri de yüksek olmaktadır. Derin ötektik çözücülerin yüzey gerilimlerindeki değişikliğe sebep olan parametreler ise; sıcaklık, alkil zincir uzunluğu, derişim, hidrojen bağ alıcısı ve hidrojen bağ vericisinin karakteristik özellikleridir. Derin ötektik çözücülerin oluşumunda organik tuz miktarı artarsa gerçekleşen hidrojen bağında bozulmalar olabilmekte, bu da yüzey geriliminde düşmeye sebebiyet verebilmektedir. Sıcaklığın artmasıyla birlikte viskozite düşecek ve dolayısıyla yüzey gerilimi de düşecektir (İbrahim vd. 2019; Lapena vd. 2019; Omar ve Sadeghi, 2020).

2.4 Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite

2.4.1 Antioksidan Aktivite

Sağlıklı hücrelerin normal işleyişinde reaktif oksijenler bulunmakta ve antioksidanlarla etkileşim halinde denge oluşturmaktadırlar. Yaşamsal faaliyetler sırasında çeşitli zarar verici çevresel faktörler, sağlıksız gıdalar, hava kirliliği vb. etkilerle serbest radikallerin yüksek aktivitede olması bu dengeyi bozacaktır. Dengenin bozulmasıyla reaktif oksijenler ile antioksidanlar arasındaki etkileşimin bozulması neticesinde hücrede süperoksit radikaller birikmekte ya da endojen savunma sistemi reaktif oksijenlere karşı koyamamaktadır. Savunma sisteminin yetersiz kalması olayı oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres, doku hasarına, hücre ölümlerine yol açabilecek serbest radikallerin aşırı üretilmesini tetiklemektedir. Serbest radikaller organizmada birçok etkiye sebep olmaktadır. Reaktif oksijenlerin artması hücrenin toksik etkide olmasına ve yine hücredeki lipidlerin, nükleik asitlerin ve proteinlerin hasara uğrayarak hücre içi sinyal mekanizmasının bozulmasına sebep olmaktadır. Serbest radikallerce uyarılan oksidatif stresin; diyabet, alzheimer, kanser, kalp, eklem, cilt ve parkinson başta olmak üzere birçok hastalığın oluşmasına sebebiyet vermesi söz konusudur. Bunlar dışında oksidatif stresin oluşturduğu hasarın ilerlemesiyle yaşlanma ve yaşlanmadan kaynaklı hastalıklar görülebilmektedir (Lopez-Alarcon ve Denicola, 2013; Pisoschi ve Pop, 2015; Young ve Woodside, 2001).

Serbest radikallerin yapısıyla ilgili bilmemiz gereken, orbitallerinin en dışında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu bulundurmasıdır. Bu yapıda basit bir atom da olabilmekte ya da kompleks yapıda bir organik madde de olabilmektedir. Bahsigeçen bu kimyasal türlerin dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron bulundurmaları reaktivitesini çok fazla artıracağından radikallerin reaktivitesi de olağanüstü seviyede olabilmektedir. Reaktivitesi fazla olan bu serbest radikaller, başka bir radikalle ya da radikal olmayan bir yapıyla birleşebilmektedirler. Bu bağın oluşması ile birleşme neticesinde organizmada çokça biolojik etki oluşmaktadır. Endojen (mitokondri, lipoksijenazlar, NADPH oksidaz, peroksizomlar vb.) ve ekzojen (UV ışınlar, hava kirliliği, sigara, iyonize radyasyon, ilaç toksisitesi, çevresel toksinler vb.) olarak nitelendirilen, etkiler serbest radikallerin oluşumunu engelleyememekte ve sürekli üretilmesine sebep olmaktadır (Şekil 2.19) (Poljsak vd. 2011; Poljsak vd. 2013).



Şekil 2.19. Reaktif oksijen türleri (Aslankoç vd. 2019)

Serbest radikallere karşı savaş görevi gören, mevcutta bulunan serbest radikalleri süpüren ya da yeni serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek hücrenin zarar görmesini engelleyen yapıya antioksidan denilmektedir. Antioksidanlar, gıda maddelerini, bu gıda maddelerini tüketen canlılarda oluşan, dengeyi bozan reaktif oksijen ve nitrojen türü serbest radikal moleküllerin oluşturacağı zararlara karşı koruyan kimyasallardır. Organizmada metabolik faaliyetlerin gerçekleştiği enerji üretim aşamasında elektron transferinde reaktif oksijen ve nitrojenler açığa çıkmaktadır. Antioksidan savunma sistemleri bunu denge halinde tutmak için faaliyet göstermektedir. Ancak bazı durumlarda antioksidan savunma sistemi serbest radikallerle mücadelede yetersiz kalıp serbest radikallerin etksini

engelleyememektedir. Bu durumda dengenin bozulmasına ve oksidatif strese sebep olmaktadır (Lippman vd. 2007; Nagai vd. 2005; Samaranayaka ve Li-Chan, 2011).

Antioksidanlar, organizmada koruyucu görev üstlenerek serbest radikalleri etkisiz hale getirmek için kendi elektronlarını vermektedir. Bu işlemi yaparken de serbest radikal haline geçmemektedir. Antioksidanların kimyasal yapısı, aktivite ilişkileri, doğal kaynaktan elde edilip edilmemeleri ve çözünürlükleri insan sağlığı açısından en önemli faktörleri oluşturmaktadır (Akter vd. 2018).

Sağlıklı bir hücrede, peroksit ve serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stresin yok edilmesi için antioksidan savunma sistemleri aktif olarak çalışmaktadır. Enzimatik ve enzimatik olmayan olarak gruplandırılan iki farklı antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar

Enzimatik Antioksidanlar	**Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**	
	Doğal	**Sentetik**
Katalaz	Polifenolik bileşikler	Gallik asit türevleri
Glutatyon-S-tranferaz (GST)	Karotenoidler	Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)
Glutatyon redüktaz (GR)	α-tokoferol (E vitamini)	Bütillenmiş hidroksianisol (BHA)
Selenyum bağımlı glutatyon	C vitamini (L-askorbik asit)	Nordihidroguareyetik asit (NDGA)
Süperoksit dismutaz (SOD)		Tersiyer bütilhidrokinon (TBHQ)
Peroksidaz (GPx)		

Doğal antioksidanlar, polifenolik bileşiklerce zengin olan otsu ve odunsu bitkilerde fazlaca bulunmaktadır. İçeriğindeki biyoaktif bileşenlerin ve etkisinin belirlenmediği halde geçmiş zamanlarda da insanlar, deneme yöntemleriyle çoğu bitkiden yararlanarak hastalıklarını ve yaralarını tedavi etmişlerdir. Günümüzde hala daha bu amaçlarla kullanılan bitkilerin neden ve niçin kullanıldığı artık bu alanda yapılan birçok çalışma neticesinde açıklanmaktadır. Bu konuyla ilgili Dünya'da sahip olunan bitki çeşitliliği, bilim insanlarını da yeni araştırmalar için oldukça heyecanlandırmaktadır. Bitkiler üzerine yapılan çalışmalarda, bitkilerin biyoaktif özellikleri araştırılmış ve biyoaktif özelliğe sebep olan fitokimyasal bileşenler

belirlenerek yapıları ve özellikleri tanımlanmaya çalışılmıştır (Kulkarni ve Vijayanand, 2010; Kürşat ve Erecevit, 2009; Sevindik vd. 2017).

2.4.2 Fitokimyasallar

İnsan sağlığı için önemli olan fakat besin olarak alınması mümkün olmayan sekonder metabolik faaliyetler sonucu bitkilerden elde edilebilen biyoaktif bileşiklere fitokimyasallar denilmektedir (Visioli vd. 2000; Sevindik, 2018). Bitki hücreleri yapılarında bulunan karbonun tümünü primer faaliyetlerinde kullandıklarında sekonder metabolitleri oluşturmaktadırlar. Yani sekonder metabolitler, öncelikli durumda olan primer metabolitlerinden oluşan tali ürünlerdir. Fitokimyasal bileşikler, bitkiler için hücre duvarı yapısının korunması ve UV ışınlarına karşı koruyucu görev üstlenmiştir. Fenolik bileşikler, fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, stilbenler, lignanlar, terpenler, alkaloidler ve kumarinler en fazla tanınan fitokimyasal bileşiklerdir. Antioksidan aktivitede oldukları bilinen bu fitokimyasal bileşikler birçok hastalığın tedavisinde etkin olan maddelerdir (Fidan ve Dündar, 2007; Vital vd. 2010). Fitokimyasal bileşiklerin metal iyonlarını şelatlaştırıcı etkisi sayesinde tümör oluşumu ve gelişimine sağlayan etkileri bastırmakta ve dejenerasyon sonucu oluşan hastalıkları da önleyebilmektedir (Verma vd. 2009). Fitokimyasal bileşikler, antioksidan aktivitesinin yanısıra antimikrobiyal, antialerjenik, antiülser, antienflamatuar ve antikarsinojenik etki göstermektedirler (Halliwell, 2007; Weisburger, 2000). Kanser tedavisinde oluşan olumsuz etkilerin azaltılması hususunda fitokimyasal bileşiklerin antikarsinojenik etkiye sahip olmalarının, koruyucu özellik kazandırdığı bazı çalışmalarda belirlenmiştir (Benjamin vd. 2015; Thi Quynh Doan ve Brogger Christensen, 2015).

Sekonder metabolitler; bitkilerin yaşamdaki farklı dönemlerine, sahip oldukları organlardaki konumuna ve genetik olarak özelliklerine göre farklı yapılarda ve oranlarda sentezlenebilmektedir. Bu olgular harici bulunduğu ortamın toprak yapısına, iklimine, topografik yapısına, yüksekliğine ve bitkinin gün içerisindeki fizyolojik yapısına göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bitkinin gün içerisindeki fizyolojik yapısında değişiklik olması haricinde günün farklı saatlerinde bile ürettikleri sekonder metabolit oranları farklı olabilmektedir. Bahsedilen bu olgulardan kaynaklı olarak

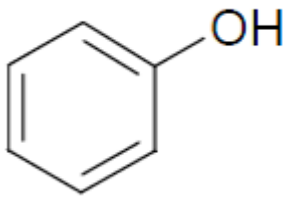
bitkiler irsel yeteneklerinden ve ekolojik etkenlerden dolayı hem olumlu hemde olumsuz etkilenebilmektedirler. Bu olumlu ve olumsuz etkilenmeden dolayı bitkide üretilen sekonder metabolitler farklı oranlarda ve kalitede olabilmektedir. Ayrıca bitkinin farklı gelişim dönemlerinden kaynaklı olarak sentezlenen sekonder metabolitlerin oranı da değişkenlik gösterebilmektedir (Baydar, 2019; Szajdek ve Borowska, 2008).

Bazı otçul hayvanların, böceklerin ve patojenik özellikteki mikroorganizmaların saldırıları sonucu bitkiler tehdit altında olduklarında kendilerini korumak için sekonder metabolitleri daha çok üretmektedirler (Baydar, 2019). Yağış, yükseklik, sıcaklık, nem ve toprak gibi çevresel koşullardan kaynaklı olarak stres altında olan bitkilerin sekonder üretimleri de değişkenlik göstermektedir. Örneğin; yağışlı ve soğuk bölgelerde yaşayan tıbbi ve aromatik bitkilere göre, kurak ve sıcak yerlerde yaşayan bitkiler daha fazla uçucu yağ ve alkaloit üretebilmektedir. Bitkilerin yaşadıkları çevreden etkilenme durumlarında, su stresine girdiklerinde bazı aminoasitlerin üretimi, otçul hayvanların ve böceklerin saldırısı sonucu tanenlerin, acılık veren alkaloitlerin üretimi, bakterilerden kaynaklı olarak oluşan enfeksiyonlarda fenolik ve flavonoidlerin üretimi, ışık ve sıcaklık değişimlerinden kaynaklı olarak antioksidan üretimi değişik oranlarda gerçekleşebilmektedir (Sağlam, 2021; Tiring vd. 2021).

2.4.2.1 Fenolik bileşikler

Bitkilerde aromatik aminoasitlerin reaksiyonlarında üretilen sekonder metabolitlerden bir kısmını fenolik bileşikler oluşturmaktadır (Lattanzio, 2013). Aromatik bileşikler içerisinde izole edilmiş fenolik bileşikler yaklaşık olarak %10'luk bir kısma tekabül etmektedir. Bu da demek oluyor ki daha çok fazla tespit edilmesi gereken fenolik bileşen bulunmaktadır. Bitkilerde renk, tat ve koku gibi etkilere sebep olan fenolik bileşikler, bitkilerin değişik bölgelerinde farklı oranlarda bulunmaktadır. Aynı zamanda antioksidan ve antimikrobiyal aktivite açısından etkindirler. Serbest radikalleri bağlayıcı ve metallerin şelatlanma özelliklerini aktif edip antioksidan aktiviteyi sağlayan en önemli doğal kaynaklar olarak nitelendirilmektedirler (Verma vd. 2009). Kimyasal yapılarında bulunan fenol halkalarındaki OH gruplarının artması

ile antioksidan aktiviteleri de artmaktadır (Şekil 2.20). Bunların yanısıra fenolik bileşikler, serbest radikallere dönüştüklerinde sabit bir durumda kalabilme, düşük derişimlerdeki oksidasyonu ise yavaşlatma ya da önleyebilme yeteneğine sahiptir (Santos-Buelga ve Scalbert, 2000; Silva vd. 2005). Fenolik bileşikler antioksidan aktivitelerinin haricinde; antimikrobiyal, antikarsinojen, antialerjen, antikolesterol ve antienflamatuar etkilere sahip olmaları sebebiyle gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde tercih edilmektedir. Fenolik bileşenlerce zengin olan besinler tüketen insanların kalp hastalıklarına yakalanma riskinin düşük olduğu ifade edilmektedir (Naczk ve Shahidi, 2006; Pehlivan vd. 2018; Skowyra vd. 2014; Wanasundara ve Shahidi, 1998). Fenolik bileşikler kimyasal yapıları bakımından incelendiğinde, sahip oldukları fenol halka sayılarının ve bu halkaların birbirine bağlanma şekillerine göre kendi içerisinde gruplara ayrılmaları söz konusudur. Bunlar; fenolik asitler, flavonoidler, (flavanonlar, izoflavonlar, flavanoller, antosiyaninler, flavonlar ve flavonollar) lignanlar ve stilbenlerdir (Güzel ve Akpınar, 2019; Khan vd. 2014).

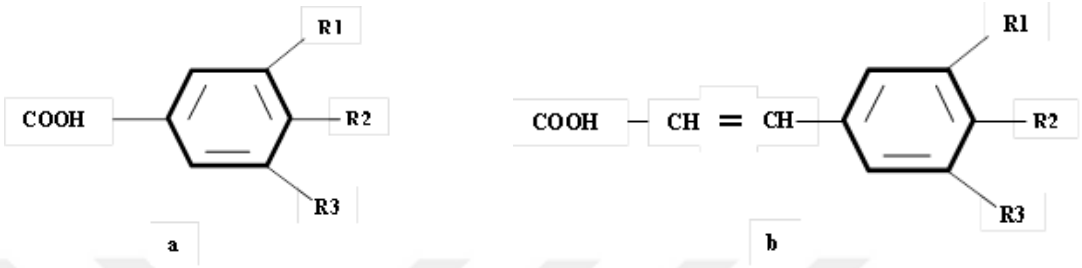


Şekil 2.20. Fenol yapısı

Bitkilerden elde edilen özütlerdeki biyoaktif bileşiklerin bazı hastalıkların oluşmasını engelleyici ya da hastalıkları tedavi edici etkide olmaları sebebiyle farmakoloji ve tıp alanında nutrasötik olarak değerlendirilebilmektedir (Dahmoune vd. 2015; Teo vd. 2013). Bitkilerden elde edilen özütler analiz edilip içeriğindeki biyoaktif bileşikler incelendiğinde özütler, yoğun olarak flavonoidlerin bulunduğu fenolik bileşiklerden oluşmaktadırlar. Flavonoid grubu başta omak üzere fenolik bileşiklerin serbest radikalleri süpürücü etkisinden dolayı yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bilinmektedir. Flavanoidlerce zengin besinlerin tüketilmesi ile vücutta oluşabilecek oksidatif stres baskılanabilmekte ve koruyucu etki gösterebilmektedir (Baki vd. 2018).

2.4.2.1.1 Fenolik asitler

Fenolik bileşiklerin yaklaşık olarak 1/3'ünü bitkilerde bağlı ya da serbest halde bulunan fenolik asitler oluşturmaktadır. Fenolik asitler, hidroksisinamik ve hidroksibenzoik asitlerden oluşmaktadır (Şekil 2.21) (Zadernowski vd. 2009).



Şekil 2.21. Fenolik asitler a) Hidroksibenzoik asit, b) Hidroksisinnamik asit

Bitkilerde doğal olarak bulunan hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitlerin fitokimyasal özellikleri araştırılmıştır. İlaç, kozmetik ve gıda sektörlerinde yaygın olarak kullanılan gallik asit bitkilerden doğal yolla elde edilen önemli bir fenolik asittir. Literatürde, özellikle yeşil çaydan elde edilen ekstraktlarda bulunan gallik asit önemli antioksidan ve antimikrobiyal aktivite gösteren bileşik olarak ifade edilmektedir (Curcio vd. 2009; Strlic vd. 2002).

Önemli fenolik asitlerden biri olan şiringik asit ve vanilik asit oksidatif stresin oluşumunu engelleyici ve kronik karaciğer hastalığına karşı önleyici etki göstermektedir (Itoh vd. 2010). Hidroksibenzoik asit türevlerinden biri olan vanilik asit gıda endüstrisinde katkı maddesi olarak kullanılan lezzet ajanı olarak nitelendirilmektedir (Walton vd. 2003). Endüstride gıda katkı maddesi olarak kullanımının haricinde antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar ve pıhtılaşmayı önleyici etkide olduğu da belirlenmiştir (Lv, 2009).

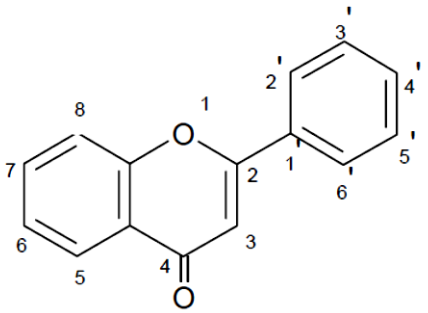
Bitki hücrelerinin duvarlarında bulunan ferulik asit, *Pseudomanas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Citrobacter koseri, Enterobacter aerogenes, Helicobacter pylori, Shigella* bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Usal, 2014).

Hidroksisinamik asitler içerisinde önemli olan sinapik asit, tahıllarda yüksek oranda bulunmaktadır. Çavdarda bulunan sinapik asitin ferulik asitten sonra en fazla görülen asit olduğu bilinmekte ve yaklaşık olarak fenolik asitlerin %10'unu oluşturmaktadır (Bondia-Pons vd. 2009). Fenolik asitlerin büyük bir kısmını oluşturan sinapik asidin antienflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser etkilerinin yanısıra önemli bir antimutajenik etkide olduğu tespit edilmiştir (Niciforovic ve Abramovic, 2014; Schijndel vd. 2016).

Ayçiçeği tohumlarında yoğun olarak bulunan kafeik asitin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitede olduğu belirlenmiştir (Chen ve Ho, 1997; Gülçin, 2006).

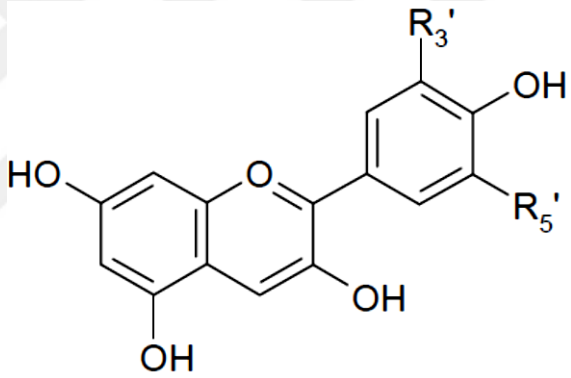
2.4.2.1.2 Flavonoidler

Fenolik bileşenlerin en önemlilerinden olan flavonoidler; antimikrobiyal, antioksidan ve metal şelatlama özelliğine sahip sekonder metabolitlerdir (Heim vd. 2002; Sivam vd. 2010). Flavonoidler, bitki çeşitliliği içerisinde bünyesinde en fazla bulunan fenolikler olarak nitelendirilmekte ve insanlar tarafından sentezlenememektedir (Sivam vd. 2010). Yapısında C6-C3-C6 şeklinde 15 karbon atomu içeren difenilpropan zinciri ile birleşmesi sonucu oluşmuş bir bileşiktir (Şekil 2.22). Flavonoidler halka yapılarına göre, flavanonlar, izoflavonlar, flavanoller, flavonlar ve flavonoller olarak gruplara ayrılmış doğada yaklaşık olarak 4000'den fazla flavonoid bileşiklerinin olduğu belirtilmiştir. Yapılan çaışmalarda, flavonoidlerin antioksidan, antikarsinojen, antienflamatuar, antiviral, antialerjik ve antiaging etkilerde olduğu belirlenmiştir (Ahmed vd. 2016; Çağlar vd. 2017; Liang vd. 2017; Moein vd. 2007; Parhiz vd. 2015; Seo vd. 2016; Sharma vd. 2015; Shebis vd. 2013).



Şekil 2.22. Flavonoidlerin genel iskelet yapısı (İskefiyeli, 2014)

Büyük oranda meyve ve sebzelerde bulunan suda çözünebilen doğal pigmentler olarak bilinen bileşikler antosiyaninlerdir (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010). Meyve ve sebzelere renk verme özelliğinde olan bu fenolik bileşiklerin yapısındaki metoksi grubundaki sayı arttıkça kırmızı, hidroksil grubu sayısında artış oldukça ise mavi renk oluşumu artmaktadır (Kong vd. 2010). Renk veren pigmentler; kafeik asit, askorbik asit, kumarik asit, vanilik asit ve ferulik asit gibi moleküllerle birleşme ya da gıdalarda şekerler ile esterleşme yaparak varolmaktadır. Antosiyaninlerin tat ve renk verici özelliklerinden dolayı şekerleme, dondurma, içecek ve yoğurt gibi çeşitli gıda ürünlerinde kullanımı tercih edilmektedir. Antosiyanin bileşiklerin; antimikrobiyal, antioksidan, antikanserojenik, antidiyabetik, antienflamatuar, antialerjik, antiviral ve antimutajenik etkilerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.23) (Ghosh ve Konishi, 2007; Kong vd. 2010).

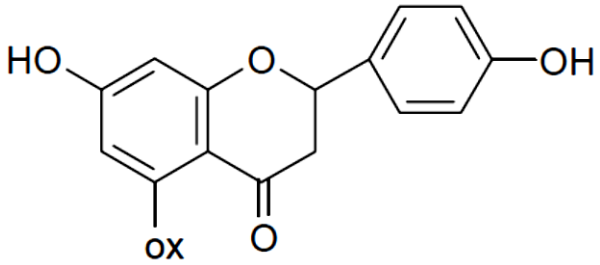


Şekil 2.23. Antosiyanin pigmentlerinin genel iskelet yapısı (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010)

Flavonlar; flavonoidlerin ana bileşenleridir. Flavonların en bilindik önemli bileşenleri ise apigenin, luteolin, rutin ve krisindir. Maydanoz, papatya ve kereviz bol miktarda apigenin, lahana, brokoli ve kırmızı acı biber luteolin, domates, kiraz ve kırmızı şarap rutin bileşenlerini içermektedir (Fidan ve Dündar, 2007).

Flavonun 3. karbon atomuna bağlanmış olan hidroksil grubu flavonollerin yapısını oluşturmakta ve bitkilerde oldukça fazla görülen flavonoid türüdür (Şekil 2.24). Flavonollerin en bilindik önemli bileşenleri mirisetin, kuarsetin, kaempeferol ve fisetindir. Soğan, armut ve lahana gibi yeşil, sarı, kırmızı ve beyaz renkli besinlerde fazlaca bulunmaktadır (Ghosh ve Konishi, 2007).

Flavonun türevi olan flavanonun en bilindik bileşenleri ise hesperetin ve naringenindir. Hesperetin ve naringenin turunçgillerde yoğun olarak bulunan flavanonlardır. Flavonların izomeri olan izoflavonların en bilindikleri ise genistein ve daidzeindir. İzoflavonlar genel olarak soya ürünlerinde bulunmaktadır (Pascual-Teresa vd. 2000).



Şekil 2.24. Flavanonun genel iskelet yapısı (Nizamlıoğlu ve Nas, 2010)

Flavonoidlerin gıdalarda en fazla bulunan grubu kateşinlerdir. Kateşinlerin kimyasal yapısında asimetrik iki karbon atomu bulunduğu için 4 farklı izomeri bulunmaktadır. Bu izomerler; gallokateşin, kateşin, epigallokateşin ve epikateşindir (Pascual-Teresa vd. 2000). Siyah çaydan elde edilen ekstraktlarda yüksek oranda bulunan kateşinin serbest radikalleri büyük oranda yok edebildiği belirlenmiştir (Li ve Xie, 2000). Ayrıca çeşitli bitkilerden elde edilen kateşinin, diş eti rahatsızlığına sebep olan mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ve antikansorejen etkide oldukları tespit edilmiştir (Azam vd. 2004; Demir vd. 2017; Ho vd. 2001).

2.4.2.2 Tanenler

Fenolik bileşikler içerisinde diğer bir önemli biyoaktif bileşik tanendir. Tanenler amorf yapıda olan, toz halde bulunan açık sarı ya da kahverengi renkte olan bileşiklerdir. Tanenler kendi içerisinde 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; kondanse tanenler, kompleks tanenler, gallotanenler ve elajitanenlerdir. Proteinleri çöktürme, metal iyonu şelatlama gibi özellikleri sayesinde tanenler farklı reaksiyonlar göstermektedirler. Isıyla muamele gören tanen bileşikleri pirogallik aside dönüşmekte ve bu asitin de antikanserojen etkide olduğu tespit edilmektedir. Tüm bunlara ilave olarak tanen bileşiklerinin vücuttaki insülin salgılanmasını düzenleyici etkide olduğu belirlenmiştir (Hagerman, 2012; Skowyra vd. 2014).

2.4.2.3 Stilbenler

Bitkilerde oldukça yaygın olarak bulunan polifenolik bileşiklerden birisi de stilbenlerdir. Üzümün kabuğunda ve kırmızı şarapta yoğun olarak bulunan resveratrol stilbenlerin en bilinen bileşiğidir (Espin vd. 2007). Bitkilerin yapısında çeşitli patojenler ya da bazı stres koşullarında oluşan enfeksiyonlara karşılık stilbenler üretilmektedir. Üzüm, dut, ahududu, çilek ve yer fıstığı başta olmak üzere oldukça fazla bitkide stilbenler bulunmaktadır. 70'ten fazla bitki türünde tespit edilmiştir (Skowyra vd. 2014). Stilbenlerin antioksidan aktiviteleri de göz önünde bulundurulduğunda, kırmızı şaraptan ayrıştırılan stilbenlerin radikal süpürücü olarak aktif olduğu belirlenmiştir (Vincenzi vd. 2016). Antioksidan aktivitesinin haricinde çeşitli bakteri ve mantarlara *(Pseudomonas syringae, Bacillus subtilis, Monilinia aucupariae* ve *Aspergillus niger)* karşı antimikrobiyal aktivitede olduğu da belirlenmiştir (Aslam vd. 2009).

2.4.2.4 Lignanlar

Önemli fitokimyasallardan biri olan lignanlar, 2 fenilpropan biriminden oluşmaktadır. Kanser tedavisinde kullanımları ve başka farmakolojik alanlarda kullanılabilir olmaları lignanları ve türevlerini önemli kılmakta ve ilgisini artırmaktadır. Lignanlarla ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan bazı bitkilerden elde edilen lignan bileşiklerinin kanserli hücrelere karşı baskılayıcı etki göstermesinin haricinde, bazı ağız içi patojenlerine karşı antimikrobiyal aktivitede, antienflamatuar, antiviral ve antialerjik aktivitede olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sentetik antioksidan olan bütillenmiş hidroksi tolüene (BHT) yakın antioksidan aktivitede olduğu tespit edilmiştir (Jimenez vd. 2018; Kayano vd. 2014; Olaru vd. 2015).

2.4.3 Antimikrobiyal Aktivite

Hastalıklara sebep olan mikroorganizmaların uygun ortamda çoğalmaları, belli bir seviyede baskılanması, önlenmesi ya da en iyi sonuç olarak öldürülmesi aşamalarını meydana getiren biyolojik ya da kimyasal maddelere antimikrobiyal madde denilmektedir (Canales vd. 2005). Mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıklar, oluşan enfeksiyonlara karşı tedavi edici antimikrobiyal maddeler antibiyotiklerdir.

Antibiyotikler, hastalıkların ilk aşamasında tedavi etmek amacıyla kullanılan ilaçlardır. Ancak antibiyotiklerin bilinçsizce ve aşırı kullanımı sonucu farklı sorunlarla karşılaşılmaya başlanmıştır. Antibiyotik kullanımına başlanması ve iyileşme görülmeye başlandığında kontrolsüz bir şekilde antibiyotiğin bırakılması sonucu insan vücudunda var olan patojenlerin sonra ortaya çıkacak hastalıklarda daha dirençli hale gelmelerine sebep olmaktadır (Çelik vd. 2010). Yani vücuda giren antibiyotiği tanıyan, vücuttan atılamayan, öldürülemeyen patojenler bu antibiyotiği tanıdıkları için ona karşı direnç geliştirecekler ve bir sonraki tedavi aşamasında antibiyotiğin etkisiz omasına sebep olacaktır. Bu da insan metabolizmasının bağışıklığının zayıflamasına sebep olmaktadır. Bu durum da bağışıklık sistemini zayıflatan enfeksiyon, AIDS ve kanser gibi hastalıkların tedavisinde başarısızlıklara sebep olmaktadır (Canales vd. 2005). Ayrıca bu durumlardan dolayı antibiyotiklere karşı bağışıklık kazanmış mikroorganizmalar bu özelliklerini yeni türlerine aktarmakta ve bu sebepten antibiyotiklerin kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır. Bu sınırlandırmanın çözülebilmesi için hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek yeni antimikrobiyal aktivitede olan antibiyotikler araştırılmaktadır (Raza, 2006). Mikroorganizmaların sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan modern tıp ilaçlarına muadil olabilecek potansiyelde olan antimikrobiyal aktivitedeki bitkiler, sentetik antibiyotiklerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için de iyi bir alternatif olmaktadır (Canales vd. 2005; Samy ve Gopalakrishnakone, 2010).

Yapılan laboratuvar çalışmalarında bazı bakteri ve mantarların sebep olduğu enfeksiyon ve hastalıkların oluşmasını engellemek, bakteri ve mantar üremesini baskılamak ya da öldürmek için fenolik bileşiklerin etkin olduğu belirlenmiştir (Demir vd. 2019; Samy ve Gopalakrishnakone, 2010). Literatürde bitkilerle ilgili yapılan birçok çalışmada çeşitli mikroorganizmalara karşı baskılayıcı ya da öldürücü etkide oldukları tespit edilmiştir (Larçin vd. 2015). Hatta bazı bitkilerin, ticari olarak kullanılan antibiyotiklere yakın aktivite gösterdikleri gözlenmiştir (Baldemir vd. 2015). Sentetik antimikrobiyallerden farklı olarak bitkilerde bulunan antimikrobiyal bileşenler; ard arda gerçekleşen metabolik reaksiyonlarla mikroorganizmaları baskılamaktadırlar (Joubert ve Gelderblom, 2016; Rempe vd. 2017). Bitkilerin fitokimyasal yapılarında bulunan çeşitli organik asitler; ortamın ve hücre içinin pH'ını düşürerek ya da mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürmek için gerekli

olan bazı metallerle şelat oluşturarak antimikrobiyal aktivitelerini ortaya koymaktadılar. Klorojenik asit, kuarsetin, apigenin gibi farklı türlerdeki fenolik bileşikler, mikroorganizmalara karşı farklı antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Bu farklılık, fenolik bileşiklerin kimyasal yapılarından kaynaklanmaktadır (Li vd. 2014; Rempe vd. 2017; Wu vd. 2013).

3. LİTERATÜR ÖZETİ

Geana vd. (2023), *Picea abies* L., H. Karst. ve *Abies alba* Mill. türlerinin kabuk ve iğne yapraklarından %30, %50, %80 metanol ve %50 etanol çözücüleri ile mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini (MEY) kullanarak elde ettikleri ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Toplam polifenolik ve flavonoid bileşiğin DPPH analizi ile antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Toplam polifenolik bileşiklerin içeriği bakımından ortalama değerler olarak; *P. abies* kabuğu için 105,83 mg GAE/g ve iğne yaprakları için 77,03 mg GAE/g; *A. alba* kabuğu için 30,21 mg GAE/g ve iğne yapraklar için 58,00 mg GAE/g değerlerini elde etmişlerdir. Toplam flavonoid içeriği bakımından ortalama değerler olarak; *P. abies* kabuğu için 9,91 mg Q/g ve iğne yapraklar için 8,94 mg Q/g; *A. alba* kabuğu için 2,01 mg Q/g ve iğne yapraklar için 3,17 mg Q/g değerleri elde edilmiştir. Antioksidan aktivite için gerçekleştirilen DPPH analiz sonuçlarına göre, ortalama değerler olarak *P. abies* kabuğu ekstraktları 318,59 mol trolox/g ve iğne yaprak ekstraktları 316,12 mol trolox/g; *A. alba* kabuğu ekstraktları 135,77 mol trolox/g iğne yaprak ekstraktları 265,91 mol trolox/g değerlerini vermiştir. Toplam polifenolik ve flavonoid sonuçlarına göre *P. abies, A. alba*'ya göre daha yüksek sonuçlar vermiş ancak DPPH sonuçlarına göre *A. alba*'nın daha düşük trolox değeri verdiği için daha yüksek antioksidan aktivitede olduğu görülmüştür. Ekstraktlarda elde edilen başlıca polifenoller; (+)-kateşin, epikateşin, rutin, mirisetin, 4 hidroksibenzoik, p-kumarik asitler, kaempherol ve apigenin olmuştur (yaklaşık 100 µg/g miktarlarında). Ayrıca, antioksidan, anti-kanserojenik, anti-enflamatuar, antimikrobiyal ve antihemolitik potansiyele sahip çok sayıda fenolik asit, flavonoid, terpen, stilben, lignan ve sekoiridoit tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite sonuçlara göre *Abies alba* iğne yapraklarından elde edilen ekstraktların etkin olduğu görülmüştür.

Konovalova vd. (2023), *Quercus rubra* L.'nın Ağustos ayında toplanan yaprak ve tek yıllık sürgünleri gölgede hava kurusu hale gelene kadar bekletmişler ve sonrasında öğütmüşlerdir. Elde ettikleri numunenin flavonoidlerini, fenolik asitlerini,

hidrosisinnamik asitlerini araştırmışlar ve kantitatif içeriğinin belirlenmesi için HPLC analizi gerçekleştirmişlerdir. HPLC sonucuna göre *Q. rubra*'nın yaprak ve sürgünlerinde 18 polifenolik bileşik tanımlanmıştır. Bunlar içerisinde en yüksek değerleri verenler; 323,43 mg/100g rutin, 139,62 mg/100g klorojenik asit, 74,64 mg/100g sinapik asit bileşenleri olmuştur. Araştırmacılar elde ettikleri sonuca göre *Q. rubra*'nın farmakolojik ve fitokimyasal açıdan gelecek vaat ettiğini belirtmişlerdir.

Nisca vd. (2023), *Quercus petreaea* Matt. ve *Quercus pubescens* Willd türlerinin ormancılık yan ürünü olarak ormanda bırakılan kabuk ve yapraklarından su, %70'lik etanol su karışımı çözücüleri ile mikrodalga destekli ekstraksiyon (MEY) ve ultrason destekli ekstraksiyon (UEY) yöntemlerini kullanarak ekstrakt elde etmişlerdir. Bu çalışma ile kullanılan meşe türlerinden elde edilen ekstraktların fitokimyasal profili ve potansiyel biyolojik aktiviteleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ekstraktların toplam polifenolik ve tanen içerikleri araştırılmış ve MEY ile elde edilen ekstraktların UEY yöntemiyle elde edilen ekstraktlara göre daha yüksek polifenolik bileşik ve tanen içeriği verdiği görülmüştür. DPPH ve ABTS analizleri ile antioksidan aktiviteleri incelenmiş ve *Q. petraea* ekstraktlarının serbest radikalleri süpürme bakımından etkin olduğu belirlenmişir. Ekstraktların, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Candida albicans, Candida krusei* ve *Candida parapsilosis* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. *Q. petraea* ekstraktının gram pozitif bakterilere ve *K. pneumoniae*'ye karşı etkili antibakteriyel etkiye, *C. krusei*'ye ise etkin bir antifungal aktivitede olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ekstraktların asetilkolinesteraz, glukozidaz ve tirozinaz enzimlerine karşı aktiviteleri incelenmiş ve tüm enzimlerin inhibe edilmesi ekstraktların, nöroprotektif, antidiyabetik ve cilt koruyucu ajanlar olarak potansiyel kullanımının münkün olduğu sonucunu ortaya koymuştur.

Varfalvyova vd. (2023), yaptıkları çalışmada ladin, sarıçam, meşe, karaağaç ve kanolanın yapraklarından ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile şeker bazlı 21 farklı doğal derin ötektik çözücü kullanarak ekstraktsiyon yöntemini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada elde edilen ekstraktların karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi için optimum koşulları, %30 su içeren kolin klorür ve rafinozun 1:1 molar oranında karıştırılmasıyla oluşturulan NADES, 25°C

ekstraksiyon sıcaklığı ve 30 dakika süre ile ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi olarak belirlemişlerdir. Elde edilen ekstraktlarda; kafeik asit, picceatannol, resveratrol, apigenin, 4-kumarik asit, 2-kumarik asit, quercetin, ısohamnetin, ferulic asit, myricetin ve naringenin fenolik bileşenleri araştırılmıştır. Optimum ekstraksiyon koşulları ile meşe yapraklarından elde edilen ekstraktda kafeik asit 468 µg g^{-1}, syringik asit 710 µg g^{-1}, 4-kumarik asit 2422 µg g^{-1}, 3-kumarik asit 245 µg g^{-1}, rutin 1120 µg g^{-1}, 2-kumarik asit 5054 µg g^{-1}, mirisetin 3730 µg g^{-1}, resveratrol 10.020 µg g^{-1}, kuarsetin 617 µg g^{-1}, kaempferol 716 µg g^{-1} ve isohamnetin 274 µg g^{-1} değerlerinde belirlenmiştir.

Wang vd. (2023), yaptıkları çalışmada *Ribes mandshuricum* bitkisinin yapraklarından farklı molar oranlarında karıştırılarak elde edilen DÖÇ'ler ile mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini kullanarak ekstraktlar elde etmişlerdir. Elde edilen ekstraktların içeriğinde yedi önemli flavonoid olan rutin, hyperoside, isoquercetin, trifolin, astragalin, quercetin ve kaempferol bileşenlerini araştırmışlardır. Çalışmada ekstraksiyon için optimum şartlar; 54°C sıcaklık, 1:2 oranında kolin klorür ve laktik asit karışımında %25 su içeriği olan çözücü, 27 ml/g sıvı katı oranı ve 10 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Optimum şartları oluşturan ekstraktda 4,78 mg/g trifolin; 2,57 mg/g isoquercetin; 1,25 mg/g rutin; 1,15 mg/g astragalin; 0,34 mg/g quercetin; 0,32 mg/g hyperoside; 0,093 mg/g kaempferol flavanoidleri elde edilmiştir.

Macovei vd. (2023), göknar ve sarıçam ağaçlarının kabuklarından saf su kullanılarak oda sıcaklığında karıştırma yöntemiyle elde ettikleri ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlardır. Antioksidan aktivitelerini belirlemek için gerçekleştirdikleri DPPH analizi ile göknar ve sarıçam kabuk ekstraktlarında EC_{50} değerlerini sırasıyla 351,7 µg/ml ve 336,7 µg/ml; ABTS analizi ile göknar ve sarıçam kabuk ekstraktlarında EC_{50} değerlerini sırasıyla 98,6 µg/ml ve 37,8 µg/ml olarak elde etmişlerdir. Antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için mikrodistilasyon yöntemini beş farklı bakteri üzerinde gerçekleştirmişlerdir. Göknardan elde edilen ekstraktlar beş bakteride 18,75-75,00 µg/ml aralığında MIC değerleri vermiştir. Sarıçamdan elde edilen ekstraktlar ise üç bakteride 75,00 µg/ml MIC değerini vererek antibakteriyel aktivitesini göstermiştir.

Liu ve Li (2023), yaptıkları çalışmada 20 farklı derin ötektik çözücü ve dört organik çözücü kullanarak mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile *Angelica dahurica* bitkisinden ekstraktlar elde etmişlerdir. Elde edilen ekstraktlarda önemli kumarinlerden olan bergapten, oxypeucedanin, imperatorin, cnidilin ve isoimperatorin bileşiklerini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan derin ötektik çözücülerin molar, su karışım ve katı-sıvı oranları farklılıkları karşılaştırılarak kumarin ölçümleri gerçekleştirilmiş ve sonuçları arasındaki fark tartışılmıştır. Buna göre HBA:HBD, 1:1 oranında en yüksek içeriği vermiştir. Döç'lere su karışımında ise %10 su karışımı en yüksek sonucu vermiş ve sonrasındaki oranlar genel olarak sabit verimde ilerlemiştir. Katı-sıvı oranı 20 mg/ml olduğunda en yüksek verimi elde etmişlerdir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde ise sıcaklık, güç ve ekstraksiyon süresine göre karşılaştırmalar gerçekleştirmişlerdir. Kumarinlerin verimi en yüksek 40°C'de elde edilmiş ve sıcaklık arttıkça verimin düştüğü gözlemlenmiştir. Mikrodalga gücü 140 W'da en yüksek kumarin verimi sağlamış ve güç arttıkça verim düşmüştür. Ekstraksiyon süresinde ise 45 dakikaya kadar artmış, ancak 45 dakikadan sonra verim düşmüştür.

Park vd. (2022), çevre dostu çözücüler olarak bilinen derin ötektik çözücüleri (DÖÇ'ler) kullanarak gerçekleştirilen soxhlet ekstraksiyonu ile *Pinus densiflora* (Kızılçam) odunundaki lignin içeriğini araştırmışlardır. Çalışmada kolin kloür:laktik asit; betain:laktik asit ve K_2CO_3:gliserol olmak üzere üç tip DÖÇ kullanılmış ve işlem sıcaklığının (100, 110 ve 130°C) ve süresinin (6, 12 ve 24 saat) lignin verimi ve özellikleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. DÖÇ tipine göre en yüksek lignin verimini %29 ile kolin klorür/laktik asit göstermiştir. Her DÖÇ için, DÖÇ-lignin verimi reaksiyon sıcaklığı ve süresi ile artış göstermiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda ve daha uzun reaksiyon sürelerinde, lignin parçalarının yeniden yoğunlaşmasına atfedilen yüksek moleküler ağırlıklı lignin üretilmiştir. Ayrıca, metoksil ve hidroksil grubu içerikleri artan reaksiyon sıcaklığı ve süresi ile azalmıştır. Termal stabilite çalışmaları, DÖÇ-ligninin artan moleküler ağırlığının termal direncini artırdığını ortaya koymuştur.

Ştefanescu vd. (2022), yaşlı *Quercus robur* (Meşe) kabuğundan mikrodalga destekli ekstraksiyon (MEY) ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi (UEY) kullanarak sulu

ve hidroalkolik ekstraktlar elde etmişlerdir. Toplam polifenol içeriğinin (TPC) ve toplam tanen içeriğinin (TTC) ölçülmesinin ardından, kabuk özütleri antioksidan, antimikrobiyal ve enzim inhibitör aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. UEY'ne göre MEY ile elde edilen özütlerin daha yüksek toplam polifenol içeriğinde olduğu görülmüştür. Meşe kabuğunun, MEY kullanılarak elde edilen hidroetanolik ekstraktının en yüksek TPC değerini (347,74 mg/g) verdiği elde edilmiştir. Yapılan enzim inhibitör aktiviteleri arasında, ekstraktlar 3,88 µg/mL IC_{50}'ye karşılık gelen en yüksek aktiviteyi göstermiştir. Kullanılan bakteriler için MBC değerleri 0,3-5 mg/mL (*S. aureus*) aralığında ve MEY kullanılarak elde edilen meşe kabuğu özütü *C. krusei*'ye karşı iyi aktivite göstermiştir (MIC-2,5 mg/mL). Tüm bu sonuçlara göre araştırmacılar, yaşlı meşe kabuğunun yüksek antioksidan, antimikrobiyal ve antidiyabetik aktivitede olduğu sonucuna varmışlardır.

Fernandes vd. (2021), *Pinus pinaster* Ait. talaşından lignin ekstraksiyonu için yeni asidik derin ötektik çözücüler (DÖÇ'ler) hazırlamış, karakterize etmiş ve taramışlardır. Çalışmada DÖÇ olarak; ChCl:Asetik asit, ChCl:Glikolik asit, ChCl:Propiyonik asit, ChCl:Laktik asit, ChCl:Tartarik asit, ChCl:Sitrik asit, Betaine:Laktik asit, Urea:Propiyonik asit, ChCl:Laktik asit:Tartarik asit ve ChCl:Glikolik asit:Sitrik asit çözücüleri kullanılmıştır. Sonuçlara göre, 1:4:1 molar oranında kolin klorür, laktik asit ve tartarik asitten oluşan ve ChCl:Lakt:Tart olarak adlandırılan yeni bir DÖÇ kullanılarak 175°C'de 1 saatlik bir ekstraksiyon işleminin, çam biyokütlesinde bulunan toplam ligninin ağırlıkça %95'inin ağırlıkça %89 saflıkta geri kazanılmasını sağladığı görülmüştür. Araştırmacılar, "Yeşil" bir çözücü sistemi kullanılarak kayda değer saflıkta ligninin bu kadar üstün bir şekilde ekstraksiyonu, bu süreci gelecekteki büyük ölçekli uygulamalar için oldukça cazip hale getirebileceği sonucuna varmışlardır.

Kwon vd. (2021), *Quercus mongolica* biyokütlesini derin ötektik çözücülerle (DÖÇ) ön işleme tabi tutulmuş ve mekanik defibrilasyon kullanılarak lignoselüloz nanofibrilleri (LCNF'leri) elde etmişlerdir. Çalışmada, kolin klorür:laktik asit (CC:LA), kolin klorür:üre (CC:U) ve kolin klorür:gliserin (CC:GLY) olmak üzere üç farklı DÖÇ kullanılmış ve ön işlem koşullarının ahşap numunenin kimyasal bileşimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kolin klorür:laktik asit ön işlemi yüksek lignin ve hemiselüloz ayrımına neden olmuştur. Kolin klorür:üre ve kolin klorür:gliserin ön

işlemleri ise lifin defibrilasyona duyarlılığını artırmıştır. Sıcaklığın önemli etkisiyle, ön işlemden sonraki aşama mekanik defibrilasyon üzerinde sıcaklığın etkisi incelenmiş ve her üç DÖÇ için de, 1:2 mol oranı, 140°C ve 6 saatlik süre ön işlem koşulu LCNF hazırlanması için en uygun koşullar olarak belirlenmiştir. Çapı 10 nm'den küçük olan, selüloz I kristal yapısı ve yaklaşık %60'lık kristalliğe sahip LCNF'ler elde edilmiştir. CC/GLY ve CC/U ön işlemlerinden elde edilen LCNF'ler yüksek gerilme mukavemeti yaklaşık olarak 73 MPa, elastik modül yaklaşık 1500 MPa ve yüksek termal kararlılık Tmax yaklaşık 361°C değerlerini vermiştir. Ayrıca araştırmacılar, CC/LA ön işlemi ile yüksek miktarda rejenere lignin de karakterize etmişlerdir.

Ming-Zhu vd. (2020), *Morus alba* L. yapraklarının, 12 farklı derin ötektik çözücüler (DÖÇ) ile mikrodalga destekli ekstraksiyon (MEY), ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi (UEY) ve sıcak geri akış yöntemlerini kullanarak fenolik bileşikleri elde etmişlerdir. Mikrodalga destekli derin ötektik çözücüler ekstraksiyonu (DÖÇ-MEY) 1:20 katı:sıvı oranında, 60°C sıcaklıkta 600 W güçte gerçekleştirilmiştir. Box-Behnken (BBD) deneyleri ile yapılan optimizasyon sonuçlarına göre hedef fenolik bileşiklerin toplam ekstraksiyon verimi, 1:20 mL/g katı:sıvı oranı ile mikrodalga sıcaklığı 66°C sıcaklıkta 18 dakika boyunca gerçekleşen ekstraksiyon için 8,352 mg/g'a ulaşmıştır. Elde edilen ekstraktların HPLC ile belirlenen fenolik bileşenleri; neoklorojenik asit, klorojenik asit, kriptoklorojenik asit, kafeik asit, rutin, izokuersitrin ve astrgalin olmuştur. Araştırmacılar çalışmanın sonucunda, ekstraksiyon kinetik modelleri mikrodalga destekli ekstraksiyonun, ultrason destekli ekstraksiyon ve ısı geri akışlı ekstraksiyondan daha verimli bir ekstraksiyon tekniği olduğu ve ekstraksiyon sonrası geri kazanılan DÖÇ'in yeniden ekstraksiyon uygulamak üzere iyi bir çözücü olduğunu öne sürmüşlerdir.

Nisca vd. (2022), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MEY) kullanarak *Quercus cerris* L. kabuğundan elde ettikleri ekstraktların fitokimyasal özelliklerini ve potansiyel biyolojik aktivitelerini araştırmışlardır. Sulu ve hidroalkolik ekstraksiyonlar gerçekleştirilmiştir. 850 W'da 30 dakika sulu ve 650 W'da 18 dakika hidroalkolik ekstraktlar için farklı optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Toplam polifenolik ve tanen içerik sonuçlarına göre hidroalkolik kabuk ekstraktında sulu

kabuk ekstraktına göre daha yüksek bir toplam polifenol verimi gözlenmiştir (403,73±7,35 mg gallik asit eş değeri/g kurutulmuş ağırlık); ancak sulu ekstrakta kıyasla daha düşük tanen elde edilmiştir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için gerçekleştirilen iki serbest radikal süpürme yöntemi olan DPPH ve ABTS yöntemlerinin sonuçlarına göre, her iki ekstrakt da yüksek antioksidan aktiviteler sergilemiş ancak sulu ekstraktların DPPH radikaline karşı daha güçlü bir inhibitör etkide olduğu belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite için gerçekleştirilen mikrodilüsyon testine göre sulu ekstraktlara göre hidroalkoloik ekstraktlar daha yüksek aktivite göstermiştir. Ayrıca, ekstraktlar test edilen bakteri suşlarına karşı, özellikle Gram-pozitif suşlara ve *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı yüksek antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Araştırmacılar, MEY'in, *Quercus cerris* kabuğundan potansiyel biyolojik etkilere sahip fitokimyasal bileşiklerin ekstrakte edilmesi için etkili bir yöntem olduğu sonucuna varmıştır.

Kwon vd. (2020), derin ötektik çözücülerin *Pinus densiflora*'un diri ve öz odununun kimyasal bileşimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada hidrojen bağ alıcı olarak kolin klorür (ChCl) ve hidrojen bağı donörü (HBD) olarak laktik asit (LA) ve gliserini (GLY) 1:2, 1:6 ve 1:10 molar oranlarında hazırlamışlardır. 100°C sıcaklıkta 1:20 oranında katı:çözücü karışımıyla gerçekleştirilen işlem 2, 4 ve 6 saat sürelerle gerçekleştirilmiştir. İşlemden sonra katı kalıntı verimi, HBD derişimi ve işlem süresindeki artışla azalmıştır. Katı kalıntı miktarı gliserinli DÖÇ'de laktik asitli DÖÇ'e göre daha yüksek çıkmış ve her iki DÖÇ uygulaması sırasında diri odundaki kalıntının öz oduna göre daha yüksek çıktığı görülmüştür. Numunelerin lignin içeriğinde önemli bir değişiklik olmamış, her biri işlem görmüş ürünün kütlesine göre ağırlıkça %24,7 ile %29,5 olarak elde edilmiştir. Katı kalıntı verimine benzer şekilde, işlenmiş üründeki selüloz ve hemiselüloz içeriği HBD derişimi ve işlem süresindeki artışla azalmış ve diri odunda öz odundan daha yüksek çıkmıştır. Selüloz kristalliği artan işlem süresiyle birlikte hafif bir artış göstermiş, ancak farklı molar oranların kullanıldığı işlemler arasında ve diri odun ile öz odun arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Wu vd. (2021), *Cunninghamia lanceolata* bitkisinden, yüksek saflıkta ve antioksidatif lignin elde etmek için kolin klorür:laktik asit (ChCl:Lac) çözücüsünü uygulamışlardır.

Lignin örnekleri Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrumları kullanılarak karakterize edilmiştir. DÖÇ-Lignin'in potansiyel uygulamasını daha fazla belirlemek için antioksidan aktivite radikal süpürme yeteneği ile değerlendirilmiştir. 120°C de 1:10 molar oranında 12 saat süre ile optimum koşullar altında DÖÇ-Lignin veriminin %81,73 olduğu belirlenmiştir. DÖÇ-Lignin'nin düşük moleküler ağırlığa (Mw 1967 g/mol) ve ligninin moleküler ağırlığından (%92,17) %94,18 daha yüksek saflığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, DÖÇ-Lignin'in serbest radikalleri temizleme performansı iyi olduğu için araştırmacılar tarafından gıda ve kozmetik için koruyucu olarak kullanılabilecek potansiyelde olduğu belirtilmiştir.

Sanchez-Gutierrez vd. (2022), *Quercus ilex*'in öğütülmüş ve toz haline getirilmiş yapraklarından elde ettikleri özütlerin biyoaktivitesini araştırmak için toplam fenolik içeriğini, antioksidan aktivitesini ve antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Toz haline getirilmiş *Q. ilex* yapraklarının toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite bakımından daha etkin olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bileşenlerin bağırsak emilimlerinin üzerine yapılan araştırmaya göre ise toz halindeki yaprakların yüksek oranda %34,23 bileşen içeriği vermiş olmasına rağmen; öğütülmüş yapraklardaki bileşenlerin ise %55,27 oranında emilim gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Yersinia enterocolitica* ve *Listeria monocytogenes* mikroorganizmalarına karşı gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite sonucuna göre, 1 ile 5 mg/mL aralığında minimum inhibitör deerişimini veren toz haline getirilmiş *Q. ilex* yapraklarının etkin olduğu belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilenlere göre araştırmacılar, *Q. ilex* yapraklarından elde edilen özütlerin fenolik bileşiklerce karmaşık ve yoğun olması sebebiyle antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerindeki yüksek verim, bu bileşenlerin gıda katkı maddelerinde değerlendirilebileceği sonucuna varmışlardır.

Tanase vd. (2022), yaptıkları bir çalışmada *Quercus rubra* L.'nın kabuğundan su ve etanol çözücülerini kullanarak ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi (UEY) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi (MEY) kullanarak ekstraktlar elde etmişlerdir. Elde edilen ekstraktların; toplam fenolik ve tanen içeriklerini, DPPH ve ABTS analizleri ile antioksidan aktivitesini, beş bakteri ile üç mantar üzerinde

antimikrobiyal aktivitelerini ve enzim inhibitör özelliklerini araştırmışlardır. Sonuçlara göre MEY ile elde edilen ekstraktların fenolik içeriğinin daha yüksek olduğu, UEY ile elde edilen ekstraktlarda ise tanen içeriğinin fazla olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen tüm ekstraktların antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite bakımından MEY ile elde edilen ekstraktların, özellikle *Staphylococcus aureus, Candida parapsilopsis* ve *Candida krusei*'ye karşı etkin olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre meşe ağacı kabuğunun antioksidan ve antimikrobiyal aktivite bakımından etkin olmasını sağlayan zengin biyoaktif bileşenlere sahip olduğu görülmüştür.

Benouchenne vd. (2021) *Abies numidica* yapraklarından elde edilen n-bütanol ekstraktının kimyasal bileşimini, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analiz sonuçları ile ekstraktda bulunan başlıca bileşiklerin hiperosid (399,91 µg/g), astragalin (147,22 µg/g) ve rutin (102,62 µg/g) olduğunu tespit etmişlerdir. Elde edilen ekstraktda toplam fenolik ve flavonoid miktarı yüksek bulunmuştur. Toplam fenolik madde miktarı 381,15±22,70µg GAE/ml ve toplam flavonoid madde miktarı 49,79±2,81 µg QE/mL olarak belirlenmiştir. Antioksidan aktivite için yapılan DPPH ve ABTS analizlerinde sırasıyla en düşük 5,28±0,26 µg/mL ve 3,48±0,02 µg/mL IC_{50} değerlerini vererek yüksek antioksidan aktivite ve CUPRAC analizi ile 5,79±0,33 µg/mL düşük IC_{50} değeri verdiği için düşük antioksidan aktivite göstermiştir. Antimikrobiyal aktivite bakımından *Proteus vulgaris*'e karşı 17,5±0,70 mm değerini vererek potansiyel bir inhibitör zon göstermiştir. Araştırmacılar, *A. numidica* yapraklarının antioksidan ve antimikrobiyal aktivite bakımından aktif olduğu ve enfeksiyon hastalıklarını önlemek için yararlı olduğunu belirtmişlerdir.

Demirci vd. (2020) *Cedrus libani* A. Rich ve *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe'nın nisan, temmuz ve eylül aylarında topladıkları iğne yaprak ve kozalaklarından uçucu yağ elde etmişlerdir. Elde ettikleri uçucu yağların bileşenlerini GC-MS analizi, flavonoid içeriğini HPLC analizi ve antimikrobiyal aktivitesini disk difüzyon yöntemiyle belirlemişlerdir. *C. libani* ve *P. nigra*'da α-pinene, β-pinene, limonene, β-caryophyllene, germacrene-D, myrecene ve α-terpineol bileşenlerini tespit etmişlerdir. Flavonoid içeriği olarak; quercetin, rutin, naringin, resveratrol ve

kaempferol bileşenlerine rastlanmıştır. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarına göre, nisan ayında toplanan *C. libani* örneklerinin antimikrobiyal aktivitesinin, *P. nigra*'nın ise eylül ayında toplanan örneklerinin antimikrobiyal aktivite bakımından daha etkin olduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada *Quercus infectoria* bitkisinden elde edilen alkol ekstraktının antioksidan, sitotoksik ve antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Gerçekleştirilen DPPH testi ile ekstraktın antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. *Staphylococcus aureus, Candida albicans* ve *Escherichia coli* mikroorganizmalarına karşı gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite sonucuna göre ekstraktın *C. albicans*'a karşı daha etkin olduğu belirlenmiştir. Daha sonrasında bunu sırasıyla *S. aureus* ve *E. coli* mikroorganizmalarının etkinlikleri izlemiştir. Çalışmaya göre araştırmacılar, *Q. infectoria* bitkisinin etkili sitotoksik ajan olarak değerlendirilebileceği sonucuna varmıştır (Sharba vd. 2020).

Garcia-Villalba vd. (2017), yaptıkları bir çalışmada, farklı LC-DAD-MS/MS metodolojilerini kullanarak Meksikada doğal yayılış gösteren yedi *Quercus* türünden alınan yaprak infüzyonlarının fenolik profilinin tam bir karakterizasyonunu yapmışlardır. Tanımlanan ve miktarı belirlenen ana fenolik bileşikler, hidrolize edilebilir tanenler, flavonol glikozitler, proantosiyaninler ve fenolik asitler olmuştur. Beyaz meşe türleri, baskın grup olarak hidrolize edilebilir tanenlerle en fazla toplam fenol miktarını gösterirken, kırmızı türler baskın olarak proantosiyaninleri göstermiştir. Yapılan çalışma sonucu, *Quercus* yapraklarından elde edilen çayların çeşitli fenolik bileşime sahip olduğu ve potansiyel bir doğal antioksidan kaynağı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Spigno ve Faveri (2009), yaptıkları bir çalışmada, siyah çayda bulunan fenolik maddeleri mikrodalga destekli ekstraksiyon ve geleneksel demleme yöntemi ile ekstrakte etmiştir. 210 saniyelik mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemiyle, geleneksel demleme yöntemine göre %43 daha fazla fenolik madde içeriği elde etmişlerdir.

Yaşar vd. (2017), yaptıkları çalışmada, geniş yayılış alanına sahip, makilik alanlarda boy gösteren Kermes meşesi (*Quercus coccifera L.*) odununun fenolik ekstraktiflerini incelemişlerdir. Ispartadan toplanan bitki materyali soxhlet cihazında metanol ile ekstrakte edilmiştir. Numunelerde fenolik ekstraktiflerin kalitatif ve kantitatif analizini yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazında gerçekleştirmişlerdir. Kermes meşesinin odununda sırasıyla kateşini (0,69 mg/g), klorojenik asiti (0,29 mg/g) ve epikateşini (0,28 mg/g) en yüksek değerdeki fenolik maddeler olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak Yaşar ve arkadaşları, bitkiye ait odun materyalinin ticari antioksidan üretiminde hammadde olarak kullanılabilecek düzeyde olduğunu göstermişlerdir.

Gönültaş ve Uçar (2017), yapmış oldukları çalışmada, orman işletmelerinde kesim sonrası ortaya çıkan doğu ladini (*Picea orientalis*) kabukları ve ahşap levha endüstrisinde levha üretimi sonrası ortaya çıkan endüstriyel atık meşe (Quercus spp.) kabuklarının kimyasal bileşimlerini temel odun analizleri ve fenolik bileşik analiz metotlarıyla incelemişlerdir. Sıcak su çözünürlüğünün ladin örneklerinde meşeye göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Toplam fenol tayini ve bütanol HCl yöntemi sonuçlarına göre Artvin ladin kabuğu en yüksek değerleri vermiştir. Ladin ve meşe kabuğu örneklerinde hidrolize tanenler olan gallo taneni tespit etmişlerken ellag taneni içeriğini belirleyememişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, *Vernonia cinerea* yapraklarının sulu etanol çözücüsü kullanılarak mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktının toplam fenol, flavonoid madde miktarıı, antioksidan aktivitesi, LC-MS analizi ile fenolik bileşenleri incelenmiştir. *V. Cinerea* yapraklarından elde edilen ekstraktın en yüksek verimi %60'lık derişimdeki etanol 1:20 g/ml (numune/çözücü) oranı ile 2 saatlik ekstraksiyon süresiyle elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *V. cinerea* yapraklarından elde edilen ekstraktın potansiyel olarak doğal antioksidan özellikte olduğunu tespit etmişlerdir (Alara vd. 2018).

Alara vd. (2019), yaptıkları çalışmada *Vernonia amigdalina*'nın yaprağından etanol çözücüsünü kullanarak Soxhlet ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak biyoaktif bileşenlerini incelemişlerdir. GC-MS analiz sonucuna göre

MEY ile elde edilen ekstraktda soxhlet yöntemiyle elde edilen ekstrakta göre daha fazla fitokimyasal içeriğin bulunduğunu tespit etmişlerdir. 10 dakika süren mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemiyle, 480 dakikalık soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen verim ve toplam fenolik madde içeriğinden, daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle, *V. amigdalina*'nın yaprağından elde edilen numunedeki antioksidan aktivitelerinin tespiti, toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin zengin olmasından dolayı yöntem olarak mikrodalga destekli ekstraksiyon'nun tercih edilebilirliği sonucuna varmışlardır.

Uçar vd. (2011), yaptıkları çalışmada, belirlenen 4 göknar türünden (*Abies nordmanniana, A. bornmülleriana, A. equi-trojani ve A. cilicica*) hidrodistilasyon yöntemiyle esansiyal yağ elde etmişlerdir. Çözücü ekstraksiyonu 40-60°C de çözücü olarak da petrol eteri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen esansiyal yağlara GC-MS ve GC-FID analizleri yapılarak içeriğindeki etkin çözücüler belirlenmiştir. Türler içerisinde başlıca α-pinene, β-pinene, δ-3-carene ve limonene bileşenlerini yoğunluklu olarak tespit etmişlerdir.

Boukroufa vd. (2015), yapmış oldukları çalışmada portakal kabuğundan uçucu yağ elde etmek için su destilasyonu ve mikrodalga-ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemlerini kullanmışlardır. Her iki yöntemle de verim açısından benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Fakat başka açılardan da yöntemin değerlendirilmesi yapıldığında mikrodalga-ultrasonik optimizasyon yöntemiyle; atık suların değerlendirilmesi, zaman ve enerjiden tasarruf sağlanması ve verimin yüksek olması nedeniyle mikrodalga-ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminin daha avantajlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Yue vd. (2020), *Artemisiae* bitkisi ile yaptıkları çalışmada klorojenik asit ekstraksiyonu için geleneksel çözücülere alternatif yeşil çözücü olarak doğal derin ötektik çözücülerin (NADES) kullanılabilceği sonucuna varmışlardır. Ekstraksiyon için doğal derin ötektik çözücülerin seçimine rehberlik etmek amacıyla çözücü etkisi teorisi kimyasal hesaplama yöntemi kullanılmıştır. Bunun sonucunda da en uygun çözücünün prolin-malik asit olduğu sonucuna varmışlardır.

Cajanus cajan yaprakları ile yapılan bir çalışmada, doğal derin ötektik çözücülerin (NADES'ler), ultra performanslı sıvı kromatografisi ile bitkinin yapraklarındaki fenoliklerin ekstraksiyonu ve tayini için etkili bir çözücü olduğu belirlenmiştir. Çalışma, kolin klorür ve maltozdan oluşan NADES'in, geleneksel çözücülere kıyasla hem polar hem de zayıf polar bileşikler için mükemmel ekstrakte edilebilirliğe sahip olduğunu göstermiştir. NADES ile mikrodalga destekli ekstraksiyon prosedürü için optimize edilmiş koşullar, kolin klorür/maltoz (1:2) içinde %20 su ekstraksiyon çözücüsü, ekstraksiyon sıcaklığı 60°C, sıvı/katı oranı 30:1 mL/g ve ışınlama süresi 12 dakikadır. Ayrıca çalışmada *C. cajan* yapraklarındaki 14 fenolik maddenin kapsamlı analizi için hızlı ve hassas bir UPLC yöntemi geliştirilmiştir (Wei vd. 2015).

Yapılan bir çalışmada, odunsu biyokütleden lignini yüksek verim ve yüksek saflıkla çıkarmak için derin ötektik çözücüleri (DÖÇ) kullanmanın yeni bir yöntem olduğu bildirilmiştir. Ekstrakte edilen lignin benzersiz yapısal özelliklere sahiptir ve yeni bir lignin kaynağını temsil eden eter bağlantılarından yoksundur. Çalışmada, ahşaptan ligninin DÖÇ depolimerizasyonunda yer alan mekanizma araştırılmıştır. Bu da odundan lignin ekstraksiyonunu kolaylaştırmak için hem DÖÇ katalizli eter bağı bölünmesinin hem de çözücü etkilerinin iyileştirildiğini öne sürmüştür. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, DÖÇ'lerin yüksek verimde lignin elde edilebilmesinde önemli bir katkısının olacağını göstermiştir (Alvarez-Vasco et al., 2016).

Li vd. (2017), söğüt ağacının (*Salix matsudana* cv. Zhuliu) izolasyonu için kolin klorürden (ChCl) ve üç hidrojen bağı donöründen (HBD) hazırlanan derin ötektik çözücüleri (DÖÇ) kullanarak potansiyel olarak yüksek verimde lignin ekstraksiyonun gerçekleştirilmesinde uygun metodolojiyi geliştirmeye çalışmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, lignininin izolasyonu için derin ötektik çözücülerin kullanılabileceğini savunmuşlardır. DÖÇ'lerin düşük toksisite, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve düşük maliyet gibi geleneksel çözücülere göre avantajlarının vurgulandığı çalışmada yüksek saflıkta optimum DÖÇ-lignin verimine, 1:10 molar oranında ChCl-Laktik asit, 120°C ekstraksiyon sıcaklığında ve 12 saatlik sürede ulaşılabilmişlerdir. Ekstrakte edilen söğüt lignini esas olarak siringil ve guayasil bileşenlerinden oluştuğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, söğütteki glukanın büyük bir kısmının ChCl-Laktik asit işleminden sonra korunduğunu tespit etmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, hidrojen bağı alıcısı (HBA) olarak kolin klorür (ChCl) ve hidrojen bağı donörü (HBD) bileşenleri olarak farklı şeker alkolleri ile hazırlanan doğal derin ötektik çözücülerin (NADES) sitotoksisitesinin HEK-293 insan embriyonik böbrek hücrelerine karşı değerlendirilebileceği sonucu elde edilmiştir. Çalışma sonucunda, 3,52-75,46 mM aralığında IC_{50} değerleri elde edilmiştir. Çalışmada, yapısal parametrelerin incelenen NADES'lerin molekül yapı ve biyoloik aktivitesi arasındaki ilişkisine göre sitotoksisitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için nicel yapı aktivite ilişkisi (QSAR) analizi kullanılmıştır (Ahmadi vd. 2018).

Cui vd. (2015), güvercin bezelye köklerinden üç ana aktif bileşik olan genistin, genistein ve apigenin ekstrakte edilmesi için yeni bir derin ötektik çözücü (DÖÇ) bazlı mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi (DÖÇ-MEY) geliştirmek için çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, DÖÇ-MEY için optimum koşullarını, ekstraksiyon çözücüsü olarak kolin klorür (ChCl) / 1,6-heksandiol (1:7, mol / mol) içinde %30 su ile, mikrodalga gücünü 600 W, sıvı / katı oranını 14 mL / g, sıcaklığı 80°C ve süreyi 11 dakika olarak belirlemişlerdir. DÖÇ-MEY'in diğer yöntemlere göre yüksek ekstraksiyon verim gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Sonuçlara göre, genistin, genistein ve apigenin verimlerini sırasıyla 0,449; 0,617 ve 0,221 mg/g olarak elde etmişlerdir.

Shang vd. (2018), yaptıkları çalışmada *Cyclocarya paliurus* yapraklarındaki flavonoid içeriğini ve antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Bu çalışmada optimum sistem olarak, derin ötektik çözücülerden (DÖÇ) kolin klorür (ChCl) + 1,4-bütandiol (1:5, mol/mol), su içeriğini %30, katı/sıvı oranını 20 mg/mL, sıcaklığı 60°C ve süreyi 30 dakika olarak uygulamışlardır. Sonuçlara göre, sıvı kromatografi-kütle spektrometresinde, yani kaempferol-7-O-α-L-ramnosid, kaempferol, quercetin, quercetin-3-O-β-D-glukuronid ve kaempferol-3-O-β-D glukuronitin olan flavanoidleri belirlemişlerdir.

Yao vd. (2015), mikrodalga destekli ekstraksiyon ile derin ötektik çözücüler (DÖÇ) kullanarak *Pyrola incarnata* içeriğindeki aktif fenolik bileşiklerin tespit edilebilmesi için ekstraksiyon işlemi üzerine çalışmışlardır. Çalışmada çeşitli oranlarda kolin klorür ve poliollerin karıştırılması neticesinde en uygun olarak ChCl+1,4-bütandiol (1:4) çözücüsünü belirlemişlerdir. Optimum sistem olarak ekstraksiyon koşullarını;

ChCl+1,4-Bütandiol (1:4), içerisindeki su oranı %30 olarak, sıvı/katı oranını 10 mL/g, sıcaklığını 70°C ve süresini 20 dakika olarak belirlemişlerdir. Elde edilen numunelerin analizi neticesinde elde edilen bileşenler hiperin, 2-O-galloilhiperin, quercetin, quercetin-O-rhamnoside ve chimaphilin sırasıyla, 1,627; 4,958; 0,041; 0,089 ve 0,349 mg/g değerlerini vermiştir.

Kılıç ve Ceylan (2019), yaptıkları çalışmada *Pinus sylvestris*'in derin ötektik çözücülerle (DÖÇ) ve farklı yöntemlerle ekstraksiyon işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, DÖÇ olarak kolin klorür + etilen glikol (1:2, m/m) ve kolin klorür + üre (1:2, m/m) çözücüleri belirlenmiştir. Soxhlet ekstraksiyonu ile sırasıyla n-hekzan ve aseton-su karışımı kullanılarak 5 g odun numunesi ile 6 saat boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. DÖÇ kullanılarak 0,05 g odun örneği, 60°C ve 30 dakika boyunca, ultrasonik banyo (UB) ve sıcak su banyosu olmak üzere iki farklı yöntemle ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. GC-MS ve GC-FID sonuçlarına göre numunelerdeki yağ asitleri, reçine asitleri ve stilbenler ana kimyasal bileşenler olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre, sırasıyla oleik asit (%1,4-9), linoleik asit (%1,6-8) ve levopimarik asit (%0,6-17,7) bileşiklerini tüm ekstrelerde baskın olarak tespit edilmiştir.

Wang vd. (2008), bazı Çin bitkilerinin polifenolik bileşiklerinin ve pigmentlerinin belirlenmesinde kullanılan vakumlu mikrodalga ekstraksiyonun aktivitesi üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada vakumlu mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini 5-10-15 dakika katı/sıvı oranı olarak da, 1:6; 1:8; 1:10 olarak çeşitli parametrelerde denemişler ve optimum sistemi, 15 dakika, 170°C sıcaklık olarak belirlemiş ve uygulamışlardır. Sonuç olarak safran bitkisi için, rasveratrol ve mirisetin bileşiklerinden sırasıyla %6,4-9,4 ve %7,9-29,5'lik verim elde etmişlerdir.

Cui vd. (2018), yabani iğde yapraklarıyla yapmış oldukları çalışmada, 12 çeşit derin ötektik çözücü (DÖÇ) ile beş ana flavonoidin (rutin, quercetin-3-O-glukozit, quercetin, kaempferol ve isorhamnetin) ekstrelerdeki içeriğini incelemişlerdir. Bu çalışmada optimum prosedürün belirlenebilmesi açısından ekstraksiyon koşullarını istatiksel olarak araştırmışlardır. Optimal koşullar altında analizi yapılan beş flavonoidin toplam maksimum ekstraksiyon veriminin 20,820 mg/g olduğu ve

geleneksel ekstraksiyon yöntemine göre 1,321-2,400 kat fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Bouras vd. (2015), meşe kabuklarındaki polifenol içeriğini mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte ederek çalışmışlardır. Çalışmada, numune ebatını 0,5*1*0,3 cm^3, pH'ını 10,75, çözücüsünü %33 etanol ve %0,38 metanol, çalışma gücünü 45 W ve süresini 60 dakika olarak belirleyerek optimum prosedürde mikrodalga destekli ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Numunelerdeki toplam fenolik bileşen tayinini LC-MS ile belirlemişlerdir. Analiz sonuçlarına göre diğer geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemiyle, kateşin, epikateşin, epigallokateşin, şiringik asit, p-kumarik asit, sinapik asit ve naringenin içeriğinin daha fazla olduğunu belirlemişlerdir.

Chupin vd. (2015), yaptıkları çalışmada, Güneybatı Fransa'dan getirmiş oldukları çam (*Pinus pinaster*) kabuklarını etanol-su çözeltisi ile ekstrakte etmişlerdir. Elde ettikleri her bir ekstraktif ile polifenolik içeriği, tanen içeriğini ve şeker içeriğini incelemişlerdir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun, sıcak su bazlı ekstraksiyon yöntemi ile karşılaştırması yapılmış ve partikül büyüklüğünün ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Numuneleri, FTIR, NMR ve Heteronükleer Single Correlation Spectroscopy (HSQC) reaktiviteleri ile karakterize etmişlerdir. Bu analizler sonucunda, kateşin, epikateşin, gallat, epigallokateşin ve apigallokateşin gallat elde etmişlerdir.

Ouyang vd. (2017), *Pinus elliottii* iğne yapraklarının mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde ettikleri ekstrelerinin antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesinde dört farklı değişken olarak, etanol (%50, %70 ve %90), çözücü:hammadde oranı (25:1; 20:1 ve 15:1), ekstraksiyon sıcaklığı (60°C, 70°C ve 80°C) ve ultrasonik güç (100 W, 150 W ve 200 W) proseslerini ele almışlardır. *Pinus elliottii* yapraklarının mikrodalga destekli ekstraksiyonunda denenen dört proses içerisinden optimum sistemin, %72 etanol, çözücü:hammadde oranının 21:1 mL/g, sıcaklığın 67°C ve 200 W güç ile gerçekleştirildiğinde toplam polifenol içeriğinin yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Cao vd. (2019), yaptıkları çalışmada Rattan (*Calamoideae faberii*) bitkisinin yeşil ekstraksiyon olarak bilinen derin ötektik çözücü (DÖÇ) ve Homojenat Vakum Kavitasyon (HVE) ekstraksiyon metotlarıyla muamele etmişlerdir. Çalışmada, kolin klorür (ChCl) ve etilen glikol (EG)'ün mol oranını 1:3, ChCl:EG+su oranını 6:4, HEV'nin katı ve sıvı oranını 1:15 ve HVE ekstraksiyonunun süresini 2 ve 25 dakika olarak optimum prosedüre göre belirlemişlerdir. ChCl:EG ile toplam fenolik içerik verimi 6,82 mg/g olarak belirlemişlerdir. Meyve dokularındaki en yüksek fenolik içerikler; tohumda 81,24 mg/g, episperm de 43,21 mg/g, arillus da 3,47 mg/g, yaprak kılıfında 19,5 mg/g, ve yaprakta 17,81 mg/g olarak tespit edilmiştir. Rattan bitkisinin çoğu organında en çok bulunan fenolik bileşik klorojenik asittir. Gallik asit arillusta, protokateşuik asit arillus, kılıf ve yaprakta, protokateşuik aldehit yaprak, tohum ve kılıfta, kateşinler episperm, tohum ve kılıfta, epigallokateşin gallat ise yaprakta yoğun olarak bulunmuştur.

Yadav ve Malpathak (2016), yaptıkları çalışmada, Hindistan'dan toplanmış olan *Capparis moonii* yaprak ve saplarının antioksidan aktivitesini (%), toplam fenol ve flavanoid içeriği, DPPH, Fosfomolibdenum indirgeme, FRAP, İndirgeme güç deneyi ve H_2O_2 radikal süpürme deneyini kullanarak incelemişlerdir. Bu çalışmada bitki yaprakları, hekzan, kloroform, etilasetat, metanol ve sulu çözücülerinden elde edilen ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Sulu ekstraktın antioksidan aktivite bakımından daha etkin olduğu tespit edilmiştir.

Procentese vd. (2015) tarafından yapılan çalışmada; mısır sapı üç çeşit DÖÇ çözelti (kolin klorür+gliserol (1:2), kolin klorür+üre (2:1), kolin klorür+imidazol (3:7)) kullanılarak farklı sıcaklıklarda 15 saat boyunca su banyosunda ön işleme tabi tutulmuştur. Hidroliz sonrası toplam şeker miktarı ChCl:gliserol ile 150°C sıcaklıkta gerçekleşen örneklerde 37,8 g/g, ChCl:üre ile 115 °C'de gerçekleşen örneklerde 20,9 g/g ve ChCl:imidazol ile 115°C sıcaklıkta gerçekleşen örneklerde 35,9 g/g olarak bulunmuştur. En yüksek glikoz verimi 150°C sıcaklıkta (%94,6) ChCl:imidazol ile gerçekleşen örneklerden, en yüksek ksiloz verimi ise (%95,5) aynı sıcaklıkta ChCl:gliserol ile gerçekleşen biyokütleden elde edilmiştir. Mısır sapında; ChCl:imidazol'ün (3:7 mol oranında) sıcaklık 80°C iken %40 olan delignifikasyon oranının 150°C' de %88 olduğu belirtilmiştir.

Zhang vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada; mısır koçanına farklı (90°C sıcaklık ve 24 saat süre ile) derin ötektik çözeltilerle ön işlem uygulanmıştır. Monokarboksilik asit:ChCl, Dikarboksilik asit:ChCl ve Polialkol:ChCl üç farklı şekilde oluşturulmuş ve işlenen biyokütlenin hidrolizi sonrasında elde edilen glikoz verimi değerlendirilmiştir. Monokarboksilik asit:ChCl türlerinden 1:5 oranında ki ChCl:laktik asit'in %83,5 ile en yüksek glikoz verimi verdiği tespit edilmiştir. Dikarboksilik asit:ChCl'de ise en yüksek glikoz verimi Malonik asit:ChCl (%61,5) ile bulunmuştur. 2:1 mol oranında oluşturulmuş Polialkol:ChCl çözeltileri içinde en yüksek verimin %96,4 ile Gliserol:ChCl'de gözlendiği belirtilmiştir. Ayrıca, Gliserol:ChCl'nin lignini maksimum seviyede ayrıştırdığı, katı materyalin kazanımında ve yüksek glikoz verimi elde etmekte çok etkili olduğu rapor edilmiştir.

Yapılan bir başka çalışmada; pirinç samanı, farklı DÖÇ'ler ile işlenmiştir. Kolin klorür ile birlikte malonik asit, malik asit, 1,2-propanediol, sitrik asit, tartarik asit, gliserol, etilen glikol, laktik asit, üre ve oksalik asit gibi farklı hidrojen bağ donörleri kullanılarak ötektik çözeltiler hazırlanmıştır. Pirinç samanı; farklı mol oranları kullanılarak hazırlanmış çözeltilerle; %5 ve %10 katı oranlarında, farklı sıcaklık (60-121°C) ve sürelerde (30 dakika-12 saat) ön işleme maruz bırakılmıştır. Maksimum indirgen şeker miktarının (226,7 g/L) ChCl:gliserol ile işlenmiş saman örneklerinin enzimatik hidrolizinden elde edildiği tespit edilmiş ve sakkarifikasyon verimi %87,1 olarak rapor edilmiştir (Kumar vd. 2016).

Yapılan çalışmada; ChCl:üre (1:2), ChCl:gliserol (1:2), ChCl:formik asit (1:2), ChCl:asetik asit (1:2), ChCl:oksalik asit (1:1), ChCl:malonik asit (1:1) ve ChCl:oksalik asit (1:1) kullanılarak mısır atıklarına ön işlem (130°C, 100 rpm'de 2 saat) uygulanmıştır. ChCl:formik asit ön işlemi sonunda elde edilen glikoz verimi optimizasyonla maksimize edilmeye çalışılmıştır. Optimizasyon sonunda; 3 saat boyunca uygulanmış ön işlem ile 17,0 g/L glikoz elde edilmiş ve glikoz verimi %99 olarak bulunmuştur. *Clostridium saccharobutylicum* mikroorganizması kullanıldığında; bütanol derişimini 5,63 g/L ve bütanol verimi 0,17 g/g toplam şeker olarak belirtilmiştir (Xu vd. 2016).

Çam örnekleri ile yapılan bir çalışmada; çam örnekleri üzerinde kolin klorür:formik asit (1:2), kolin klorür:laktik asit (1:10), kolin klorür:asetik asit (1:2), betaine:laktik asit(1:2) gibi farklı derin ötektik çözeltiler kullanarak ön işlem yapılmıştır. Katı/sıvı oranı 1:10 (g/g) olarak hazırlanan örneklere 155°C'de 2 saat ön işlem uygulanmıştır. kolin klorür:formik asidin en yüksek lignin çözünülebilirliğine (%14), en düşük ksilan (<%1) ve selüloz çözünülürlüğüne (<%1) neden olduğu belirlenmiştir. Çam örneklerinde ön işlem sonunda; glikoz veriminin, kolin klorür:formik asitle (%70) kolin klorür:gliserol'e göre yedi kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Lynam vd. 2017).

2017 yılında yapılan çalışmada marul yapraklarına DÖÇ çözücü olarak Kolin klorür:gliserol (1:2) ile farklı sıcaklık (80-150°C) ve sürelerde (3-16 saat) su banyosunda ön işlem uygulanmıştır ve işlenmiş örneklerden *Clostridium acetobutylicum* kullanılarak bütanol üretilmiştir. Ön işlemin 150°C de 6 saat boyunca sürdüğü koşulda glikoz verimi %94,9 ve ksiloz verimi %75 bulunmuştur. Bu koşulda elde edilen bütanol verimi 0,04 g/g, fermentasyon sonundaki bütanol derişimi ise 0,5 g/L olarak tespit edilmiştir (Procentese vd. 2017).

Chen ve Wan (2018), tarafından yapılan çalışmada; 3 farklı hammaddede (mısır koçanı, dallı darı otu (switchgrass) ve fil otu (miscanthus)) kolin klorür:laktik asit (1:2) ile mikrodalgada-DÖÇ (800 W ve 45 saniye) ön işlemi uygulanmıştır. İşlenen biyokütlenin geri kazanım oranları mısır koçanı, dallı darı otu ve fil otu için sırasıyla %36,64; 50,46 ve 53,21 olarak belirlenmiştir. Glikoz verimleri mısır koçanı, dallı darı otu ve fil otu için sırası ile %78,5, %75 ve %40 olarak hesaplanmıştır. Uygulanan ön işlemin biyokütlenin çözünürlüğünü artırdığı ifade edilmiştir.

Yapılan diğer bir çalışmada; pirinç samanı farklı mol oranlarında (1:1,1:3,1:5) hazırlanmış Kolin klorür:Laktik asit DÖÇ çözeltisiyle 90-120°C sıcaklıkta 3-6 saat süresince ön işleme tabi tutulmuştur. En ekstrem koşul olan; 1:5 mol oranında, 120°C sıcaklıkta 3 saat süreyle işlenmiş örneklerde; selüloz, ksilan ve lignin miktarları sırasıyla %59,2; 8,3 ve 11,3 olarak tespit edilmiştir. Bu işlem sonunda gerçekleştirilen enzimatik hidroliz deneylerinden elde edilen örneklerde glikoz veriminin %60-70 arasında değiştiği belirtilmiştir (Li vd. 2018).

2018 yılında yapılan bir çalışmada; palmiye ağacı yaprakları, kolin klorür:üre (1:2) ile (1:10 (w/v) katı/sıvı oranında) farklı sıcaklık (60-140°C) ve sürelerde (2-10 saat) yağ banyosunda ön işleme tabi tutulmuş ve ardından inorganik tuz ile işlenmiştir. Dört saat boyunca 120°C de uygulanan ön işlemin 14,76 g/L ksiloz verimi sağladığı belirtilmiştir (Loow vd. 2018).

Procentese vd. (2018), tarafından yapılan çalışmada; gıda endüstrisi atıkları (patates kabuğu, elma atıkları ve kahve atıkları) üzerinde iki farklı derin ötektik çözeltinin (DÖÇ) (kolin klorür:gliserol ve kolin klorür:etilen glikol) etkisi incelenmiştir. Ön işlem, farklı katı/çözelti oranlarında (1:8-1:32) ve farklı sıcaklıklarda (60-150°C) 3 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. Kolin klorür:gliserol'ün (1:32 katı/çözelti oranında) 150°C sıcaklıkta örneklerden maksimum glikoz elde etmeyi sağladığı bildirilmiştir. Patates kabuğu, elma atıkları ve kahve atıklarından elde edilen maksimum glikoz miktarları sırasıyla 0,80; 0,95 ve 0,88 g glikoz/g biyokütle olarak belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada; ayçiçeği sapında DÖÇ kolin klorür:sitrik asit (0,7:0,3), kolin kloür:tartarik asit (0,7:0,3), kolin klorür:okzalik asit (1:1) kullanılarak mikrodalgada ön işlem uygulanmıştır. Ön işlem; farklı sıcaklık (130-180°C) ve sürelerde (1-10 dakika) gerçekleştirilmiştir. Mikrodalgada kolin klorür:oksalik asit kullanıldığında, 180°C sıcaklıkta 1 dakika boyunca işlem gören örneklerde en yüksek geri kazanım verimi (%99,07) elde edilmiştir (Sert vd. 2018).

Yapılan çalışmada; ksiloz yan ürünü olan endüstriyel ksiloz kalıntılarına, kolin klorür:formik asit (1:1,5), kolin klorür:1,4-bütandiol (1:2) ve betain:laktik asit (1:2) DÖÇ kullanılarak farklı sıcaklıklarda (80, 100, 120°C) 2 saat süreyle ön işlem uygulanmıştır. Sıcaklık arttıkça örneklerdeki selüloz miktarının da arttığı belirtilmiştir. Enzimatik hidroliz sırasında elde edilen en yüksek glikoz verimine (%96,8) 120°C sıcaklıkta betain:laktik asidin uygulandığı ön işlemle erişildiği belirtilmiştir (Guo vd. 2018).

Yapılan bir diğer çalışmada; pirinç samanı üzerine farklı DÖÇ'lerin (kolin klorür:formik asit (1:2), kolin klorür:asetik asit (1:2), kolin klorür:gliserol (1:2), kolin klorür:üre (1:2), kolin klorür:formik asit:gliserol (1:1:1), kolin klorür:formik asit:üre

(1:1:1), kolin klorür:asetik asit:gliserol (1:1:1) ve kolin klorür:asetik asit:üre (1:1:1)) etkisi araştırılmıştır. Örnekler çözelti ile beraber yağ banyosunda 130°C‘ de 2 saat boyunca bekletilmiştir. Kolin klorür:formik asit:asetik asit ön işleminde en yüksek toplam şeker 42,46 g/L elde edilmiştir. *Clostridium sacccharobutylicum* kullanılarak yapılan fermentasyon sonunda bütanol verimi, 0,25g/g toplam şeker olarak bulunmuştur (Xing vd. 2018).

Vieira vd. (2018), ceviz (*Juglans regia L.*) yapraklarının fenolik bileşenlerinin tespitini yapmak için çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada ceviz yapraklarını ısı destekli ekstraksiyon ve kolin klorür+karboksilik asitler olarak belirlenen derin ötektik çözücüleri kullanarak gerçekleştirmişlerdir. En yüksek verimin görüldüğü derin ötektik çözücülerde kolin klorür yanında kullanılan bütik ya da fenilpropiyonik asitlerin olduğunu belirlemişledir. Elde edilen numuneler üzerinde yapılan HPLC analizi sonucunda başlıca neoklorojenik asit, quercetin 3-O-glukozit ve quercetin O-pentosid bileşiklerine rastlanmıştır.

Hyeusoo vd. (2013), yaptığı çalışmada, bazı çam türlerinin (*P. densiflora, P. thunbergii, P.rigida*) yapraklarından su destilasyonu yöntemiyle esansiyal yağ elde etmişlerdir. Esansiyel yağlar üzerinde GC-MS analizi yapılmış ve başlıca; α-humulene, caryophyllene, β-pinene, β-cadinene, cinnamic asit, α-terpinolene, spathulenol, α-cadinol, caryophyllene oxide ve α-pinene bileşenlerine rastlanmıştır. Esansiyel yağlar ile yapılan antimikrobiyal çalışmalar neticesinde yağların mikroorganizmalar üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Bouddah vd. (2015), yaptıkları çalışmada, balsam göknarı, kara ladin, beyaz ladin, Amerika çamı, jack çamı ve doğu beyaz ladininin yaprak ve dallarından buharlı ekstraksiyon yöntemiyle esansiyel yağ elde etmişlerdir. Esansiyal yağların GC-MS analizi sonucunda başlıca; α-pinene, β-pinene, limonene ve bornyl acetate bileşenleri tespit edilmiştir. Esansiyel yağlarla yapılan disk difüzyon, MIC testi ve MBC-MFC tstleri ile antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Antioksidan aktivitesinin tespit edilebilmesi için DPPH analizi yapılmıştır.

Subhashini vd. (2016), meşe ağacı türlerinin yaprakları üzerinde antimikrobiyal aktivitelerinin tespit edilmesi ve spektrofotometrik analizlerinin yapılması üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmada kullanılan meşe türlerinin (*Q. suber, Q. macrocarpa, Q. montana, Q. griffithii ve Q. serrata*) yaprak ve gövde örnekleri metanol çözücüsü ile soxhlet cihazında ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlarda UV-spektrofotometrik analizi yapılmış ve bütün meşe türlerinde gallik asidin yoğunlukta olduğu tespit edilmiştir. Daha sonrasında antimikrobiyal aktivite tespiti yapılması için disk difüzyon ve MIC testi uygulanmıştır. *Q. montana*'nın yaprak ve gövdesinden elde edilen ekstraktların disk difüzyon testi sonucuna göre antibakteriyel etki bakımından en yüksek zonu verdiği görülmüştür. Antifungal etki bakımından *Q. serrata* ve *Q. macrocarpa*'nın yaprak ve gövdelerinden elde edilen ekstraklarının en yüksek zonları verdiği tespit edilmiştir.

Şöhretoğlu vd. (2009), bazı *Quercus* türlerinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri üzerine çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, *Quercus macranthera* subsp. syspirensis, *Q. cerris, Q. pubescens* ve *Q. coccifera*' nın farklı ekstrelerinin antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MIC) ölçülmesi ile sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak araştırmışlardır. Antimikrobiyal aktiviteleri, iki Gram-pozitif ve iki Gram-negatif bakteri ile üç mantara karşı belirlenmişlerdir. Genel olarak, tüm ekstrelerin antifungal aktivitelerinin antibakteriyel aktivitelerinden daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir. Hemen hemen tüm ekstrelerin test edilen *Candida* suşlarına karşı aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle, *Q. coccifera*'nın n-BuOH ekstraktının *C. parapsilosis*'e karşı 4,8 µg/ml MIC değerinde önemli aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yiğit vd. (2009), yaptıkları çalışmada, Ceviz (*Juglans regia L.*) taze kabuk ve yapraklarının su ve metanol ile muamele edilen ekstrelerinin antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini klinik örneklerden izole edilen bazı *Candida* türlerine (*Candida albicans, Candida glabrata, Candida tropicalis, Candida parapsilosis, Candida krusei, Candida kefyr, Candida guilliermondii, Geotrichum candidum*); gram negatif bakterilerine (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes*) ve gram pozitif bakterilere (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis*) karşı

disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlar ve minimal inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri belirlemişlerdir. Cevizin taze kabuk ve yapraklarından elde edilen su ve metanol ekstrelerinin *S.aureus, S.epidermidis, P.aeruginosa, C.albicans, C. glabrata, C.tropicalis ve C. kefyr* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini gözlemlemişlerdir.

Çalhan ve Ülger (2018), kolin klorür içeren bazı derin ötektik çözücülerin (DÖÇ) karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi ve antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi üzerine çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, iletkenlik değerleri belirlenen dört farklı derin ötektik çözücüyü kullanmışlardır. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi ve proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile karakterizasyon işlemlerini gerçekleştirmişlerdir. Antibakteriyel aktivite tayinininde ise Resazurin mikroplak yöntemi kullanmışlardır. Tüm bu uygulanan çalışmalar neticesinde derin ötektik çözücülerin (DÖÇ) ampisiline göre daha düşük antibakteriyel aktivite gösterdiğini tespit etmişler. Ancak ilaç endüstrisinde ilgi uyandıran uygulamalar dikkate alındığında bu tarz çalışmaların daha fazla sayıda derin ötektik çözücünün fizikokimyasal, antibakteriyel ve sitotoksik özelliklerinin araştırılmasıyla genişletilebileceğini önermişlerdir.

Dağcı vd. (2002), Kahramanmaraş Atatürk Park'ındaki *Cupressus sempervirens, Cupressus arizonica (Cupressaceae), Pinus brutia, Pinus nigra (Pinaceae), Thuja orientalis (Cupressaceae*) ağaç türlerinin uçucu yağlarının antimikrobiyal aktivitelerini inceledikleri bir çalışma yapmışlardır. Belirlemiş oldukları bitkilerin antimikrobyial etkisine disk difüzyon metoduna göre *Enterobacter aerogenes CCM 2531, Mycobacterium smegmatis RUT, Bacillus megaterium DSM 32, Micrococcus luteus LA 2971, Pseudomonas fluorescens, Yersinia enterocolitica* bakterileri üzerinde bakmışlardır. Test edilen türler içerisinde en etkili antimikrobiyal aktiviteyi *Cupressus sempervirens* ve *Pinus brutia* türlerinin gösterdiğini belirlemişlerdir.

4. MATERYAL ve METOT

4.1 Materyal

Bu tez kapsamında hammadde olarak, Kastamonu Orman Bölge Müdürlüğü sınırları içerisinde endüstriyel anlamda üretimi yapılan ağaç türlerinden karaçam (*Pinus nigra*), meşe (*Quercus robur*), göknar (*Abies nordmanniana*) ve kayın (*Fagus orientalis*) türlerinin, üretim sonrasında ormanda bırakılan kesim artıkları kullanılmıştır. Belirlenen ağaç türlerinin örnekleri Kastamonu lokasyonunda 2021 yılı 1-15 Eylül tarihleri arasında temin edilmiştir. Her bir ağaç türü için ibre, yaprak ve sürgünlerinin üzerinde bulunduğu azami 5-6 cm çapa kadar olan dallar ve yıllık sürgünler araziden toplanmıştır. Toplanan dallar daha sonrasında mekanik yöntemle 1-2 mm boyutlarına bıçak ve makas yardımıyla getirilmiştir (Fotoğraf 4.1). Boyutlandırıldıktan sonra polietilen poşetlere alınan bitki örnekleri ekstraksiyon ve uçucu yağ eldesi işlemi için kullanım zamanına kadar Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan -20°C soğuk hava deposunda muhafaza edilmiştir.



Fotoğraf 4.1. a) Karaçam, b) Meşe, c) Göknar, d) Kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünleri

Tez çalışmasında ekstraksiyon ve uçucu yağ eldesi işlemini gerçekleştirmek için çözücü olarak 9 farklı kimyasal kullanılmıştır. Çözücülerden dört tanesi çevre dostu çözücü olarak bilinen derin ötektik çözücülerden (DÖÇ) ve beş tanesi de geleneksel kullanılan organik çözücülerden oluşmaktadır. Ekstraksiyon ve uçucu yağ eldesinde; kolin klorür, 1,4-bütanediol, 1,4-cyclohexanediol, maltoz, etilen glikol, %96'lık etanol, %95'lık hekzan, %96'lık aseton (Sigma Aldrich), %96'lık metanol (Riedel-de Haen), ve saf su (Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi kimya laboratuvarı saf su cihazı) çözücüleri kullanılmıştır.

Ekstraksiyon ve uçucu yağ eldesi işleminde kullanılacak bitki örnekleri hassas terazi ile tartılıp cam balona alınmış ve kullanılacak miktardaki çözücü beher de ölçülerek cam balona ilave edilmiştir. Ekstraksiyon ve uçucu yağ eldesi işlemi Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi, Mantar ve Tıbbi Bitkiler Araştırma ve Üretim Laboratuvarında bulunan ETHOS X marka Mikrodalga Ekstraksiyon Sistemi cihazında gerçekleştirilmiştir (Fotoğraf 4.1). Elde edilen uçucu yağlar ve filtre kağıdından süzülmüş olan ekstraktlar amber şişelere doldurulmuş ve sonrasında aynı laboratuvarda bulunan -18°C derin dondurucuya yerleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktların katı madde miktarının hesaplanması aşamasında kurutma işleminin gerçekleştirilmesi için ekstraktlardan örnek koymak için 2 ml'lik eppendorf tüpler ve Elektromag marka etüv cihazı kullanılmıştır.



Fotoğraf 4.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı

Tez kapsamında çalışılan bitki örneklerinin ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile farklı muamele görmüş ekstraksiyon sonrası ultramikroskopik yapıları FEI marka Quanta FEG 250 model SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) cihazı ile Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde görüntülenmiştir.

Elde edilen ekstrakt ve uçucu yağların; toplam fenolik madde tayini, toplam flavonoid madde tayini, toplam antosiyanin madde tayini ve antioksidan aktivite tayinleri

(DPPH, ABTS ve CUPRAC) Harran Üniversitesi Gıda Mühendisliği laboratuvarında bulunan SHIMADZU UV-1280 UV-VIS cihazında gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin uçucu bileşenlerinin belirlenmesi için GC-MS/SPME analizi Agilent marka 7890B model GC, 7010B model MS sistemi ile Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında (ÇÜMERLAB) gerçekleştirilmiştir. Ekstraktların şeker ve organik asit bileşenlerinin belirlenmesi, için HPLC Agilent 1260 İnfinity model cihaz ile Iğdır Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ALUM) gerçekleştirilmiştir.

Antimikrobiyal çalışmalar Bingöl Üniversitesi Genç Meslek Yüksekokulu Ormancılık Bölümü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

4.2 Metot

4.2.1 Ekstraksiyon

Tez çalışmasında çevre dostu ve modern çözücüler olarak bilinen derin ötektik çözücülerin belirlenmesi ve hazırlanması aşamasında, literatürdeki çalışmalardan yararlanılmıştır. Tablo 4.1'de belirtilen kimyasallar 1:3 (mol/mol) oranına göre 80°C'de manyetik karıştırıcıda homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır (Wei, vd. 2015). Hazırlanan DÖÇ'ler ekstraksiyon işleminde kullanılmak üzere karanlık ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Tablo 4.1. Derin ötektik çözücülerin bileşimleri

DÖÇ Adı	DÖÇ Bileşenleri	Mol oranı (mol/mol)
DÖÇ-1	Kolin klorür+1,4-Bütanediol	1:3
DÖÇ-2	Kolin klorür+1,4-Cyclohexanediol	
DÖÇ-3	Kolin klorür+Maltoz	
DÖÇ-4	Kolin klorür+Etilenglikol	

Çalışmada kullanılan bitki örnekleri ve DÖÇ'ler ile gerçekleştirilen ekstraksiyon ve uçucu yağ eldesi işlemlerinde kullanılan katı madde ve çözücü oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

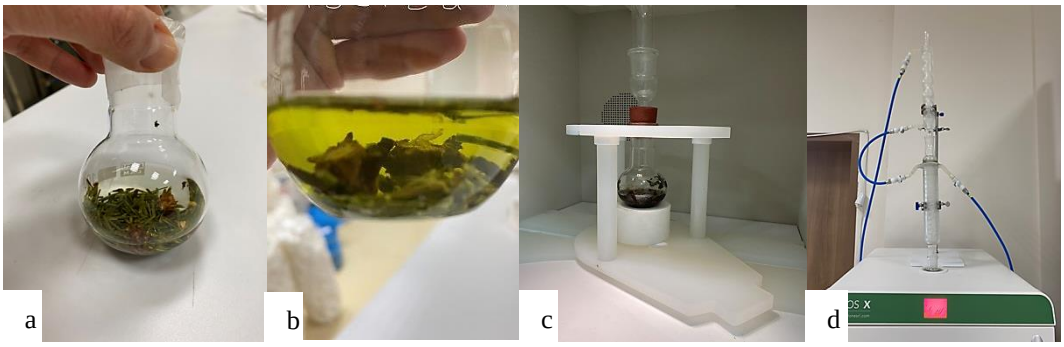
Tablo 4.2. Ekstraksiyon ve uçucu yağ eldesi deney koşulları

Hammadde	Ekstraksiyon çözücüsü	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Katı madde/çözücü oranı (g/ml)
• Karaçam • Meşe • Göknar • Kayın	DÖÇ-1	94	20	1:20
	DÖÇ-2	90		
	DÖÇ-3	80		
	DÖÇ-4	94		
	Saf Aseton	56		
	Saf Hekzan	69		
	Saf Metanol	64		
	Saf Etanol	78		
	Saf su	100		
	Uçucu yağ çözücüsü	**Güç (W)**		
	Saf su	700	30	2:5

DÖÇ'lerin ısı kapasiteleri ile ilgili bir genelleştirmenin bulunmadığı ancak kimi araştırmacıların konuyla ilgili yaptıkları bazı çalışmalarda belirli DÖÇ'lerin özellikleriyle oluşturdukları veri tabanları bulunmaktadır. Bu veri tabanlarına göre DÖÇ'lerin molekül ağırlıkları ve kritik basınç noktaları gibi önemli özelliklerinin kaynama noktasının belirlenmesinde etkisinin olduğu ve bileşimin kütlesinin arttıkça sıcaklık ihtiyacınında arttığı düşünülmüştür (Taherzadeh vd. 2020; Tang vd. 2015). Hazırlanan DÖÇ'lerin kaynama noktaları bilinmediğinden ekstraksiyon işlemi öncesinde bu dört farklı DÖÇ'in kaynama noktaları tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında, DÖÇ'lerin veri tabanına göre kaynama noktası aralığı da göz önünde bulundurularak her bir çözücü mikrodalga cihazında kaynama noktasına gelinceye kadar gözlemlenerek kaynamanın başladığı an not edilmiştir. Her bir çözücü için üç tekrar şeklinde mikrodalga işleminde bu durum gerçekleştirilmiş ve hazırlamış olduğumuz çözücülerin kaynama dereceleri tam olarak belirlenmiştir.

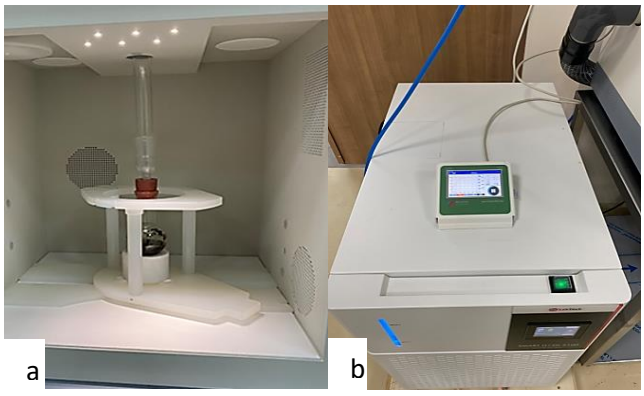
Araziden toplanan karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının orman kesim artığı olarak nitelendirilen 5-6 cm'lik çaptaki dallarından elde edilen yaprak, ibre ve sürgünler mekanik yöntemle 1-2 mm boyutlarına getirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi, deney koşullarındaki 1:20 katı-sıvı oranına göre, örnek rutubetleri esas alınarak tam

kuru 2 g bitki örneği ve 40 ml çözücü ile 100 mm'lik cam balon içerisinde gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon için hazırlanan katı-sıvı karışımı mikrodalga ekstraksiyon cihazının haznesine yerleştirilmiştir (Fotoğraf 4.2).



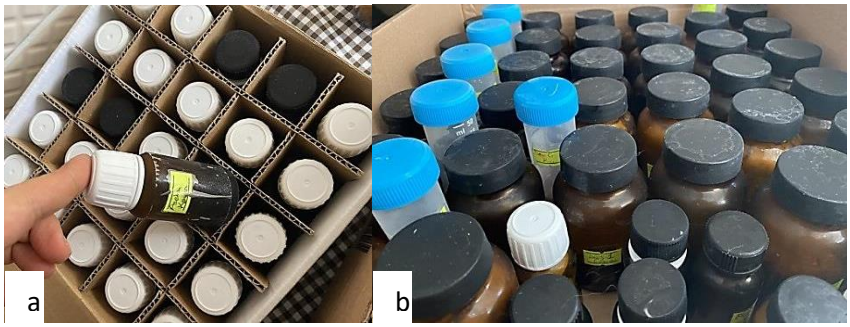
Fotoğraf 4.3. a), b) Bitki örneği ve çözücü karışımı, c) Mikrodalga cihazı iç haznesi, d) Mikrodalga cihazı soxhlet düzeneği

Cihaza yerleştirilen cam balonun, cihazın soxhlet aparatı ile tam uyumlu vakumlanmış halde birleştirimi gerçekleştirilmiş ve mikrodalganın kapağı kapatılmıştır. Daha sonrasında mikrodalga cihazın kontrol panelinden ilk 10 dakikada kaynama noktasına kadar ısıtma aşaması ve son 10 dakikada sabit sıcaklıkta ekstraksiyon işleminin gerçekleşmesi için ayarlamalar yapılmıştır. Ekstraksiyon prosedürüne göre planlanan 20 dakikalık ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Fotoğraf 4.3) (Qi, vd. 2018).



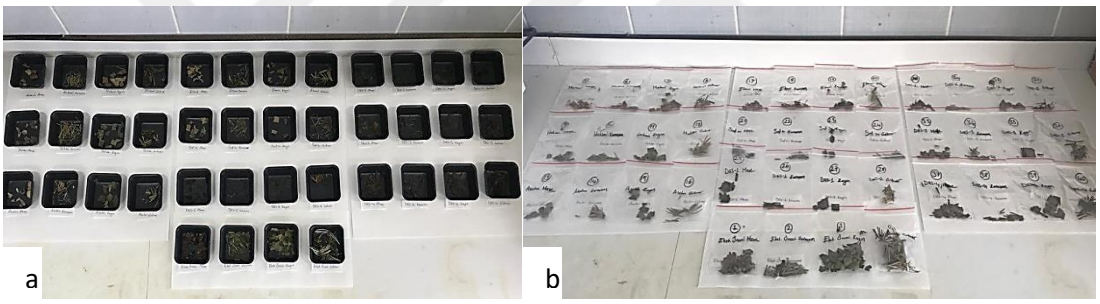
Fotoğraf 4.4. a) Mikrodalga cihazı iç haznesi, b) Mikrodalga cihazı su haznesi ve kontrol paneli

20 dakikalık ekstraksiyon süresi tamamlandıktan sonra cihazın kendini soğutması beklenildikten sonra cihazın kapağı açılarak hazneden bağlantılı olduğu noktadan dikkatli bir şekilde cam balon alınmış ve sonrasında, elde edilen ekstrakt 0,45 µm'lik filtre kağıdından süzülerek amber şişelere alınmıştır (Fotoğraf 4.4).



Fotoğraf 4.5. a), b) Amber şişelere alınan ekstrakt ve uçucu yağlar

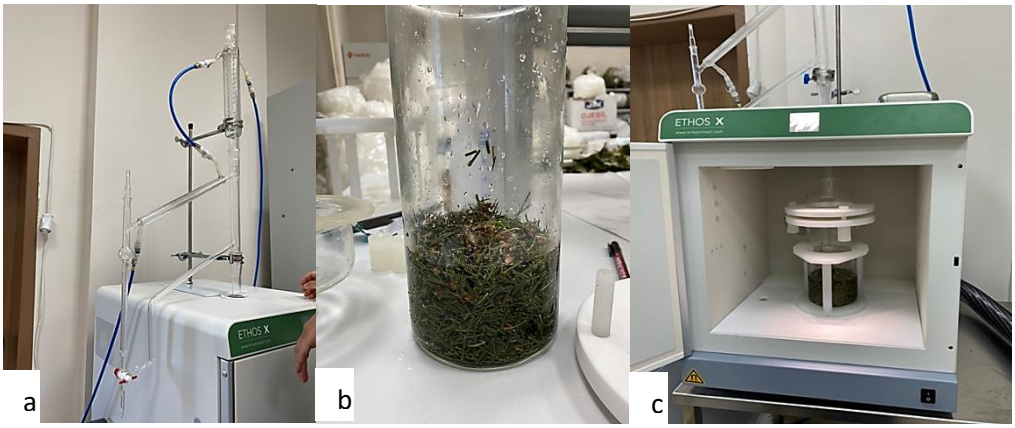
Bütün bu işlemler her bir bitki örneği ve çözücü için 3 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Süzme işlemi tamamlandıktan sonra filtre kağıdında kalan ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuş bitki örnekleri taramalı elektron mikroskobunda (SEM) görüntülenmek üzere hava kurusu hale gelinceye kadar bekletilmiştir (Fotoğraf 4.5).



Fotoğraf 4.6. a), b) SEM analizi için kurutulan bitki örnekleri

4.2.2 Uçucu Yağ Eldesi (Hidrodistilasyon)

Ekstraksiyon işlemi için kullanılan boyutlardaki bitki örnekleri mikrodalga yöntemiyle uçucu yağ eldesi işleminde de kullanılmıştır. Tablo 4.1'de uçucu yağ eldesi için gerekli olan deney koşulları yer almaktadır. Uçucu yağ eldesinde çözücü olarak saf su kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemindeki düzenekten farklı olarak soxhlet aparatına uçucu yağın birikeceği cam büret bağlantısı yapılmıştır (Fotoğraf 4.6). Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazının 5 litrelik reaktörüne her bir bitki örneğinden 200 g alınmış ve üzerine 500 ml'lik saf su ilave edilmiştir. Mikrodalga cihazın kapağı kapatıldıktan sonra kontrol panelinden sabit 700 W güçte 30 dakika boyunca işlemin gerçekleşmesi için değerler girilmiştir. Tüm bu işlemler her bir bitki örneği için 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Fotoğraf 4.7. a) Mikrodalga destekli damıtma düzeneği b) Ekstraktörde hazırlanan örnek ve saf su c) Mikrodalga destekli damıtma iç haznesi

4.2.3 Verim Tayini

Ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen ekstraktların içeriğindeki fenolik bileşenlerin zarar görmemesi ve kayıp olmaması için çözücü uçurma işlemine tabi tutulmamıştır. Elde edilen tüm ekstraklardan 1 ml'lik örnekler alınarak eppendorf tüplere konulmuştur. Eppendorf tüpler etüve alınmış ve her bir çözücünün kaynama noktasına göre ayarlanan sıcaklıkta sabit ağırlığa ulaşana kadar çözücü uzaklaştırma işlemi yapılmıştır. Tüm ekstraktların çözücüleri uzaklaştıktan sonra tartımları yapılıp başta alınan örnek içerisindeki katı madde miktarı hesaplanmıştır. Ekstraksiyon işlemi her bir bitki ve çözücü için üç tekrarlı gerçekleştirildiğinden her bir ekstrakt için verim hesabı yapılmış ve ekstrakların ortalaması alınarak her bitkinin kullanılan çözücü ile elde edilen toplam ekstraktının verimi yüzde olarak belirlenmiştir. Uçucu yağlar da hidrodistilasyon işleminden sonra yağın biriktiği büretten miktarı ölçülerek üç tekrarlı sonuçların ortalaması ile yüzdelik verim hesabı yapılmıştır.

Ekstraktlardaki katı madde miktarı belirlendikten sonra; HPLC, LC-MS/MS, toplam fenolik madde tayini, toplam flavonoid madde tayini, toplam antosiyanin madde tayini, DPPH, ABTS, CUPRAC ve antimikrobiyal analizlerinin gerçekleştirilmesi için stok olarak eşit miktarda katı madde içeren derişimler hazırlanmıştır. Elde edilen uçucu yağların; DPPH, ABTS, CUPRAC ve antimikrobiyal analizlerinin gerçekleştirilmesi için stok olarak kullanılacak hekzan ile derişimleri hazırlanmıştır. Hazırlanan derişimlerdeki katı madde miktarı M1*V1=M2*V2 eşitliğine göre 1,75g/100g oranında eşitlenmiştir. Bu orana göre her bir ekstraktdan farklı miktarlarda

alınıp 30 ml'ye etanolle tamamlanmıştır. Aynı şekilde uçucu yağların da ekstraklardaki gibi 1,75g/100g oranına göre her bir uçucu yağdan 0,175 ml alınarak 10 ml'ye hekzan ile tamamlanmıştır.

4.2.4 GC-MS-SPME Analizi

Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerindeki uçucu bileşenşenler Çukurova Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında (ÇÜMERLAB); Agilent marka 7890B model GC, 7010B model MS sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME) yönteminde, öncelikli olarak 1,5 g bitki örneği 20 mL'lik vial içerisine alınmış ve 15 dakika boyunca 60°C'de bekletilmiştir. Daha sonrasında Katı Faz Mikro Ekstraksiyon aparatı olan 50/30 µm'lik Divinilbenzen/Karboksen/Polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS, 1 cm) kaplı fiber ile bitki örneğindeki uçucu bileşenler 30 dakika boyunca adsorbe edilmiştir. Sonraki adımda DB-Wax (60 m * 0,25 mm i.d * 0,25 µm, J&W Scientific-Folsom, USA) kapiler kolonuna 5 dakika boyunca desorbe edilerek enjekte edilmiştir. 250°C enjeksiyon sıcaklığı, 40°C kolon sıcaklığında 4 dakika bekletildikten sonra dakikada 3°C artırılarak 90°C'ye; 4°C artırılarak 130°C'ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 4 dakika bekledikten sonra da dakikada 5°C artacak şekliyle sıcaklık 240°C'ye ayarlanmış ve bu sıcaklığa ulaştığında 8 dakika bekletilmiştir. Splitless modunda çalışılmıştır. SPME yöntemi için elektron iyonlaştırma enerjisi 70 eV ve kütle aralığı ise 30-600 m/z'dir.

4.2.5 HPLC Analizi

4.2.5.1 HPLC – Şeker analizi

Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. Numunelerin HPLC şeker analizi Iğdır Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ALUM); Agilent 1260 İnfinity model cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Analiz koşulları;

Mobil faz A: %100 (%100 Suda)
Enjeksiyon hacmi: 20 µl
Akış hızı: 0,600 mL/dk

Dedektör: RID
Dedektör sıcaklığı: 35°C
Kolon tipi: Hİ-Plex H, (300 x 7,7 mm) 8 mm
Kolon sıcaklığı: 65°C

4.2.5.2 HPLC – Organik asit analizi

Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. Numunelerin HPLC organik asit analizi Iğdır Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ALUM); Agilent 1260 İnfinity model cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Analiz koşulları;

Mobil faz A: 0,01 molar (H_2SO_4 suda)
Enjeksiyon hacmi: 20 µl
Akış hızı: 0,6 mL/dk
Dedektör: DAD
Dedektör dalga boyu: 210 nm/4 nm Ref; 400/100 nm
Kolon tipi: Hİ-Plex H, 300 x 7,7 mm
Kolon sıcaklığı: 50°C

- Bir litreye, 558 µl H_2SO_4 eklenmektedir.

4.2.6 LC-MS/MS Analizi

Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. Numunelerin LC-MS/MS analizi Iğdır Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ALUM); Agilent 6460 Triple Quad model cihaz ile gerçekleştirilmiştir.

Bitki örneklerinden elde edilen ekstraktlar 2 ml'lik eppendorf tüplere 50 mg alınmıştır. Numune üzerine 1 ml metanol eklenerek çözülmüştür. Elde edilen çözelti 1 ml hekzan ile 9000 rpm de 10 dakika santifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası metanol fazından 100 µl alınmıştır. 450 µl'si su, 450 µl'si metanol olacak şekilde 900 µl ile seyreltme işlemi yapılmıştır. Son aşamada 0,25'lik filtreleme yapıldıktan sonra LC-MS/MS cihazında analizi yapılmıştır. LC-MS/MS cihaz programı Tablo 4.3'de ve LC-MS/MS cihazının

kütüphanesinde bulunan fenolik bileşen standartlarının verileri Tablo 4.4'da verilmektedir. 5,12 mL enjeksiyon hacminde, 0,400 mL/dk akış hızında, 40°C sıcaklıkta 30 dakikada analiz gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.3. LC-MS/MS cihaz programı

	Süre	**Mobil faz A**	**Mobil faz B**
1	3,00 dk	%75,0	%25,0
2	12,00 dk	%50,0	%50,0
3	16,00 dk	%10,0	%90,0
4	21,00 dk	%10,0	%90,0
5	24,00 dk	%97,5	%2,5

Tablo 4.4. LC-MS/MS fenolik bileşen standart değerleri

Name	**ESI İYON MODU**	**MRM**	**RT**	**R^2**	**Eşitlik**	**LOQ (ug/L)**	**LOD (ug/L)**
Şikimik asit	Neg	173,0 ->93,1	1,398	0,9995	y = 0,3166x + 67,3729	5,223	152,192
Gallik asit	Neg	169,0 ->125,1	3,218	0,9986	y = 0,3166x + 67,3729	18,5862	7,1674
Protokatekuik asit	Neg	153,0 ->109,0	5,449	0,9969	y = 78,0950x - 1269,7616	13,1729	3,1564
Epigallokateşin	Pos	307,0 ->139,0	6,796	0,9995	y = 60,7672x - 351,8589	3,875	2,0903
Kateşin	Neg	288,9 ->245,1	6,904	0,9946	y = 138,4217 x - 137,1092	7,5013	1,7055
Klorojenik asit	Neg	353,0 ->191,0	7,378	0,9981	y = 1,6271x + 16,7746	25,9023	11,589
Hidroksibenzaldeid	Neg	121,0 ->92,0	7,679	0,9993	y = 43,4033 x - 269,6858	12,8651	4,9742
Vanilik asit	Neg	167,0 ->151,8	7,791	0,9958	y = 147,0763x - 885,9627	1424,2132	219,0421
Kafeik asit	Neg	178,9 ->135,1	7,847	0,9994	y = 0,7678 x - 123,1431	24,162	6,9205
Siringik asit	Neg	197,1 ->181,8	8,401	0,999	y = 75,9028x - 464,8503	857,3388	358,5
Kafein	Pos	195,0 ->137,9	8,431	0,9986	y = 0,6648x - 110,4109	15,4959	6,8099
Vanilin	Pos	153,0 ->125,0	8,649	0,9949	y = 292,3357x + 1350,2398	40,5411	14,5885
Polidatin	Pos	390,9 ->228,9	9,807	0,9987	y = 30,6420x + 1246,2876	1,8411	1,1471
o-kumarik asit	Neg	163,0 ->119,1	9,441	0,9996	y = 226,0952x - 2389,4381	7,9973	4,0164
Salisilik asit	Neg	137,0 ->93,1	9,539	0,9981	y = 41,8540x + 22598,1369	82,9646	47,6695
Taksifolin	Pos	304,8 ->258,9	9,743	0,9938	y = 128,4933x - 802,7125	23,511	11,0294
Resveratrol	Pos	229,0 ->107,0	9,791	0,991	y = 58,7673x - 3013,8907	13,5575	4,5806
trans-ferulik asit	Neg	193,1 ->133,9	10,132	0,995	y = 97,4869x + 1354,5888	11,5276	6,1184

Tablo 4.4. Devamı…

Name	ESI İYON MODU	MRM	RT	R2	Eşitlik	LOQ (ug/L)	LOD (ug/L)
Sinapik asit	Neg	223,1 ->208,0	10,414	0,9972	y = 5,6248x - 94,333556	4,9652	1,9437
Skutellarin	Pos	462,8 ->286,8	11,151	0,9978	y = 4,5018x - 70,6386	4,0013	3,1346
p-kumarik asit	Neg	163,0 ->119,0	11,502	0,9987	y = 361,0313x - 49,9484	17,5416	3,5348
Kumarin	Pos	147,1 ->103,2	11,531	0,9974	y = 22,8575x - 120,4578	20,7034	6,0077
Protokatehuik etil ester	Neg	181,0 ->107,9	11,622	0,9996	y = 28,3248x + 2008,7558	24,9201	14,561
Hesperidin	Pos	611,0 ->302,9	11,842	0,9957	y = 111,1913x - 628,4350	17,6753	4,1396
İzokersitrin	Pos	464,9 ->302,8	11,867	0,9982	y = 35,9994x + 647,1061	11,268	9,9382
Rutin	Pos	611,0 ->302,8	12,293	0,998	y = 244,7086x + 120,1128	240,672	59,5597
Kuarsetin-3-ksilosid	Neg	432,7 ->299,5	12,433	0,99	y = 7,5982x + 52,4741	69,4059	18,7126
Kaempferol-3-glukozit	Pos	448,8 ->286,9	13,287	0,9997	y = 4,0886x - 8,9745	4,5238	1,1609
Fisetin	Pos	287,0 ->137,0	13,327	0,9954	y = 417,6305x - 1087,1889	44,3662	10,8961
Baicalin	Pos	446,8 ->270,9	13,653	0,9991	y = 593,9278x - 4511,1100	3,0988	0,5276
Krizin	Pos	254,9 ->153,0	14,23	0,9989	y = 243,5084x - 604,2408	0,1338	0,0737
Daidzein	Pos	254,9 ->128,0	14,246	0,9989	y = 0,3134x + 1532,8924	9,4	28,77
trans-sinnamik asit	Pos	149,0 ->131,1	14,272	0,9999	y = 2949,2210x - 386,4011	22,0279	11,1853
Kuersetin	Neg	300,8 ->151,0	14,821	0,9964	y = 47,9416x + 704,8157	16,9127	4,6558
Naringenin	Neg	270,9 ->119,1	14,999	0,996	y = 29,1152x - 801,9012	0,4575	1,3694
Hesperetin	Neg	300,9 ->164,0	15,815	0,9966	y = 39,0940x - 687,6380	0,6496	0,3008
Morin	Pos	302,8 ->153,0	15,819	0,9981	y = 35,9555x - 420,5604	0,5284	0,1253
Kaempferol	Neg	284,9 ->116,9	16,431	0,9997	y = 3146,7622x - 450,4432	5,4004	1,8683
Baicalein	Pos	271,0 ->123,0	17,084	0,9953	y = 994,5023x + 1984,0643	18,04	54,69
Luteolin	Pos	285,0 ->133,1	17,909	0,9941	y = 26,0365x + 1523,9279	21,93	93,94
Biyokanin A	Pos	284,9 ->151,9	17,91	0,9970	y = 850,3427x - 175,5788	19,46	58,58
Kapsaisin	Pos	306,1 ->137,0	18,253	0,9995	y = 20910,3659x - 2902,3084	6,25	20,18
Dihidrokapkaisin	Pos	308,2 ->137,0	18,666	0,9994	y = 16030,2257x - 3527,5256	4,25	13,29
Diosgenin	Pos	415,0 ->271,0	23,542	0,9987	y = 119,8071x - 298,5818	5,25	21

ESI: Elektrosprey iyonizasyon; MRM: Çoklu iyon izleme; RT: Alıkonma süresi; LOQ: Ölçüm (kantitasyon) limiti; LOD: Tespit (dedeksiyon) limiti

4.2.7 Taramalı Elektron Mikroskopu Görüntüleme (SEM)

Bitki örneklerinin ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleşen ekstraksiyon sonrası katı materyalleri, Kastamonu Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi FFEI marka Quanta FEG 250 model Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazında gerçekleştirilmiştir. SEM'de görüntülemeye başlamadan önce Cressington Sputter Coater 108 Auto model cihazda numunelerin yüzeyleri Au-Pd ile 40 mA'de 30 saniye kaplanmıştır. Cihazda görüntüler 1000x çözünürlükte ve 10,00 kV ile çekilmiştir.

4.2.8 Toplam Fenolik Madde Tayini

Karaçam, meşe, göknar ve kayın türlerinin yıllık sürgünlerinin farklı çözücüler ile elde edilmiş ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı; Singleton ve Rossi (1965), tarafından geliştirilen ve İkinci vd. (2021) tarafından modifiye edilen metot esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. Folin ve Ciocalteau reaktifi 1:9 olacak şekilde saf su ile uygun oranlarda seyreltilmiştir. O,4 ml seyreltilen ekstrakt üzerine 0,1 N 2 ml Folin-Ciocalteau ve 1,6 ml %7,5 Na_2CO_3 çözeltisi eklenip; vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda bekletilen karışımların, Shimadzu UV-1700 UV-Vis spektrofotometre ile 765 nm'de absorbans grafiği (R^2=0,99) yardımıyla hesaplanarak, sonuçlar µg GAE g^{-1} olarak verilmiştir.

4.2.9 Toplam Flavonoid Madde Tayini

Karaçam, meşe, göknar ve kayın türlerinin farklı çözücüler ile elde edilmiş ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarı; Zhishen vd. (1999), tarafından önerilen ve İkinci vd. (2021) tarafından modifiye edilen yöntemle belirlenmiştir. Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. 0,5 ml seyreltilen ekstrakt üzerine 2 ml çözücü (su) + 0,15 ml %5'lik $NaNO_2$ çözeltisi eklenir ce 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 0,15 ml %10'luk $AlCl_3$ eklenip 6 dakika karanlıkta bekletilip + 1 ml 1M NaOH çözeltisi eklenip karışımın tamamı 5 ml olacak şekilde su ile tamamlanmıştır. Bitki

ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarı µg QE g^{-1} olarak spektrofotometrede [Shimadzu UV-1700] absorbansın 510 nm'de ölçülmesiyle tespit edilmiştir.

4.2.10 Toplam Antosiyanin Madde Tayini

Bitki ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarı içerikleri Giusti ve Wrolstad (2001), tarafından belirtilen pH-diferansiyel metoduna göre belirlenmiştir. Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. 0,025 M KCl tamponu [Ph 1,0] ve 0,4 M CH_3COONa tamponu içerisinde inkubasyona tabi tutulan örneklerin absorbansları spektrofotometrede [Shimadzu UV-1700] 520 ve 700 nm'de ölçülmüş ve absorbans değerleri A [absorbans değeri]=[A_{520nm}-A_{700nm}] pH 1,0- [A_{520nm}-A_{700nm}] pH 4,5 formülüyle bulunmuştur. Örneklerin elde edilen absorbans değerleri aşağıda verilen eşitlik kullanılarak hesaplanmış ve toplam antosiyanin miktarı mg siyanidin 3-glikozit 100 ml^{-1} olarak hesaplanmıştır.

4.2.11 Antioksidan Aktivite Yöntemleri

4.2.11.1 DPPH analizi

Antioksidan kapasitenin bir ifadesi olan DPPH radikalini indirgeme aktivitesi (antiradikal aktivite) Singh vd. (2002), tarafından geliştirilen, Alwazeer vd. (2023) tarafından modifiye edilen metoda göre hesaplamalar yapılmıştır. Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. DPPH çözeltisi hazırlamak için; 0,004732 gr DPPH tartılmış ve tartılan DPPH amberli ve alüminyum folyo ile kaplı şişeye alınmıştır. Üzerine 150 ml çözücü (etanol) eklenmiştir. 1 gün karanlık ortamda manyetik karıştırıcıda çalkalanmıştır. Ertesi gün 50 ml daha çözücü eklenmiştir. Daha sonrasında bitkilerden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağlardan hazırlanan çözeltilerin okumalarını yapmak amacıyla numune hazırlamak için; bitki ekstrakt ve uçucu yağ çözeltilerinden 3 farklı derişimde (0,1; 0,2; 0,3 ml) santrifüj tüpüne alınmış ve DPPH eklenerek 4 ml'ye tamamlanmıştır. Tüpler vortekslenip, 30 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. SHIMADZU UV-1280 UV-VIS 517 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür.

DPPH analizinde numunedeki antioksidan miktarı dolaylı yoldan ölçülmektedir. Uv spektrofotometre, numunedeki antioksidantın absorbansını değil DPPH'ın absorbansını vermektedir. DPPH, radikal madde olduğu için antioksidan madde ile tepkimeye girmektedir. Bu metotta absorbans numunedeki antioksidan miktarıyla ters orantılıdır. Sıfır veya sıfıra yakın absorbans, antioksidan maddenin ortamdaki DPPH'ı tamamen süpürdüğü anlamına gelmekte yani antioksidan miktarının yüksek olduğunu göstermektedir.

4.2.11.2 ABTS analizi

Antioksidan kapasitenin bir ifadesi olan ABTS radikalini indirgeme aktivitesi (antiradikal aktivite) Re (1999), tarafından geliştirilen ve Alwazeer vd. (2023) tarafından modifiye edilen metoda göre hesaplamalar yapılmıştır. Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. ABTS çözeltisinin hazırlanması için;

a. 0,72 g ABTS+200 ml saf su karıştırılarak 7 Mm ABTS çözeltisi elde edilmiştir.

b. 0,1325 g + 200 ml saf su karıştırılarak 0,00245 M Potasyum persülfat çözeltisi elde edilmiştir.

c. Hazırlanan a ve b çözeltileri karıştırılıp, 12 saat karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonrasında 734 nm de ölçüm yapılıp absorbans 0,708±0,025' e düşene kadar çözelti seyreltilmiştir.

Daha sonrasında bitkilerden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağlardan hazırlanan çözeltilerin okumalarını yapmak amacıyla numune hazırlamak için; bitki ekstrakt ve uçucu yağ çözeltilerinden 3 farklı derişimde (0,1; 0,2; 0,3 ml) santrifüj tüpüne alınmış ve 4 ml'ye ABTS ile tamamlanmıştır. Tüpler vortekselenip, 10 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. SHIMADZU UV-1280 UV-VIS 734 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür.

ABTS analizinde numunedeki antioksidan miktarı dolaylı yoldan ölçülmektedir. Uv spektrofotometre, numunedeki antioksidantın absorbansını değil ABTS'nin

absorbansını vermektedir. ABTS, radikal madde olduğu için antioksidan madde ile tepkimeye girmektedie. Bu metotta absorbans numunedeki antioksidan miktarıyla ters orantılıdır. Sıfır veya sıfıra yakın absorbans, antioksidan maddenin ortamdaki ABTS'yi tamamen süpürdüğü anlamına gelmekte yani antioksidan miktarının yüksek olduğunu göstermektedir.

4.2.11.3 CUPRAC analizi

Antioksidan kapasitenin diğer bir ifadesi olan ve Apak (2004) tarafından geliştirilen CUPRAC yönteminde Bakır (II) indirgenmesi sonucu numunede antioksidan tayini yapılmıştır. Bitkisel materyallerden alınan ekstraktların hepsi aynı derişimde olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. CUPRAC çözeltisinin hazırlanması için;

1. 0,4262g (Cu Cl2*2H2O) + 250 mL saf su karıştırılarak 1.10^{-2} M Cu(II) çözeltisi (Cu Cl_2*2H_2O) çözeltisi hazırlanmıştır.

2. 19,27 g amonyumasetat + 250 mL saf su karıştırılarak Amonyumasetat çözeltisi hazırlanmıştır.

3. 0,156 g neokuprin + 100 etanol ile karıştırılarak $7,5*10^{-3}$M Neokuprin (2,9-dimetil-1,1O-fenantralin) çözeltisi elde edilmiştir.

Daha sonrasında bitkilerden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağlardan hazırlanan çözeltilerin okumalarını yapmak amacıyla numune hazırlamak için; bitki ekstrakt ve uçucu yağ çözeltilerinden 3 farklı derişimde (0,1, 0,2, 0,3 ml) santrifüj tüpüne alınmıştır. Tüpe alınan numuneler 1 ml' ye ekstre çözücüsü ile getirtilip sonra 1 ml çözücü 1 + 1 ml çözücü 2 + 1 ml çözücü 3 eklenmiştir. Toplamda 4 ml olmuştur. Tüpler vortekslenip, 30 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. SHIMADZU UV-1280 UV-VIS 450 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür.

CUPRAC analizinde, DPPH ve ABTS analizlerindeki gibi numunede bulunan antioksidan miktarı dolaylı yoldan ölçülmemektedir. Uv spektrofotometre, numunedeki antioksidantın absorbansını vermektedir. Bu metotta absorbans numunedeki antioksidan miktarıyla doğru orantılıdır. 0,1-0,2 absorbansdan yüksek ve

2,5-3 absorbansdan düşük aralıktaki absorbans okumaları numunenin ortamdaki antioksidan madde içeriğini ifade etmektedir. Yani UV cihazında okunan yüksek absorbans değeri numunedeki antioksidan miktarının yüksek olduğunu göstermektedir.

4.2.12 Antimikrobiyal Aktivite

4.2.12.1 Disk difüzyon metodu

Antimikrobiyal aktiviteyi test etmek için antibiyotik disklere emdirilmek üzere 1 mg ekstrakt, 3 mL etenol oranına göre çözelti hazırlanmıştır. Çalışmayı standart hale getirmek için, daha önce çeşitli çalışmalarda tarif edildiği gibi, Mueller Hinton Agar içeren 9 mm boyutlarındaki petri kaplarda hazır besiyerleri kullanılmıştır (Canlı vd. 2016; İlhan vd. 2006). Hazırlanan çözeltiler boş antibiyotik disklere 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiştir. Diskler aseptik koşullarda 40°C'de 24 saat bekletilmiştir (Altuner vd. 2010a). Altuner ve Akata'nın (2010b) çalışmasında anlatıldığı gibi ekstrakt çözeltileri ile yüklü diskler besiyerlerine yerleştirilmeden önce Mueller Hinton plakalarının yüzeylerine mikroorganizma süspansiyonları aşılanarak aseptik koşullarda 2-3 dakika bekletilmiştir. Canlandırılan mikroorganizmalardan 0,5 McFarland standardına göre inokulumlar hazırlanmış ve her bir inokulum hazır besiyerinin yüzeyine aşılanmıştır. Aşılama yapılan besiyerlerinin üzerine ekstrakt çözeltisiyle farklı oranlarda emdirilmiş antibiyotik diskler ve kontrol amaçlı hiç yükleme yapılmamış boş antibiyotik disk yerleştirilmiştir. Antibiyotik disklerin yerleştirildiği besiyerleri 37±0,1°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon tamamlandıktan sonra besiyeri üzerinde antibiyotik disklerin oluşturduğu inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür (Altuner vd. 2014). Disk difüzyon çalışmaları her bir ekstrakt ve uçucu yağ için bütün mikroorganizmalarda 3 paralel tekrar olarak yürütülmüştür.

4.2.13 İstatiksel Analiz

İstatiksel analiz, SPSS 23 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneylerden elde edilen verilerin etki faktörleri arasındaki farklılık Oneway ANOVA

analizi ile incelenmiştir ($P<0,05$). Elde edilen farkların anlamlı bulunması sonucunda Tukey homojenlik grup testi uygulanmıştır.

Tukey testi sonucuna göre ekstrakt verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde içeriği, DPPH, ABTS ve CUPRAC analizleri açısından numuneler arasındaki istatiksel farklılığın ($P<0,05$) ifade edildiği birinci homojenlik grubu testi (Tüm-İst) ve derin ötektik çözücülerden elde edilen numuneler ile geleneksel çözücülerden elde edilen numuneler arasındaki istatiksel farklılığı ($P<0,05$) gösteren ikinci homojenlik grubu testi (Çöz-İst) harflendirmeler ile gösterilmiştir. Her bir ağaç türünün farklı çözücülerden elde edilen numuneleri arasındaki istatiksel farklılığın ($P<0,05$) gösterildiği üçüncü homojenlik grubu testi (Tür-İst) ise rakamlarla ifade edilmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1 Ekstraksiyon Verimleri

Tablo 5.1'de karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarından dokuz farklı çözücü kullanılarak mikrodalga ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların verimleri görülmektedir. Her bir çözücü için ağaç örneklerinden elde edilen ekstraktların verimleri karşılaştırıldığında, derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların organik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre yaklaşık dört kat daha yüksek verimde olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan çözücüye göre elde edilen ekstraktların verimleri büyükten küçüğe döç -4, döç-3, döç-1, döç-2, metanol, aseton, etanol, saf su ve hekzan olarak sıralanmaktadır. Çözücüler içerisinde en yüksek verimi %54,68-72,57 aralığında döç-4 çözücüsünden elde edilen ekstraktlar, en düşük verimi ise %1,75-6,00 aralığında hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktlar vermiştir. Wei vd. (2015), *Cajanus cajan* bitkisinin yapraklarından 14 farklı NADES, %80 etil alkol ve %60 etil alkol çözücüleri kullanarak mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde ettikleri ekstraktların verimini hesaplamışlardır. Çalışmada kullanılan derin ötektik çözücülerden kolin klorür ve 1,4-bütanediol karışımdan elde edilen çözücüde 25,02 mg/g; kolin klorür ve etilen glikol karışım çözücüsünden 27,21 mg/g; kolin klorür ve maltoz karşım çözücüsünden 30,63 mg/g verim elde etmişlerdir. Cao vd. (2017), yaptıkları çalışmada *Artemisia annua* bitkisinin yaprakları ile dokuz farklı derin ötektik çözücü kullanarak ekstraktlar elde etmişler ve elde edilen ekstraktların 1-1,8 mg/g aralığında verim gösterdiğini belirtmişlerdir. Vieira vd. (2018), *Juglans regia* yapraklarından DÖÇ çözücüleri ile katı sıvı destekli ekstraksiyon yöntemi kullanarak elde ettikleri ekstraktların verimini ChCl:fenilpropiyonik asit ekstraktı için 34,3 mg/g DW; ChCl:bütirik asit ekstraktı için 33,7 mg/g DW ve ChCl:propiyonik asit ekstraktı için 33,3 mg/g DW olarak tespit etmişlerdir. Tan vd. (2019), palmiyeden dokuz farklı derin ötektik çözücü kullanarak elde ettikleri ekstraktların katı madde verimini %40-80, lignin verimini ise %15-60 aralığında belirlemişlerdir. Rosarina vd. (2022), yaptıkları çalışmada *Curcuma longa* bitkisininden derin ötektik çözücü ile ultrason destekli ekstraksiyon yöntemini kullanarak ekstraktlar elde etmişler ve elde ettikleri ekstraktların çözücüsündeki su içeriği oranına, ekstraksiyon kullanılan katı madde

miktarına ve ekstraksiyon sıcaklığına göre değişim gösteren verimlerini hesaplamışlardır. Çalışmada çözücü içerisindeki %20 su içeriği olan ekstrakt 43,83 mg/g; %25 ve %30 su içerikli çözücüden elde edilen ekstraktlarda sırasıyla 32,58 mg/g; 30,74 mg/g verim elde edilmiştir. Ekstraksiyon işleminde kullanılan katı madde miktarına göre %4, %5 ve %7 katı madde içerikleriyle elde edilen ekstraktların verimini sırasıyla 49,67 mg/g; 64,55 mg/g ve 43,83 mg/g olarak belirlemişlerdir. Ekstraksiyon sıcaklığına göre yapılan karşılaştırmada 55°C, 45°C ve 35°C sıcaklıkta gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktların verimi sırasıyla 84,27 mg/g; 80,64 mg/g ve 79,64 mg/g olarak hesaplanmıştır. Derin ötektik çözücülerin odunun ana bileşenleri olan karbonhidratları çözme kabiliyetinin yüksek olmasından kaynaklı yüksek verimde ekstrakt elde eldilmesine sebep olduğu düşünülmektedir (Kumar vd. 2016; Kwon vd. 2020; Kwon vd. 2021; Lynam vd. 2017; Wu vd. 2021; Zhang vd. 2016).

Tukey testine göre, üç tekrarlı gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda hesaplanan verim sonuçları ile gerçekleştirilen birinci homojenlik grubu (Tüm-İst) testinde, aseton+M, aseton+K, hekzan+Kç, etanol+Kç, etanol+M, etanol+G, etanol+K, saf su+Kç, saf su+M ve saf su+K numuneleri aynı grupta yer aldığından ekstraksiyon verimi bakımından istatiksel olarak ($P<0,05$) birbirleriyle benzer sonuçlar verdiği için anlamlı olduğu gözlenmiştir. İkinci homojenlik grubu (Çöz-İst) testinde, geleneksel çözücülerden elde edilen numunelerden aseton+K, etanol+M, etanol+K, saf su+Kç, saf su+M ve saf su+K aynı grupta yer almaktadır. Bu nedenle numunelerin istatiksel anlamda ($P<0,05$) benzerliğinin olduğu yani anlamlı olduğu düşünülmektedir. Üçüncü homojenlik grubu (Tür-İst) testinde, karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen aseton+Kç, etanol+Kç ve saf su+Kç numuneleri aynı grupta bulunmaktadır. Kayın ağacından elde edilen aseton+K, etanol+K ve saf su+K numuneleri aynı grupta yer almaktadır. Aynı grupta yer alan numunelerin istatiksel anlamda ($P<0,05$) birbirlerine benzer sonuçlar verdiği tespit edilmiştir (Tablo 5.1).

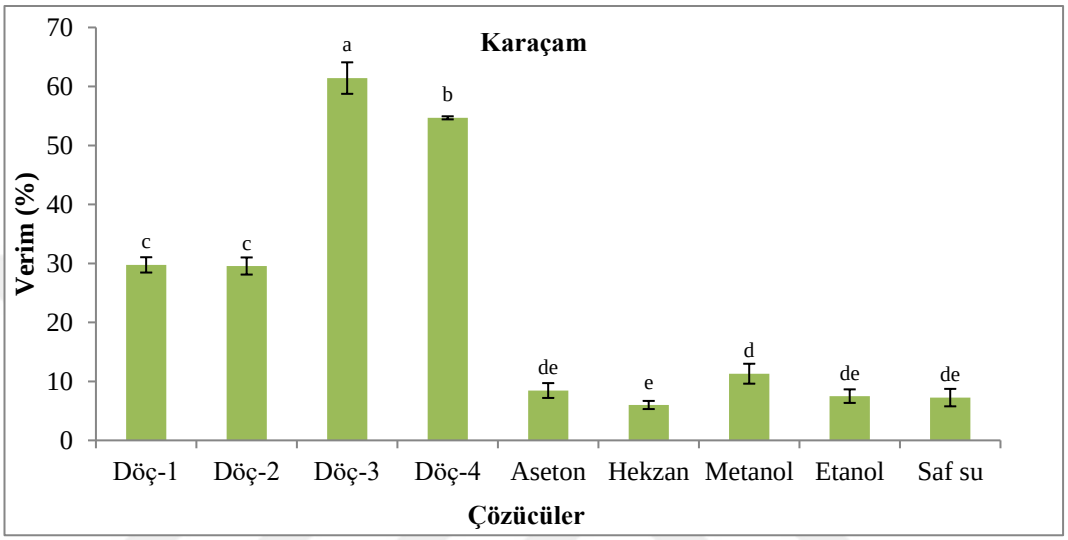
Tablo 5.1. Çalışılan örneklere ait ekstrakt verimleri (%)

NUMUNE	%	NUMUNE	%
Döç-1+Karaçam	29,75±1,30^{g,G,3}	Aseton+Göknar	8,58±0,99^{ıi,BCD,4}
Döç-1+Meşe	33,87±2,54^{efg,EFG,3}	Aseton+Kayın	6,98±1,31^{ıijk,BCDEF,34}
Döç-1+Göknar	31,38±4,81^{fg,FG,2}	Hekzan+Karaçam	6,00±0,69^{ıijk,CDEF,5}
Döç-1+Kayın	38,95±0,64^{e,E,2}	Hekzan+Meşe	2,13±0,93^{k,EF,5}
Döç-2+Karaçam	29,56±1,45^{g,G,3}	Hekzan+Göknar	2,27±0,98^{jk,EF,5}
Döç-2+Meşe	31,85±0,98^{fg,FG,3}	Hekzan+Kayın	1,75±0,66^{k,F,4}
Döç-2+Göknar	36,62±1,73^{ef,EF,2}	Metanol+Karaçam	11,30±1,69^{hı,BC,4}
Döç-2+Kayın	36,88±1,44^{ef,EF,2}	Metanol+Meşe	9,50±1,50^{ıi,BC,4}
Döç-3+Karaçam	61,42±2,67^{bc,BC,1}	Metanol+Göknar	17,30±2,24^{h,A,3}
Döç-3+Meşe	59,10±1,80^{cd,CD,2}	Metanol+Kayın	11,67±5,15^{hı,B,3}
Döç-3+Göknar	55,17±1,08^{d,D,1}	Etanol+Karaçam	7,50±1,15^{ıijk,BCDE,45}
Döç-3+Kayın	60,18±1,33^{bcd,BCD,1}	Etanol+Meşe	6,95±0,35^{ıijk,BCDEF,45}
Döç-4+Karaçam	54,68±0,26^{d,D,2}	Etanol+Göknar	6,02±0,21^{ıijk,CDEF,45}
Döç-4+Meşe	72,57±1,03^{a,A,1}	Etanol+Kayın	6,57±0,31^{ıijk,BCDEF,34}
Döç-4+Göknar	56,68±1,92^{cd,CD,1}	Saf su+Karaçam	7,25±1,48^{ıijk,BCDEF,45}
Döç-4+Kayın	65,32±2,67^{b,B,1}	Saf su+Meşe	6,48±3,33^{ıijk,BCDEF,45}
Aseton+Karaçam	8,45±1,26^{ıij,BCD,45}	Saf su+Göknar	3,77±1,31^{ijk,DEF,45}
Aseton+Meşe	7,95±1,25^{ıijk,BCD,4}	Saf su+Kayın	6,40±1,90^{ıijk,BCDEF,34}

Tukey testine göre, aynı sütundaki farklı harfler ilgili değerlerin verim değerlerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Değerlerin karşılaştırılması üç farklı kategoride gerçekleştirilmiştir.
1. Büyükten küçüğe a ile k aralığında sıralama
Tüm numunelere bağlı olarak, verim taraması
2. Büyükten küçüğe A ile G aralığında sıralama
Geleneksel ve derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelere bağlı olarak, verim taraması
3. Büyükten küçüğe 1 ile 5 aralığında sıralama
Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın ağacından elde edilen numunelere bağlı olarak, verim taraması

Karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların verimi grafiğe dökülmüştür (Grafik 5.1). Grafik incelendiğinde, tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlardan %6,00-61,42 aralığında verim elde edilmiştir. Çözücüler arasında kıyaslama yapıldığında derin ötektik çözücülerden elde edilen karaçam ekstraktlarının organik çözücülere göre yaklaşık olarak beş kat daha yüksek verim gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek verimi %61,42 ile döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstrakt göstermişken en düşük verimi ise %6 ile hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktın gösterdiği belirlenmiştir. Fernandes vd. (2021), yaptıkları çalışmada *Pinus pinaster* odunun talaşını farklı derin ötektik çözücüler kullanarak ekstrakte etmişler ve kolin klorür laktik asit karışımından elde ettikleri ekstraktın verimini %32 olarak belirlemişlerdir. Skulcova vd. (2017), *Picea abies* kabukları ile dokuz farklı derin ötektik çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların verimini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda elde edilen ekstraktların verimini,

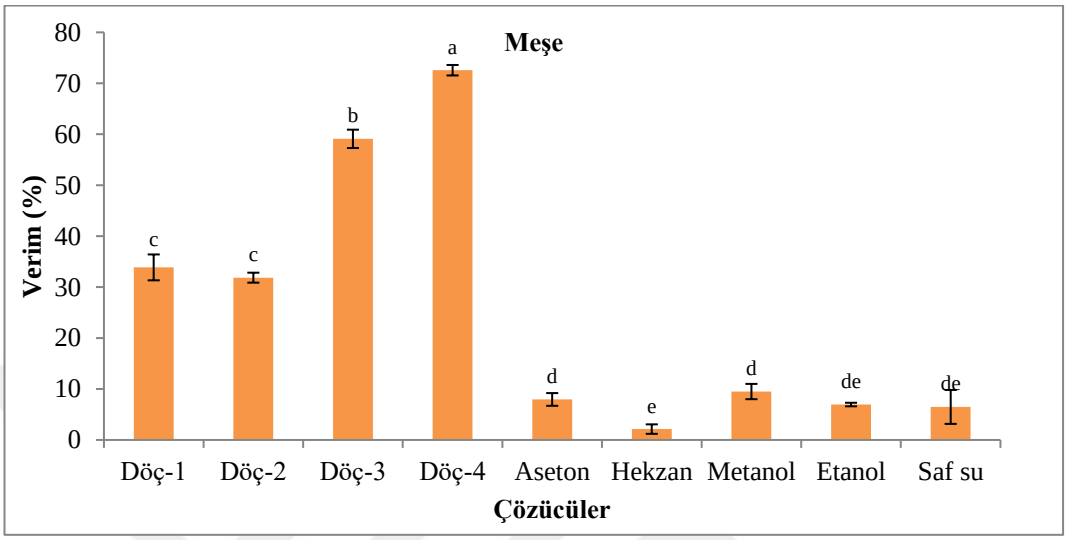
%27,70 ChCl:tartarik asit; %27,08 ChCl:oksalik asit; %22,15 ChCl:laktik asit; %17,94 ChCl:malonik asit; %15,17 ChCl:sitrik asit; %14,29 ChCl:malik asit; %14,29 ChCl:glikolik asit; %11,87 ChCl:maleik asit ve %11,40 ChCl:gliserol belirlemişlerdir. Ioannidis vd. (2016), karaçam ağacının aseton çözücüsü ile elde edilen ekstraktların verimini %5,37-6,79 olarak hesaplamışlardır.



Grafik 5.1. Karaçam yıllık sürgün ekstrakt verimi (%) ve istatiksel verim taraması

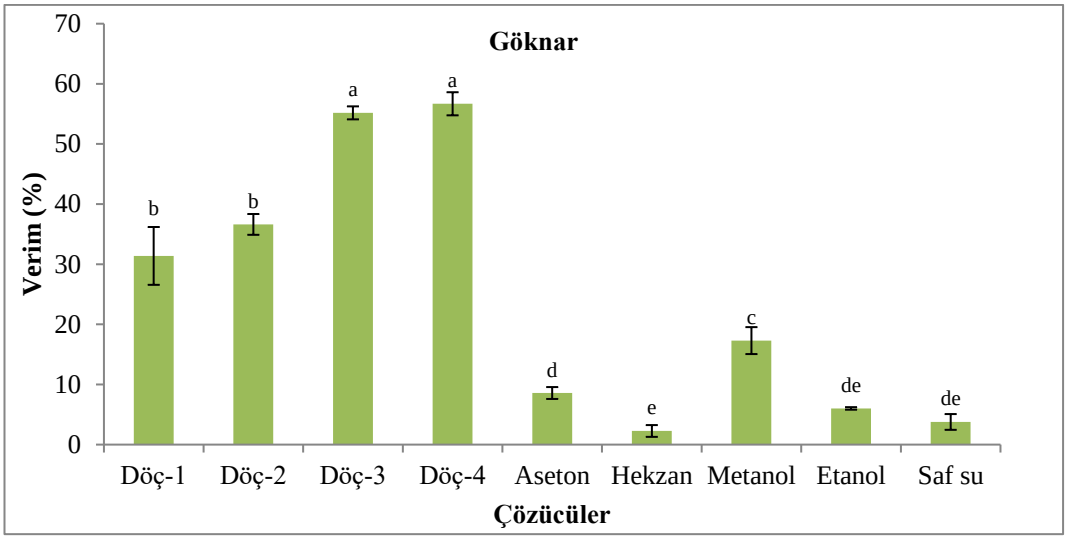
Her bir çözücü kullanılarak meşe ağacından elde edilen ekstraktların verimi grafikte verilmektedir (Grafik 5.2). Grafik incelendiğinde, tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlardan %2,13-72,57 aralığında verim elde edilmiştir. Çözücüler arasında kıyaslama yapıldığında derin ötektik çözücülerden elde edilen meşe ekstraktlarının organik çözücülere göre yaklaşık olarak yedi kat daha yüksek verim gösterdiği düşünülmektedir. Meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlar içerisinde en yüksek verimi %72,57 ile döç-4 çözücüsünden elde edilen ekstrakt vermiş ve sonrasında sırasıyla bunu %59,1 ile döç-3; %33,87 ile döç-1; %31,85 ile döç-2; %9,5 ile metanol; %7,95 ile aseton; %6,95 ile etanol; %6,48 ile saf su ve %2,13 ile hekzan çözücülerinden elde edilen ekstraktlar takip etmiştir. Garcia-Villalba vd. (2017), yedi farklı meşe türünün yapraklarından su ile demleme yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktlardaki verimi %17,8-39,1 aralığında belirlemişlerdir. Simoes vd. (2022), meşe yapraklarından hekzan, diklormetan ve aseton çözücülerini kullanarak soxhlet yöntemi ile elde ettikleri ekstraktların verimini hesaplamışlardır. Çalışmada hekzandan elde edilen ekstrakt için 0,33-3,39 g/100 g; diklorometan çözücüsünden elde edilen ekstraktda 0,51-2,77 g/100 g ve asetondan elde edilen ekstraktda 0,35-3,57

g/100 g verim elde etmişlerdir. Hayouni vd. (2007), meşe ağacının meyveleri ile farklı organik çözücüler kullanarak ekstraktlar elde edilmiş ve su ekstraktından %4,21; aseton ekstraktından %5,75 ve kloroform ekstraktından %3,7 verim elde edilmiştir.



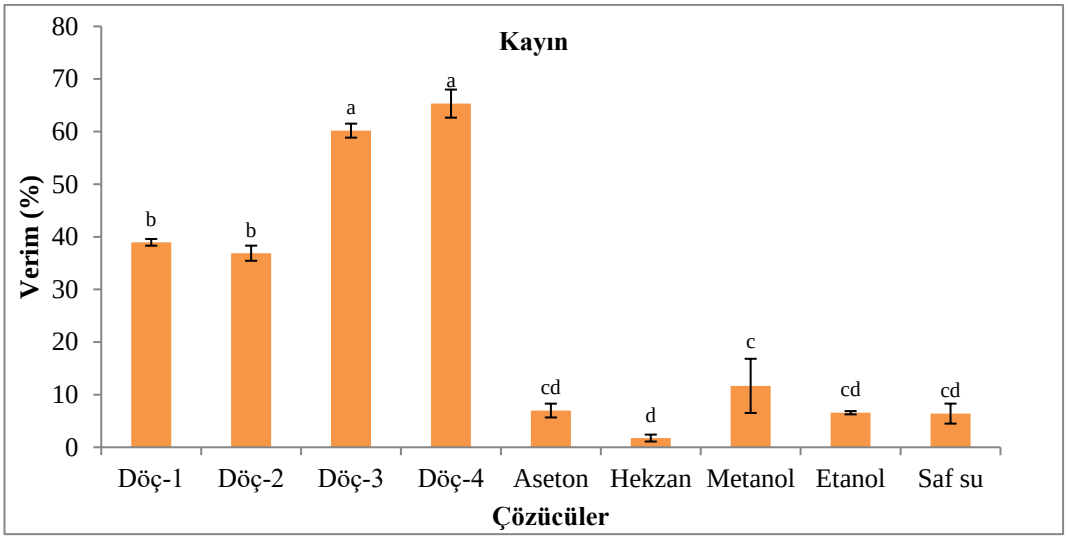
Grafik 5.2. Meşe yıllık sürgün ekstrakt verimi (%) ve istatiksel verim taraması

Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinin her bir çözücü ile ekstraksiyonu sonrası elde edilen ekstraktların verimi Grafik 5.3'de görülmektedir. Grafik incelendiğinde, tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlardan %2,27-56,68 aralığında verim elde edilmiştir. Çözücüler arasında kıyaslama yapıldığında derin ötektik çözücülerden elde edilen göknar ekstraktlarının organik çözücülere göre yaklaşık olarak üç kat daha yüksek verim gösterdiği belirlenmiştir. En yüksek verimi %56,68 ile döç-4 çözücüsünden elde edilen ekstrakt vermiş ve sonrasında sırasıyla bunu %55,17 ile döç-3; %36,62 ile döç-2; %31,38 ile döç-1; %17,3 ile metanol; %8,58 ile aseton; %6,02 ile etanol; %3,77 ile saf su ve %2,27 ile hekzan çözücülerinden elde edilen ekstraktlar takip etmiştir. Wang vd. (2019), yaptıkları çalışmada göknar ağacının kabuklarından, metanol çözücüsü ile süperkritik sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktın verimini %9,3 olarak hesaplamışlardır.



Grafik 5.3. Göknar yıllık sürgün ekstrakt verimi (%) ve istatiksel verim taraması

Dokuz farklı çözücü kullanılarak kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların verimi Grafik 5.4'de verilmektedir. Grafik incelendiğinde, tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlardan %1,75-65,32 aralığında verim hesabı yapılmıştır. Kayından elde edilen ekstraktlar için verim kıyaslaması yapıldığında derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların organik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre yaklaşık beş kat daha yüksek verim gösterdiği düşünülmektedir. En yüksek verim %65,32 ile döç-4 çözücüsünden elde edilen ekstraktda belirlenmişken en düşük verimi ise %1,75 ile hekzandan elde edilen ekstrakt göstermiştir. Mamilla vd. (2019), kayın ağacının odunu ile ChCl:oksalik asit, ChCl:potasyum hidroksit, ChCl:laktik asit ve ChCl:üre olan derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktların, ekstraksiyon süresine ve zamanına göre verimleri karşılaştırılmıştır. ChCl:potasyum hidroksit ve ChCl:oksalik asit çözücülerinden elde edilen ekstraktların 60°C, 80°C ve 100°C'lerdeki ekstraksiyon sıcaklıklarında sırasıyla %40-45; %45-60 ve %45-70 aralığında verim elde edilmiştir. Yine aynı çözücülerin kullanıldığı 2, 4, 6, 8 ve 24 saatlik ekstraksiyon sürelerinde sırasıyla %15-25; %20-30; %30-50; %40-60 ve %50-65 aralığında verim hesaplanmıştır.



Grafik 5.4. Kayın yıllık sürgün ekstrakt verimi (%) ve istatiksel verim taraması

5.2 Uçucu Yağ Verim Sonuçları

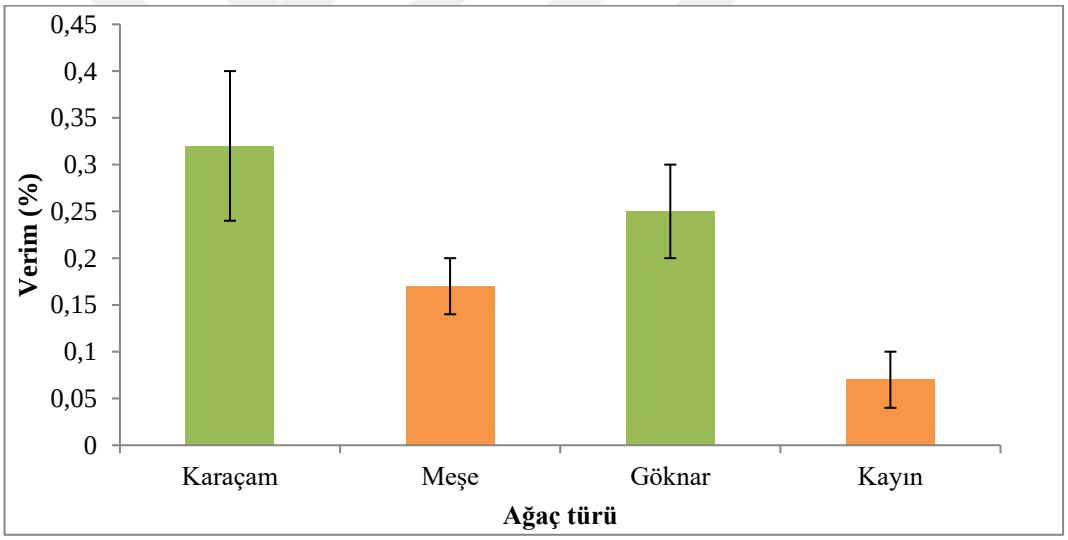
Tablo 5.2'de dört farklı ağaç türünden elde edilen uçucu yağların verimleri yüzde olarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre en yüksek uçucu yağ verimi %0,32 ile karaçam ağacından elde edilmiştir. Karaçamdan elde edilen uçucu yağdan sonra büyükten küçüğe %0,25; %0,17; %0,07 sonuçlarını veren sırasıyla göknar, meşe ve kayın ağaçlarından elde edilen uçucu yağların verimi olmuştur. Literatür incelenip geçmiş çalışmalar ile mevcut tez çalışması karşılaştırıldığında bitkinin toplanma zamanı, kullanılan kısmı gibi çeşitli etkenlerin sonuçlarda farklılıklara sebep olduğu düşünülmektedir (Demirci vd. 2020).

Tablo 5.2. Çalışılan örneklere ait uçucu yağ verimleri (%)

NUMUNE	%
Uçucu yağ oranı-Karaçam	0,32±0,08
Uçucu yağ oranı -Meşe	0,17±0,03
Uçucu yağ oranı -Göknar	0,25±0,05
Uçucu yağ oranı -Kayın	0,07±0,03

Damıtma yöntemi kullanılarak her bir ağaç türünden elde edilen uçucu yağların verimi grafiğe dökülmüştür (Grafik 5.5). Grafik incelendiğinde, tüm ağaç türlerinden elde edilen uçucu yağlar %0,07-0,32 aralığında verim göstermiştir. Saf su çözücüsü için en yüksek verim karaçam ağacı örneklerinden elde edilen uçucu yağda olduğu görülmektedir. En yüksek verimi gösteren karaçam ağacından elde edilen uçucu yağ,

en düşük verimdeki kayın ağacından elde edilen uçucu yağdan yaklaşık beş kat daha yüksek sonuç vermiştir. Genel olarak değerlendirildiğinde iğne yapraklı ağaçlardan elde edilen uçucu yağların veriminin, geniş yapraklı ağaçlardan elde edilen uçucu yağların veriminden daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bunun sebebi olarak, reçine bileşiminde bulunan monoterpenlerin fazlalığı söylenebilir. Bu çalışmada karaçamdan elde edilen uçucu yağın verimi; Sezik vd. (2010) karaçamın genç iğne yapraklarından elde ettikleri %0,44-0,67; Hyeusoo vd. (2013) çam örneklerinin iğne yapraklarından elde ettikleri %0,46-0,56 ve Dağcı vd. (2002), karaçam ağacının yapraklarından elde ettikleri %0,29 oranlarındaki uçucu yağ verim sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Poaty vd. (2015) Weymut çamı ağacının yaprak ve ince dallarından su buharlı damıtma yöntemi ile elde ettikleri uçucu yağın verimini %0,2 oranında elde etmişlerdir.



Grafik 5.5. Çalışılan endüstriyel ağaç türlerinin yıllık sürgün uçucu yağ verimleri (%)

5.3 GC-MS-SPME Yöntemi Analiz Sonuçları

Tablo 5.3'de, GC-MS sistemi ile SPME yöntemi kullanılarak karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinde tespit edilen uçucu bileşenleri yüzde olarak verilmektedir. Analiz sonucuna göre karaçam ağacının bitki örneğinde toplam 65, meşe ağacının bitki örneğinde toplam 91, göknar ağacının bitki örneğinde toplam 59 ve kayın ağacının bitki örneğinde toplam 68 adet uçucu bileşen tespit edilmiştir. Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinin hepsinde majör olan uçucu bileşenler, 1R-α-pinene, .(-)-β-pinene, D-limonene, caryophyllene

ve humulene olmuştur. Karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerindeki en yüksek değeri veren bileşen %15,31 ile caryophyllene olmuştur. Bu bileşenden sonra en yüksek değerleri verenler sırasıyla %14,31 ile germacrene D; %14,19 ile 1R-α-pinene; %6,35 ile δ-cadinene; %5,25 ile γ-muurolene ve %4,73 ile D-limonene bileşenleri olmuştur. Poaty vd. (2015) Weymut çamı ağacının yaprak ve ince dallarından su buharlı damıtma yöntemi ile elde ettikleri uçucu yağ içerisinde, %38,2 α-pinene; %17,8 β-pinene ve %8,1 limonene belirlemişlerdir. Demirci vd. (2020), yaptıkları çalışmada karaçam ağacının iğne yapraklarından su buharlı damıtma yöntemiyle elde ettikleri uçucu yağda, %18,96 α-pinene; %17,46 β-pinene; %9,25 limonene; %10,76 β-caryophyllene ve %16,63 germacrene-D bileşenlerini belirlemişlerdir. Macchioni vd. (2003), karaçam ağacının iğne yaprakları, dalları ve kozalaklarında su buharlı damıtma yöntemini kullanarak uçucu yağ elde etmişler ve içeriğindeki uçucu bileşenleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada, karaçamın iğne yapraklarından elde edilen uçucu yağ içerisinde, %28,4 α-pinene; %6,2 β-pinene; %0,8 limonene; %16,2 β-caryophyllene ve %21,2 germacrene-D bileşenlerini tespit etmişlerdir. Fkiri vd. (2021), karaçam yapraklarından elde ettikleri uçucu yağda %19,34 α-pinene; %0,47 limonene ve %15,65 β-caryophyllene bileşenlerini elde etmişlerdir. Meşe ağacı örneğindeki en yüksek oranı veren uçucu bileşen %14,42 ile 1R-α-pinene olarak tespit edilmiştir. 1R-α-pinene'den sonra sırasıyla yüksek içerik veren bileşenler, %8,13 ile caryophyllene; %8,04 ile 2-hexenal, (E)-; %5,56 ile eugenol; %4,09 ile benzaldehyde ve %3,81 ile D-limonene olarak belirlenmiştir. Karaçam ve meşe ağaçlarındaki uçucu bileşenlerden 1R-α-pinene içeriği yakın değerler vermiştir. Pfeifhofer (1998), yaptığı çalışmada meşe ağacının yapraklarından su buharlı damıtma ile elde ettiği uçucu yağda %18,06 trans-2-hexenal, %0,15 α-pinene; %0,15 β-pinene ve %1,60 nonanal bileşenlerini belirlemiştir.

Tablo 5.3. SPME yöntemi ile karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçları yıllık sürgün uçucu bileşen analizi (%)

		%			
Bileşen Adı	**RT**	**Karaçam**	**Meşe**	**Göknar**	**Kayın**
Acetaldehyde	4,16		0,11		
Formamide	7,80		0,25	0,10	0,45
Furan, 2-ethyl-	8,35		0,23		0,14
Pentanal	9,18		0,07		
Santene	9,60			0,29	

Tablo 5.3. Devamı…

		%			
Bileşen Adı	**RT**	**Karaçam**	**Meşe**	**Göknar**	**Kayın**
1H-Pyrrole, 2,5-dihydro-1-nitroso-	9,61		0,11		
Tricyclene	10,47	0,10		0,60	
2-Propenoic acid, ethenyl ester	10,65		0,11		
1R-α-Pinene	11,13	**14,19**	**14,42**	**17,76**	**25,80**
Camphene	12,93	0,83	0,67	3,02	1,51
Hexanal	13,43		0,54		
: β-Pinene	14,45			0,33	
.(-)-β-Pinene	14,96	**2,60**	**3,20**	**14,18**	**7,09**
2-Pentenal, (E)-	15,40		0,10		
.2,4(10)-Thujadiene	15,65	0,30			0,24
3-Hexenal	15,91		0,11		
(+)-4-Carene	17,01		0,14		0,19
.beta.-Myrcene	17,69	2,55	1,22	3,94	2,84
Heptanal	18,47		0,08		
4-Terpinenyl acetate	18,48			0,17	
1-Hexyn-3-ol	19,07		0,13		
D-Limonene	19,49	**4,73**	**3,81**	**5,07**	**8,45**
2-Hexenal, (E)-	19,90		**8,04**		
.beta.-Phellandrene	19,94	**2,35**		**7,69**	**5,98**
Cosmen	20,18	0,13			
Dodecane	20,49		0,23		0,21
Felbamate	21,78	0,34	0,35	0,47	0,67
.beta.-Ocimene	22,04	1,70			
.β-cis-Ocimene	22,04		0,46	0,18	0,97
2-Heptanol, acetate	22,56			0,51	
p-Cymene	22,81	0,30	0,33	0,31	0,74
Terpinolen	23,61	0,72	0,40	1,76	0,78
Cyclooctyl alcohol	24,69				0,23
(E)-4,8-Dimethylnona-1,3,7-triene	24,74		0,83		
2-Heptanol, (S)-	24,98			0,08	
Butyric acid, 2,2-dimethyl-, vinyl ester	25,08		0,17		
Tridecane	25,28				1,04
6-Methyl-2-Heptanol, acetate	25,41			0,07	
5-Hepten-2-one, 6-methyl-	25,67				0,17
5-Hepten-2-one, 6-methyl-	25,67		0,12		
1-Hexanol	26,33		0,55	0,09	0,90
Dodecane, 1-methoxy-	27,17		0,09		
3-Hexen-1-ol, (Z)-	27,55		1,01		
3-Hexen-1-ol, (E)-	27,55				1,76
2-Hexen-1-ol, (Z)-	27,55				1,02
Decane, 2,3,5,8-tetramethyl-	27,85		0,10		
cis-3-Methylcyclohexanol	28,23		0,20		
Nonanal	28,36		1,35		0,68
1,5-Hexadiene-3,4-diol, 3,4-dimethyl-	28,86				0,23
/7-Octen-2-ol, 2,6-dimethyl-					
1,5-Hexadiene-3,4-diol, 3,4-dimethyl-	28,86		0,25		
Tetradecane	29,68		2,25	0,11	1,58
1-Octanol, 2-butyl-	29,71	0,15			

Tablo 5.3. Devamı…

		%			
Bileşen Adı	**RT**	**Karaçam**	**Meşe**	**Göknar**	**Kayın**
Methoxyacetic acid, pentyl ester	29,90		0,42		
Benzene, (2-methyl-1-propenyl)-	29,96	0,12		0,09	0,26
Benzene, 1,3-dichloro-	30,05	0,20	0,65	0,13	0,51
cis-Linalool oxide (furanoid)	30,26		1,16		0,28
4-Ethylcyclohexanol	30,80		0,24		0,24
2-Nonanol, acetate	31,21			0,13	
Bicyclo[5.2.0]nonane, 4-methylene-2,8,8-trimethyl-2-vinyl-	31,36	0,31			
trans-Linalool oxide (furanoid)	31,37		1,26		0,40
.alpha.-Cubebene	31,70	0,54			
α-Methyl-α-[4-methyl-3-pentenyl]oxiranemethanol	31,72				0,39
2-Decen-1-ol, (E)-	31,99	0,30	0,60		0,52
.alpha.-Campholenal	32,20	0,16			
Trichloroacetic acid, dodec-9-ynyl ester	32,29			0,48	
6-Nonen-1-ol, acetate, (Z)-	32,42			0,09	
1-Eicosanol	32,47		0,08		
Decanal	32,73		0,36		0,26
Isopinocampheol	32,83		0,16		0,56
Ylangene	32,90	0,29			
Benzaldehyde	33,11		4,09	0,29	1,22
Copaene	33,32	0,71	0,37		
1-Octanol, 2-butyl-	33,90		0,27		0,18
6-epi-shyobunol	34,24		0,16		
Linalool	34,48				0,26
(-)-.beta.-Bourbonene	34,49		1,53		
5-Octen-2-ol, 5-methyl-	34,86			0,07	
Isocamphopinone	34,94	0,18		0,14	0,56
β-Maaliene	35,03		3,58		
5-Tridecene, (Z)-	35,06				0,41
Linalyl acetate	35,18	0,74		0,80	0,43
Pinocarvone	35,84	0,08			
.gamma.-Muurolene	35,92			0,35	
Fenchol, exo-	36,37			0,11	
Bornyl acetate	36,58			0,59	
.(-)-Bornyl acetate	36,59	0,83	0,19		
1,2-15,16-Diepoxyhexadecane	36,96		0,08		0,27
.β-Copaene	36,96	0,55	0,39		
.(±)-β-Copaene	36,98	0,70			
Terpinen-4-ol	37,27	0,17		0,43	
Ledol	37,35		0,34		
trans-Dihydrocarvone	37,59	0,15			
Dihydrocarvone	37,59				0,27
Caryophyllene	37,94	**15,31**	**8,13**	**9,61**	**11,29**
α-Longipinene	38,18			0,71	
α-Selinene	38,26		0,55		
1,2-15,16-Diepoxyhexadecane/Bicyclo[3.1.1]heptan-2-ol, 2,6,6-trimethyl-	38,34		0,40		
(-)-Myrtenol	38,35	0,16			

Tablo 5.3. Devamı…

		%			
Bileşen Adı	**RT**	**Karaçam**	**Meşe**	**Göknar**	**Kayın**
Isogermacrene D	38,58	0,08			
Acetophenone	38,79	0,09	1,13		0,86
Sabinyl acetate	38,96		0,15	0,10	0,16
Sabinyl acetate/Copaene	39,30	0,48			
.beta.-copaene	39,54	0,81	0,29		0,19
α-Himachalene	39,68			0,09	
Rotundene	39,75		1,11		
3,7-Cycloundecadien-1-ol, 1,5,5,8-tetramethyl-	39,87		0,16		
cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	40,12			0,16	
cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol/cis-Verbenol	40,14				0,13
cis-Verbenol	40,15	0,62			
.(-)-β-Cadinene	40,29	0,26			
.ε-Muurolene	40,44	0,39			
Humulene	40,68	**3,44**	**1,12**	**4,59**	**1,45**
Chamigren/L-.alpha.-Terpineol	40,84				0,29
.alpha.-Terpineol	40,84	1,13		1,45	
Chamigren	40,84		0,64		
Isobornyl formate	41,05	1,92	0,63	2,83	0,82
γ-Muurolene	41,35	**5,25**			
2-Isopropenyl-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene	41,39			3,00	
.gamma.-Muurolene	41,56		0,72	0,16	1,62
trans-Z-.alpha.-Bisabolene epoxide	41,62		0,14		
p-Mentha-1,5-dien-8-ol	41,73	0,13			
4,5-di-epi-aristolochene	41,88			0,08	
Germacrene D	42,09	**14,31**	1,05		**4,26**
trans-Linalool 3,7-oxide	42,14		0,33		
.alpha.-ylangene	42,31	2,13	0,10	0,19	0,57
Aromandendrene	42,47			0,64	
α-Muurolene/Aromandendrene	42,48		0,63		
α-Muurolene	42,49				0,55
.alpha.-Muurolene	42,50	2,40			
.γ-Gurjunene	42,62		2,58		
.β-Selinene	42,73			2,47	
Epoxylinalol	42,89		0,22		
.beta.-ylangene	42,93	0,27			
Methyl salicylate	43,38		3,24		0,22
δ-Cadinene	43,57	6,35	1,35		1,51
.γ-Cadinene	43,69	3,37	0,41	0,09	0,80
(-)-.alpha.-Panasinsen	43,90			1,33	
(-)-Myrtenol	44,01	0,23			
Selina-3,7(11)-diene/.γ-Gurjunene	44,42			0,12	
Naphthalene, 1,2,3,4,4a,7-hexahydro-1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-	44,46	0,48			
Teresantalol	44,54			0,12	
.α-Cadinene	44,74	1,17	0,11		0,20
Hexanoic acid	45,32		1,87		0,17
2,6-Octadien-1-ol, 2,7-dimethyl-	45,49				0,19
Hexanoic acid, 6-bromo-	45,49		0,14		

Tablo 5.3. Devamı…

		%			
Bileşen Adı	**RT**	**Karaçam**	**Meşe**	**Göknar**	**Kayın**
.(-)-Calamenene	45,82	0,16			
Dodecanoic acid, ethyl ester	46,00	0,17			
5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (Z)-	46,04				0,33
Benzyl alcohol	46,12		2,49		1,45
3-O-Benzyl-d-glucose	46,27		0,09		
7-Tridecanone	47,01			0,08	
Phenylethyl Alcohol	47,21	0,50	0,35		0,71
Heptanoic acid	48,38		0,08		
3-Hexenoic acid, (E)-	48,53		0,43		
trans-.beta.-Ionone	48,55				0,21
2-Hexenoic acid, (E)-	48,68		2,27		0,42
.alpha.-Calacorene	48,15	0,15			
Methyleugenol	49,93	0,27		0,07	
3-Carene, 4-acetyl-	49,93		0,11		
1,3,5-Triazine-2,4(1H,3H)-dione, 6-(ethylamino)-	50,13		0,10		
Caryophyllene oxide	50,15	0,19		0,14	
d-Glycero-d-ido-heptose	51,11		0,35		
E-2-Hexenyl benzoate	51,92		0,20		
.γ-Eudesmol	52,89			0,19	
3-Hexen-1-ol benzoate	53,03				0,13
3-Hexen-1-ol, benzoate, (Z)-	53,03		1,94		
Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-	53,52				0,17
Eugenol	53,53		**5,56**		
Selin-6-en-4.alpha.-ol	54,11			0,49	
.tau.-Cadinol	54,17	0,10			
Cyclohexene, 1,5,5-trimethyl-6-acetylmethyl-	54,47				0,15
Epiglobulol	54,53	0,25			
.alpha.-Cadinol	55,50	0,16			
.(+)-Intermedeol	55,70			**10,47**	
Juniper camphor	56,95			0,13	
Diethyl Phthalate	57,98		0,49		
Manoyl oxide	58,80	0,15			
Epimanoyl oxide	59,23	0,11			
Toplam		**99,91**	**99,62**	**99,74**	**99,54**

RT: Alıkonma zamanı

Analiz sonucunda göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerindeki uçucu bileşenler içerisinde en yüksek değeri veren %17,76 ile 1R-α-pinene olmuştur. Daha sonrasında büyükten küçüğe sırasıyla, (-)-β-pinene %14,19; .(+)-ıntermedeol %10,47; caryophyllene %9,61; .beta.-phellandrene %7,69; D-limonene %5,07 ve humulene %4,59 değerlerini vermiştir. Baran vd. (2007), göknar ağacının iğne yapraklarından sulu damıtma yöntemi ile elde ettikleri uçucu yağda %17,6 α-pinene; %2,2 β-pinene; %6,2 limonene ve %6,5 germacrene-B bileşenlerini GC-MS analizi ile

belirlemişlerdir. Poaty vd. (2015) göknar ağacının yaprak ve ince dallarından su buharlı damıtma yöntemi ile elde ettikleri uçucu yağ içerisinde, %31,1 β-pinene; %14,4 α-pinene ve %8,5 limonene bileşenlerini elde etmişlerdir. Pulatoğlu vd. (2022), göknar ağacının yaprak ve dallarını kullanarak elde etikleri uçucu yağda %12,83 α-pinene; %1,58 β-phellandrene; %3,78 β-pinene; %3,46 camphene ve %3,49 caryophyllene bileşenlerini belirlemişlerdir. Kayın ağacı yapraklı yıllık sürgünleri için ise elde edilen uçucu bileşenler arasında en yüksek değeri %25,80 ile 1R-α-pinene vermiştir. 1R-α-pinene'den sonra sırasıyla büyükten küçüğe doğru %11,29 ile caryophyllene; %8,45 ile 2-hexenal, (E)-; %7,09 ile .(-)-β-pinene ve %5,98 ile beta.-phellandrene uçucu bileşenleri tespit edilmiştir. Pawlowski vd. (2020), yaptıkları çalışmada kayın ağacının yapraklarından elde ettikleri uçucu yağda %2,79 α-β-pinene; %28,27 sabinene; %14,28 α-terpinene; %0,31 (R)-(+)-limonene ve %10,85 (Z)-3-hexen-1-ol bileşenlerini tespit etmişlerdir.

Sezik vd. (2010), yaptıkları çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden topladıkları karaçam ağacının iğne yapraklarından elde ettikleri uçucu yağların içeriğini incelemişler ve bölgelere göre uçucu bileşenlerdeki değişimi gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre hemen hemen her uçucu yağda α-pinene'nin β-pinene'den daha yüksek oranda bulunduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bitkilerin bulunduğu bölge, toplandığı mevsim, kullanılan kısmı gibi çeşitli özelliklerin uçucu bileşenler bakımından değişikliğe sebep olabileceği düşünülmektedir (Demirci vd. 2020). Birçok ağaç örneğinden elde edilen uçucu yağlar, içerisinde bol olarak bulunan α-pinene ve β-pinene bileşenlerinin antioksidan, antienflamatuar, antifungal, antibakteriyel ve antikanser etkilerinden dolayı sağlık alanında etkin olarak değerlendirilmektedir. Limonene ise, tat ve koku bakımından etkin bir bileşen olarak kozmetik sektöründe, herbisitlerin içeriğinde yağ çözücü olarak ve alternatif tıpta reflü gibi mide hastalıklarında tedavi edici kullanımı gibi çeşitli özellikleri bakımından önemli bir bileşendir (Aydın vd. 2013; Sharma vd. 2017; Vieira vd. 2018).

5.4 HPLC Analiz Sonuçları

5.4.1 HPLC – Şeker Analiz Sonuçları

Tablo 5.4'de dokuz farklı çözücü ile dört farklı ağaç türünden elde edilen ekstraktların HPLC analizi ile 1 g katı madde içeriğindeki şeker miktarları g/L cinsinden verilmiştir. HPLC analizi ile her bir ekstrakt içeriğinde maltoz, glikoz, fruktoz, turanoz, sükroz, ksiloz ve arabinoz olmak üzere yedi şeker içeriği belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre 36 ekstrakt içerisinden, 28 ekstraktda glikoz, 27 ekstraktda fruktoz, 19 ekstraktda sükroz ve 14 ekstraktda ksiloz şekerlerinin yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Genel olarak sonuçlar incelendiğinde derin ötektik çözücülerin kullanıldığı ekstraklardaki şeker içeriği, organik çözücülerin kullanıldığı ekstraktlardaki şeker içeriğinden daha yüksek sonuçlar vermiştir. Kwon vd. (2020), *Pinus densiflora* ağacının öz ve diri odun kısımlarından DÖÇ kullanılarak ekstraktlar elde etmiş ve verimlerini hesaplamışlardır. Hesaplamalar sonucunda, toplam şeker (glukoz, ksiloz, mannoz, galaktoz, arabinoz) içeriği; diri odun için %72,3; öz odun için %77,5 olarak belirlenmiştir. Zhang vd. (2016), kaynatma yöntemi ile farklı DÖÇ çözücüleri kullanılarak elde edilen ekstraktlarda glikoz verimini araştırmışlardır. Bu sonuçlara göre ChCl:gliserol çözücüsünden %96,4; ChCl:etilen glikol çözücüsünden %85,3 ve ChCl:laktik asit çözücüsünden %83,5 oranlarında glikoz verimleri elde edilmiştir. Farklı bir çalışmada Procentese vd. (2015), mısır koçanını su banyosu yöntemi ile üç farklı DÖÇ kullanarak ekstrakte etmişler ve HPLC şeker analizi sonucunda toplam şeker içeriğini ChCl:gliserol, ChCl:üre ve ChCl:imidazol çözücüleri için sırasıyla 37,8g/100g; 20,9 g/100g ve 35,9 g/100g olarak tespit etmişlerdir. Bu tez çalışmasında hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktların veriminin düşük olması ve odunun ana bileşenlerini çözme kabiliyetinin iyi olmaması düşünüldüğünden, hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktlarda şeker içeriğine rastlanmamıştır. Analiz sonucuna göre 36 numune içerisinden en yüksek şeker içeriğini, döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktlardaki 9,759-195,948 g/L aralığında turanoz şekeri vermiştir. Turanoz yoğun olarak balda bulunan bir şekerdir. Arıların bitkilerden topladığı polenlerle yapmış olduğu bal içeriğinde turanoz miktarının fazla olması ile bu çalışmada kullanılan ağaç örneklerinin sürgünlerinin arılar tarafından bal yapımında polen olarak kullanıldığı düşünülmüştür. 36 ekstrakt için yedi farklı şeker içeriğinin

araştırıldığı HPLC analiz sonuçlarına göre, maltoz 0,025-82,393 g/L; glikoz 0,005-0,436 g/L; fruktoz 0,096-0,440 g/L; turanoz 19,759-195,948 g/L; sükroz 0,006-1,662 g/L; ksiloz 0,014-0,418 g/L aralığında ve son olarak da arabinoz tek bir ekstraktda 0,282 g/L değerini vermiştir. Bu tez çalışmasında dört farklı ağaç türü ve dokuz farklı çözücü kullanarak elde edilen 36 ekstraktın şeker analizi sonuçlarına göre çözücüler içerisinden derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların şeker içeriğinin yüksek olması, ağaç örneklerindeki selüloz, hemiselüloz ve lignini çözmede derin ötektik çözücülerin kabiliyetinin iyi olmasından kaynaklandığı literatürdeki Kumar vd. (2016), Alvarez-Vasco vd. (2016), Garcia-Villalba vd. (2017), Kwon vd. (2021), Wu vd. (2021), çalışmalarla da desteklenmektedir.

Tablo 5.4. HPLC şeker analizi (g/L)

Numune	**Maltoz**	**Glikoz**	**Fruktoz**	**Turanoz**	**Sükroz**	**Ksiloz**	**Arabinoz**
Döç-1+Kç	0,025	0,128	0,271	-	0,337	0,198	-
Döç-1+M	-	0,306	0,296	-	0,815	0,273	-
Döç-1+G	-	0,265	0,195	-	0,887	0,116	-
Döç-1+K	-	0,095	0,276	-	0,144	0,108	-
Döç-2+Kç	-	0,188	0,208	-	0,659	0,214	-
Döç-2+M	-	0,279	0,393	-	1,041	-	-
Döç-2+G	-	0,246	0,252	-	0,837	0,267	-
Döç-2+K	-	0,292	0,305	-	1,662	0,418	-
Döç-3+Kç	27,698	-	0,189	64,110	-	-	-
Döç-3+M	8,725	0,052	-	19,759	-	-	-
Döç-3+G	17,903	-	-	42,056	-	-	-
Döç-3+K	82,393	-	0,440	195,948	0,950	0,211	0,282
Döç-4+Kç	-	0,088	0,154	-	0,228	0,089	-
Döç-4+M	-	0,079	0,207	-	0,234	0,231	-
Döç-4+G	-	0,112	0,143	-	0,332	0,086	-
Döç-4+K	-	0,112	0,236	-	0,285	0,207	-
Aseton+Kç	-	0,005	0,096	-	-	-	-
Aseton+M	-	0,005	0,098	-	-	-	-
Aseton+G	-	0,020	0,099	-	-	-	-
Aseton+K	-	0,013	0,107	-	-	-	-
Hekzan+Kç	-	-	-	-	-	-	-
Hekzan+M	-	-	-	-	-	-	-
Hekzan+G	-	-	-	-	-	-	-
Hekzan+K	-	-	-	-	-	-	-
Metanol+Kç	-	0,026	0,107	-	-	-	-
Metanol+M	-	0,074	0,106	-	0,049	-	-
Metanol+G	-	0,041	0,109	-	0,011	-	-

“-’’: içerik tespit edilemedi.

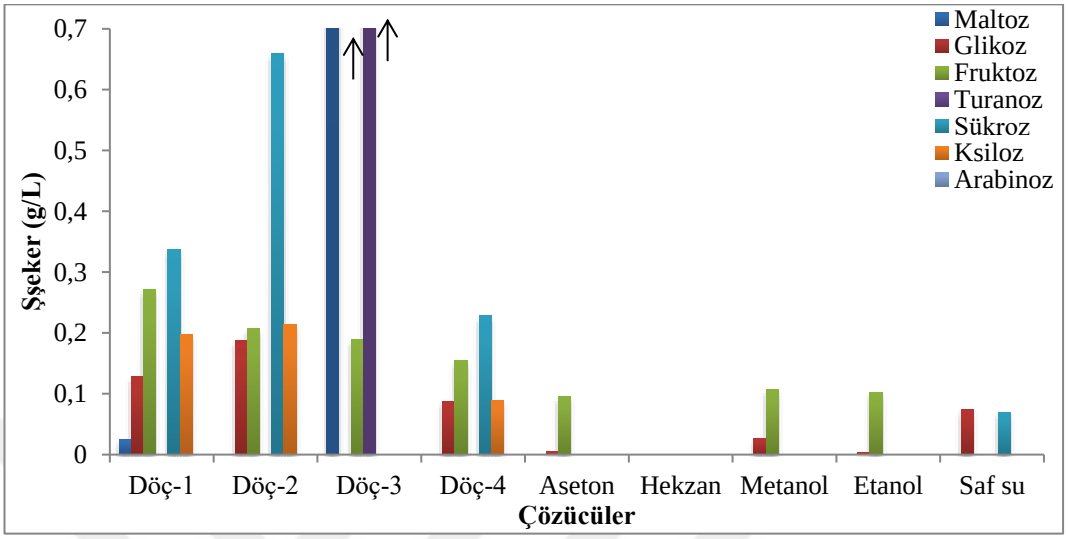
Tablo 5.4. Devamı…

Numune	Maltoz	Glikoz	Fruktoz	Turanoz	Sükroz	Ksiloz	Arabinoz
Metanol+K	-	0,027	0,135	-	-	0,042	-
Etanol+Kç	-	0,004	0,102	-	-	-	-
Etanol+M	-	0,029	0,119	-	0,006	0,014	-
Etanol+G	-	0,016	0,098	-	-	-	-
Etanol+K	-	0,013	0,106	-	-	-	-
Saf su+Kç	-	0,074	-	-	0,069	-	-
Saf su+M	-	0,212	-	-	0,700	-	-
Saf su+G	-	0,436	-	-	0,508	-	-
Saf su+K	-	-	0,153	-	-	-	-

"-'': içerik tespit edilemedi.

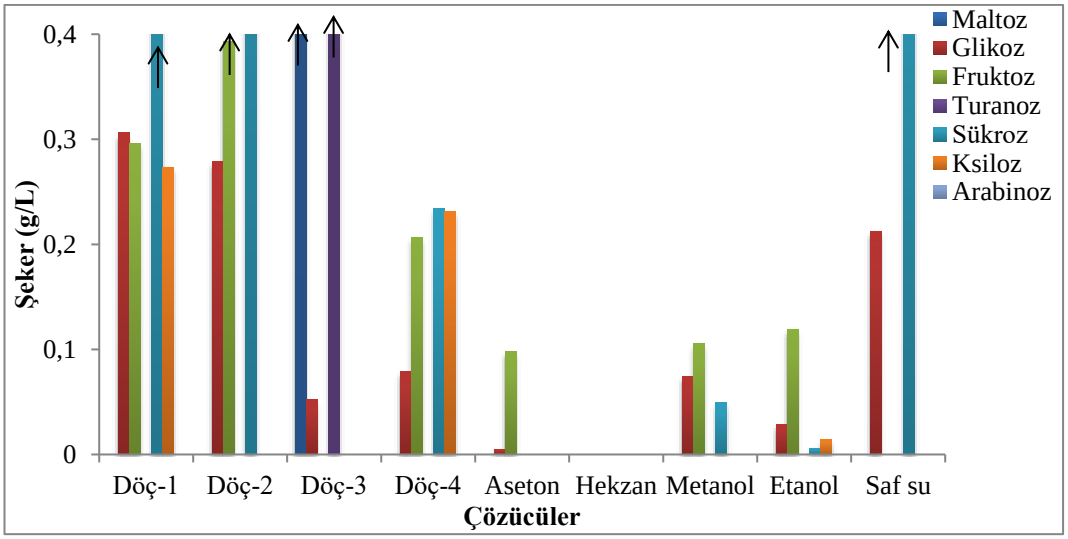
Her bir çözücü kullanılarak karaçam ağacından elde edilen ekstraktların şeker içeriği Grafik 5.6'da verilmiştir. Grafik incelendiğinde derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlardaki şeker içeriğinin yüksek olması hemen hemen her çözücüden elde edilen ekstraktlarda yedi farklı şeker içerisinden glikoz, fruktoz, içeriği belirlenirken, turanoz ve maltoz içeriği az sayıda ekstraktda elde edilmiş ve arabinoz hiçbir ekstraktda belirlenememiştir. Yapılan HPLC şeker analizinde tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek içeriğe rastlanan 64,110 g/L değerini veren döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki turanoz olmuştur. Bunu takip eden ise yine döç-3 çözücüsünden elde edilen 27,698 g/L değerini veren maltoz olmuştur. En düşük şeker içeriklerini ise 0,004 g/L ve 0,005 g/L değerlerini veren sırasıyla etanol ve aseton çözücülerinden elde edilen ekstraktlardaki glikoz olmuştur. Çözücüler arasındaki şeker içeriği değerlendirildiğinde derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlarda organik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre daha fazla türde şekere rastlanmıştır. Hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktda ise hiçbir şeker içeriğine rastlanmamıştır. Döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktda nitelik olarak çok çeşitli şeker bulunmuyor olsa da nicelik olarak yüksek içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. Döç-1 çözücüsünden elde edilen ekstraktda ise nicelik bakımından diğer çözücülerden çok farklı olmasa da çok sayıda şeker türü içerdiği tespit edilmiştir. Benouadah vd. (2019), hekzan ve aseton çözücülerini kullanarak çam ağacının diri odunundan elde ettikleri ekstraktda 35,19 mg^{-1} g glikoz; 47,98 mg^{-1} g ksiloz; 12,90 mg^{-1} g arabinoz ve öz odunlarından elde edilen ekstraktda ise 38,30 mg^{-1} g glikoz; 52,47 mg^{-1} g ksiloz; 14,00 mg^{-1} g arabinoz içeriğini belirlemişlerdir. Yine benzer bir çalışmada Kwon vd. (2020), çam ağacının diri ve öz odunlarından derin ötektik çözücüler kullanılarak elde ettikleri ekstraktların şeker analizinde diri odundan elde ettikleri ekstraktda, %46,5

glikoz, %6,3 ksiloz, %2 arabinoz; öz odundan elde ettikleri ekstraktda, %48,9 glikoz, %8,7 ksiloz, %2,5 arabinoz, sonuçlarını elde etmişlerdir.



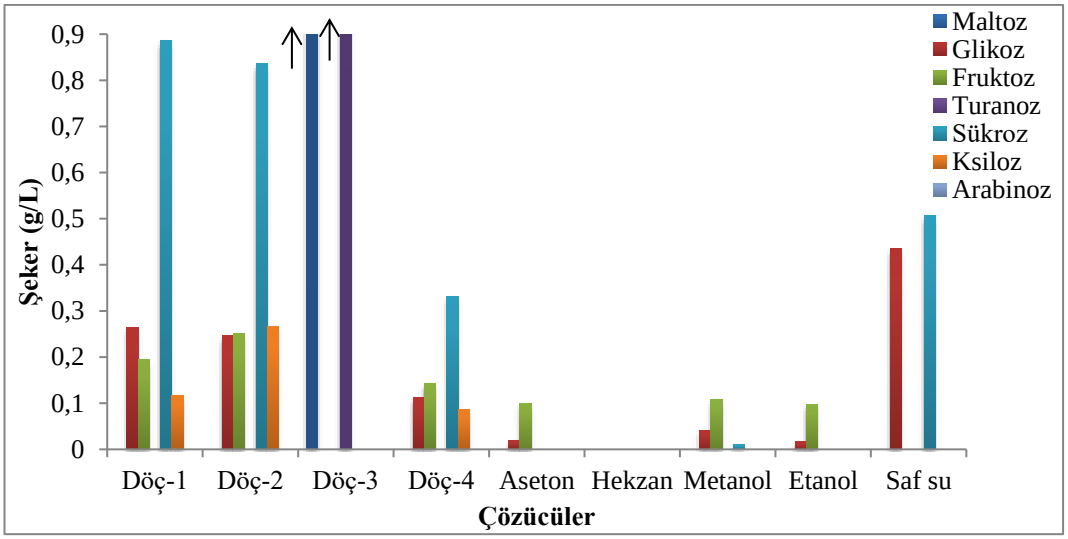
Grafik 5.6. Karaçam ağacından elde edilen ekstraktların HPLC şeker analizi (g/L)

Her bir çözücü kullanılarak meşe ağacından elde edilen ekstraktların şeker içeriği Grafik 5.7'de verilmiştir. Hemen hemen her çözücüden elde edilen ekstraktlarda yüksek glikoz ve fruktoz içeriği belirlenirken, turanoz ve maltoz içeriği az sayıda ekstraktda elde edilmiş ve arabinoz içeriğine hiçbir ekstraktda rastlanmamıştır. Yapılan HPLC şeker analizinde tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek içeriğe rastlanan 19,759 g/L değerini veren döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki turanoz olmuştur. Bunu takip eden ise yine döç-3 çözücüsünden elde edilen 8,725 g/L değerini veren maltoz olmuştur. En düşük şeker içeriklerini ise 0,005 g/L ile aseton çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki glikoz ve 0,006 g/L değerini veren etanol çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki sükroz vermiştir. Çözücüler arasındaki şeker içeriği değerlendirildiğinde derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlarda organik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre daha fazla türde şekere rastlanmıştır. Hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktda ise hiçbir şeker içeriğine rastlanmamıştır. Döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstrakt nitelik olarak çok çeşitli şeker bulundurmuyor olsa da nicelik olarak yüksek içeriğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Romero-Rodriguez vd. (2018), meşe ağacı tohumlarının şeker analizi sonucuna göre, tohumun en dış katmanında 3,0 µg g^{-1} glikoz, 6,7 µg g^{-1} fruktoz ve tüm katmanlarda 28 µg g^{-1} - 83 µg g^{-1} aralığında sükroz şekerlerini tespit etmişlerdir.



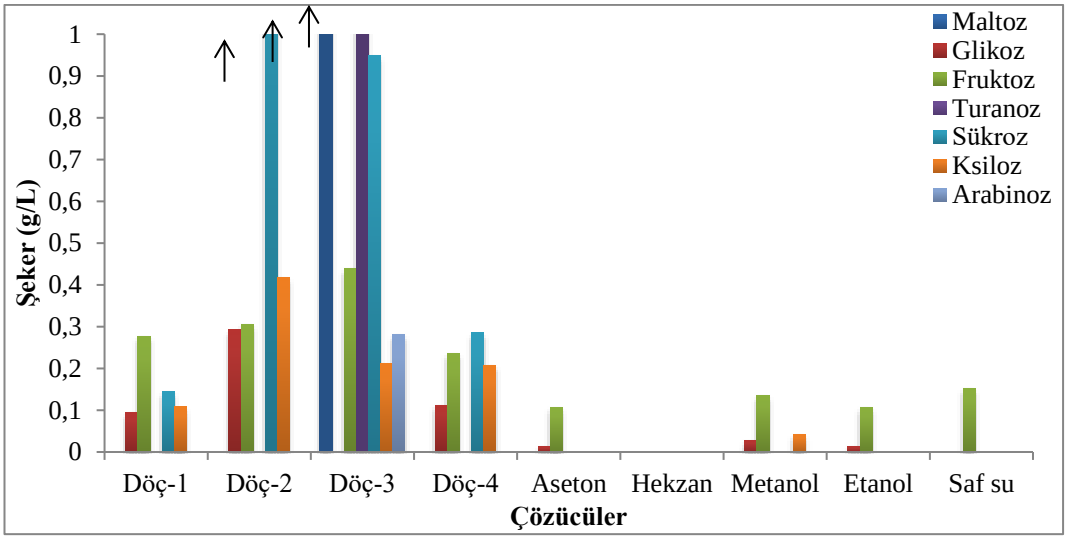
Grafik 5.7. Meşe ağacından elde edilen ekstraktların HPLC şeker analizi (g/L)

Her bir çözücü kullanılarak göknar ağacından elde edilen ekstraktların şeker içeriği Grafik 5.8'de verilmiştir. Hemen hemen her çözücüden elde edilen ekstraktlarda yüksek glikoz ve fruktoz içeriği belirlenirken, maltoz ve turanoz içeriği az sayıda ekstraktda elde edilmiş ve arabinoz içeriğine hiçbir ekstraktda rastlanmamıştır. Yapılan HPLC şeker analizinde tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek içeriğe rastlanan 42,056 g/L değerini veren döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki turanoz olmuştur. Bunu takip eden ise yine döç-3 çözücüsünden elde edilen 17,903 g/L değerini veren maltoz olmuştur. En düşük şeker içeriklerini ise 0,011 g/L ile metanol çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki sükroz ve 0,016 g/L değerini veren etanol çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki glikoz vermiştir. Çözücüler arasındaki şeker içeriği değerlendirildiğinde derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlarda organik çözücülerden elde edilen ekstraktlara nazaran daha fazla türde şekere rastlanmıştır. Hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktda ise hiçbir şeker içeriğine rastlanmamıştır. Döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstrakt nitelik olarak çok çeşitli şeker bulundurmuyor olsa da nicelik olarak yüksek içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Shaaban vd. (2020), göknar ağacının şeker içeriğini belirlemek için gerçekleştirdikleri analize göre, %12 glikoz, %13 fruktoz, %51 sükroz belirlemişlerdir.



Grafik 5.8. Göknar ağacından elde edilen ekstraktların HPLC şeker analizi (g/L)

Her bir çözücü kullanılarak kayın ağacından elde edilen ekstraktların şeker içeriği Grafik 5.9'da verilmiştir. Hemen hemen her çözücüden elde edilen ekstraktlarda yüksek glikoz ve fruktoz içeriği belirlenirken, turanoz ve maltoz içeriği az sayıda ekstraktda elde edilmiştir. Yapılan HPLC şeker analizinde tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek içeriğe rastlanan 195,948 g/L değerini veren döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki turanoz olmuştur. Bunu takip eden ise yine döç-3 çözücüsünden elde edilen 82,393 g/L değerini veren maltoz olmuştur. En düşük şeker içeriklerini ise 0,013 g/L değerlerini veren sırasıyla aseton ve etanol çözücülerinden elde edilen ekstraktlardaki glikoz vermiştir. Çözücüler arasındaki şeker içeriği değerlendirildiğinde derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlarda organik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre daha fazla türde şekere rastlanmıştır. Hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktda ise hiçbir şeker içeriğine rastlanmamıştır. Döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktda nitelik ve nicelik bakımından yüksek şeker içeriği tespit edilmiştir. Kabeya ve Han (2022), yaptıkları çalışmada kayın ağacından elde edile ekstraktın şeker analizinde %25,9 sükroz, %5,70 glikoz, %8,15 fruktoz, %0,01 maltoz sonucunu elde etmişlerdir.



Grafik 5.9. Kayın ağacından elde edilen ekstraktların HPLC şeker analizi (g/L)

5.4.2 HPLC – Organik asit Analiz Sonuçları

Yapısında karboksil (-COOH) grubu bulunduğu için karboksilli asitler de denen organik asitler, bitki dokularında ve köklerinde bulunmaktadır. Düz karbon zincir yapısındaki organik asitlerin, küçük moleküler boyutları sayesinde hücreler arasında serbestçe hareket edebilme avantajları olduğundan fotosentez mekanizmasında pH ve iyon dengesinin sağlanması için hücreler arası madde geçişlerinde önemli rol oynamaktadırlar (Çağlar ve Demirci, 2017; Wang vd. 2015). Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen 36 ekstraktın HPLC analizi ile 1 g katı madde içeriğindeki organik asit miktarları g/L cinsinden Tablo 5.5'de verilmiştir. HPLC analizi ile her bir ekstrakt içeriğinde tartarik asit, pirüvik asit, laktik asit, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asit olmak üzere altı organik asit araştırılmıştır. Organik asit içeriği araştırılan 36 ekstrakt içerisinden, 25 ekstraktda laktik asit, 35 ekstraktda propiyonik asit, 1'er ekstrakda tartarik asit ve pirüvik asit tespit edilmiş. Ancak asetik asit ve bütirik asit içeriğine hiçbir ekstraktda rastlanmamıştır. Analiz sonuçlarına göre ekstraktlarda; laktik asit ve propiyonik asit'in yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Ahonen-Jonnarth vd. (2000) yaptıkları çalışmada *Pinus sylvestris* köklerinde HPLC analizi ile 17 farklı (asetik asit, bütirik asit, laktik asit, malik asit, malonik asit, propiyonik asit, pirüvik asit, izo-bütirik asit, sitrik asit, t-akonitik asit, formik asit, fumarik asit, glukonik asit, glutarik asit, oksalik asit, tartarik asit ve şikimik asit) organik asit araştırmışlardır. Sonuçlara göre, laktik asit ile propiyonik asitin diğer asitlere göre

yüksek derişimlerde bulunduğunu belirlemişlerdir. Tüm organik asitler içerisinde en yüksek derişimi veren ise oksalik asit olmuştur. Genel olarak sonuçlar incelendiğinde derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların organik çözücülerden elde edilen ekstraktlardan daha fazla organik asit içerdiği gözlemlenmiştir. Odundaki karbonhidratları çözme kabiliyeti iyi olan derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların yüksek verimde olmaları ile ilişkili olarak söz konusu bu ekstraktların organik asit içeriklerinin de yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Organik asit içeriklerinin belirlendiği analiz sonucuna göre laktik asit 0,085-6,470 g/L; propiyonik asit 0,147-0,370 g/L aralığında; tartarik asit sadece bir ekstraktda 0,005 g/L ve pirüvik asitde sadece bir ekstraktda 0,002 g/L değerinde sonuçlar vermiştir. Cadahia vd. (1991), kayın ağacının yapraklarından elde ettikleri ekstraktın karakterizasyonunu gerçekleştirmişler ve 1,20 µg/g pirüvik asit, 70,3 µg/g laktik asit değerlerini elde etmişlerdir. Wang vd. (2015), çam ağacının tohumlarından elde ettikleri ekstraktın organik asit içeriğini analiz etmişler ve %23,7 oksalik asit, %37,2 sitrik asit, %41,3 tartarik asit, %29,4 malik asit, %33,6 malonik asit, %42,8 süksinik asit sonuçlarını elde etmişlerdir. Ghadiriasli vd. (2020), çam ağacı odunun karakterizasyonunu gerçekleştirmiş ve 128 µg/g asetik asit belirlemişlerdir. Fotosentezin ilk ürünü olan ve mitokondride üretilen organik asitler, aminoasit biyosentezi, enerji üretimi ve çevreye adaptasyonun sağlanması gibi bitki metabolizmasında merkezi bir konuma sahip olduğundan diğer birçok bileşiğin sentezinde de önemli görevi bulunmaktadır. Organik asitlerin, karbonhidratlar, yağlar ve proteinlerle olan metabolik ilişkileri onları özel kılmakta ve bitkilerdeki fenolik asitlerin, organik asitlerle esterleşmiş halde bulunması da buna örnek verilebilmektedir (Lopez-Bucio vd. 2000; Wang vd. 2015).

Tablo 5.5. HPLC organik asit analizi (g/L)

Numune	**Tartarik asit**	**Pirüvik asit**	**Laktik asit**	**Asetik asit**	**Propiyonik asit**	**Bütirik asit**
Döç-1+Kç	-	-	2,708	-	0,370	-
Döç-1+M	-	-	0,100	-	0,221	-
Döç-1+G	-	-	2,978	-	0,242	-
Döç-1+K	-	-	0,123	-	0,219	-
Döç-2+Kç	-	-	6,470	-	0,248	-
Döç-2+M	-	-	0,085	-	0,228	-
Döç-2+G	-	-	3,061	-	0,204	-
Döç-2+K	-	-	0,132	-	0,261	-

“-’’: içerik tespit edilemedi.

Tablo 5.5. Devamı…

Numune	Tartarik asit	Pirüvik asit	Laktik asit	Asetik asit	Propiyonik asit	Bütirik asit
Döç-3+Kç	-	-	0,145	-	0,210	-
Döç-3+M	-	-	0,097	-	0,246	-
Döç-3+G	-	0,002	0,154	-	0,211	-
Döç-3+K	-	-	0,106	-	0,215	-
Döç-4+Kç	-	-	4,203	-	-	-
Döç-4+M	-	-	-	-	0,225	-
Döç-4+G	-	-	2,950	-	0,233	-
Döç-4+K	-	-	0,100	-	0,217	-
Aseton+Kç	-	-	0,526	-	0,245	-
Aseton+M	-	-	-	-	0,193	-
Aseton+G	-	-	0,540	-	0,235	-
Aseton+K	-	-	0,131	-	0,199	-
Hekzan+Kç	-	-	-	-	0,231	-
Hekzan+M	-	-	-	-	0,208	-
Hekzan+G	-	-	-	-	0,242	-
Hekzan+K	-	-	-	-	0,221	-
Metanol+Kç	-	-	1,848	-	0,207	-
Metanol+M	-	-	-	-	0,216	-
Metanol+G	-	-	0,986	-	0,218	-
Metanol+K	-	-	-	-	0,296	-
Etanol+Kç	-	-	0,349	-	0,204	-
Etanol+M	-	-	-	-	0,237	-
Etanol+G	-	-	0,414	-	0,233	-
Etanol+K	-	-	0,185	-	0,238	-
Saf su+Kç	-	-	4,021	-	0,200	-
Saf su+M	-	-	-	-	0,210	-
Saf su+G	0,005	-	0,923	-	0,147	-
Saf su+K	-	-	-	-	0,168	-

“-’’: içerik tespit edilemedi.

Her bir çözücü kullanılarak karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlarda laktik asit ve propiyonik asit içeriği belirlenirken, tartarik asit, pirüvik asit, asetik asit ve bütirik asit tespit edilememiştir. Yapılan HPLC organik asit analizinde tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek içeriğe rastlanan 6,470 g/L değerini veren döç-2 çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki laktik asit olmuştur. Bu sonuca yakın olarak döç-4 çözücüsünden elde edilen 4,203 g/L ve saf su çözücüsünden elde edilen 4,021 g/L değerlerini veren laktik asit olmuştur. En düşük organik asit içeriğini ise 0,145 g/L değerini veren döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki laktik asit olmuştur.

Meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen 36 ekstraktda propiyonik asit içeriği belirlenirken, tartarik asit, pirüvik asit, asetik asit ve bütirik asit tespit edilememiştir. Laktik asit ise sadece döç-1, döç-2 ve döç-3 çözücüleri kullanılarak elde edilen ekstraktlarda tespit edilmiştir. Organik asit içeriğinin araştırıldığı analiz sonuçlarına göre tüm ekstraktlarda, laktik asit 0,097-0,100 g/L; propiyonik asit ise 0,193-0,246 g/L aralığında değerler vermiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar ile organik çözücülerden elde edilen ekstraktlar arasında çok fark olmasa da derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların organik çözücülerden elde edilen ekstraktlardan farklı olarak laktik asit içeriğide verdiği gözlemlenmiştir.

Dokuz farklı çözücü kullanılarak göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlar içerisinde hekzan çözücünden elde edilen ekstrakt hariç tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlarda laktik asit ve propiyonik asit içeriği belirlenirken asetik asit ve bütirik asit tespit edilememiştir. Saf su çözücüsünden elde edilen ekstraktda 0,005 g/L değerinde tartarik asit ve döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktda ise 0,002 g/L değerinde pirüvik asit belirlenmiştir. Tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek içeriğe rastlanan 3,061 g/L değerini veren döç-2 çözücüsünden elde edilen ekstraktdaki laktik asit olmuştur. Bu sonuca yakın olarak döç-1 çözücüsünden elde edilen 2,978 g/L ve döç-4 çözücüsünden elde edilen 2,950 g/L değerlerini veren laktik asit olmuştur.

Yapraklı yıllık sürgünleri kullanılan kayın ağacının dokuz farklı çözücüyle ekstraksiyonundan elde edilen 36 ekstrakt içerisinde bazı ekstraktlarda laktik asit ve propiyonik asit içeriği belirlenirken, tartarik asit, pirüvik asit, asetik asit ve bütirik asit tespit edilememiştir. Sonuçlara göre tüm ekstraktların laktik asit içeriği 0,100-0,185 g/L; propiyonik asit içeriği ise 0,168-0,296 g/L aralığında değerler vermiştir. Biyolojik olarak aktif olan organik asitler birçok bitkinin kimyasal bileşiminde bulunmaktadır (Adamczak vd. 2020). Derin ötektik çözücülerden olan döç-1, döç-2, döç-3 ve döç-4 çözücülerinden elde edilen ekstraktlarda laktik asit ve propiyonik asit içeriği belirlenirken, organik çözücüler içerisinde sadece aseton ve etanol çözücülerinden elde edilen ekstraktlarda laktik asit ve propiyonik asite rastlanmıştır. Bayram vd. (2022), yaptıkları çalışmada geleneksel ve derin ötektik çözücüler kullanarak

Hypericum perforatum bitkisinden elde ettikleri ekstraklarda 51 farklı organik asit içeriğini araştırmışlardır. Sonuç olarak geleneksel çözücülere göre DÖÇ'lerden elde edilen ekstraktların içeriğinde daha yüksek değerlerde organik asit tespit etmişlerdir. DÖÇ'lerin yapısındaki kimyasalların, polar yapıda olan organik asitlerle etkileşiminden kaynaklı fenolikleri ve organik asitleri ekstrakte etmekte etkili olduğu düşünülmektedir.

5.5 LC-MS/MS Analiz Sonuçları

Dokuz farklı çözücü ile dört farklı ağaç türünden elde edilen ekstraktların LC-MS/MS analizi ile 1 g katı madde içeriğindeki fenolik bileşen değerleri µg/L cinsinden belirlenmiş ve Tablo 5.6'da verilmiştir. LC-MS/MS cihazı ile her bir ekstraktın içeriğinde 44 farklı fenolik bileşen araştırılmış ve bunlar içerisinden 23 bileşenin varlığı belirlenmiştir. Bunlar; şikimik asit, protokatekuik asit, kateşin, klorojenik asit, hidroksibenzaldeyde, kafeik asit, kafein, vanilin, o-kumarik asit, taksifolin, kumarin, protokatehuik etil ester, hesperidin, izokuersitrin, rutin, kuarsetin-3-ksilosid, kaempferol-3-glukozit, fisetin, naringenin, silibinin, luteolin, kapsaisin, dihidrokapkaisin bileşenleridir. Her bir ekstrakt içeriğinde şikimik asit, protokatekuik asit, kateşin, klorojenik asit ve o-kumarik asit varlığı belirlenmiştir. 36 ekstrakt arasından organik çözücülerden elde edilen ekstraktlarda, derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlarda 16 farklı fenolik bileşen elde edilmişken organik çözücülerden elde edilen ekstraktlarda 22 farklı fenolik bileşen tespit edilmiştir. Hidrofilik yapıda olan fenolik bileşenlerin elde edilmesinde polaritesi yüksek olan organik çözücüler daha etkindirler (Dönmez ve Salman, 2021; Yılmaz, 2019). Bu bilgi, mevcut tez çalışmasında polaritesi yüksek olan aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktlarda, apolar yapıda olan hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktlara göre yaklaşık üç kat daha fazla fenolik bileşenin tespit edilmesini açıklamaktadır. Tüm fenolik bileşenler içerisinde en yüksek içeriği 120,501-263,203 µg/L aralığında değerlerle şikimik asit göstermiştir. Şikimik asit fenolik bileşenlerin biyosentezinde önemli görevi olan bir bileşendir (Tiring vd. 2021). Analiz sonucunda belirlenen diğer fenolik bileşenler; kateşin 1,030-11,495 µg/L; protokatekuik 0,082-8,479 µg/L; klorojenik asit 0,061-0,231 µg/L, o-kumarik asit 0,058-0,149 µg/L; kafein 0,023-0,285 µg/L; vanilin 0,084-0,299 µg/L; izokuersitrin

0,005-2,571 µg/L; rutin 0,122-0,682 µg/L; kaempferol-3-glukozit 0,022-0,740 µg/L; dihidrokapkaisin 0,046-0,058 µg/L; fisetin 0,044-0,093 µg/L; hidroksibenzaldeyde 0,044-0,093 µg/L; protokatehuik etil ester 0,038-0,097 µg/L; taksifolin 0,067-0,743 µg/L; kumarin 0,063-1,191 µg/L; kapsaisin 0,001-0,357 µg/L; luteolin 0,293-1,715 µg/L; kafeik asit 0,070-0,169 µg/L; naringenin 0,120-0,133 µg/L aralığında; hesperidin 0,138 µg/L; kuarsetin-3-ksilosid 0,868 µg/L ve silibinin 1,010 µg/L değerlerini vermiştir.

Tablo 5.6. LC-MS/MS analizi (µg/L)

Numune	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Döç-1+Kç	14,548				0,059		0,088	0,122						0,046	0,602		0,024						
Döç-1+M					0,062		0,053	0,133						0,007	0,377		0,054						0,002
Döç-1+G					0,093		0,093	0,205						0,008	0,629		0,022						
Döç-1+K							0,027	0,169	0,061			0,097		0,114			0,156					0,218	0,452
Döç-2+Kç							0,285	0,204			0,063			0,011	0,273		0,024						0,002
Döç-2+M					0,052		0,085	0,107				0,045		0,329	0,452		0,184	0,046			0,293	0,357	0,275
Döç-2+G					0,054		0,025	0,151			1,191				0,175		0,058						
Döç-2+K							0,106	0,149						0,041	0,641		0,071			1,010		0,001	0,002
Döç-3+Kç							0,058	0,113			0,466			0,013	0,502								
Döç-3+M			1,030				0,048	0,151			0,257			0,090			0,081						
Döç-3+G							0,061																
Döç-3+K							0,049	0,171						0,006			0,052						0,002
Döç-4+Kç							0,036	0,154			0,834			0,014			0,033						
Döç-4+M							0,103	0,200						0,012	0,345		0,041						0,002
Döç-4+G							0,118	0,178									0,042						0,001
Döç-4+K							0,067	0,172						0,029			0,073						0,001
Aseton+Kç	151,096		2,160				0,038	0,140	0,063	0,067		0,038		0,026			0,045		0,121				0,012
Aseton+M							0,046	0,096	0,059			0,045		0,802	0,122		0,286	0,047				0,070	0,061

1: Şikimik asit; 2: Protokatekuik asit; 3: Kateşin; 4: Klorojenik asit; 5: Hidroksibenzaldeyde; 6: Kafeik asit; 7: Kafein; 8: Vanilin; 9: o-kumarik asit; 10: Taksifolin; 11: Kumarin; 12: Protokatehuik etil ester; 13: Hesperidin; 14: İzokuersitrin; 15: Rutin; 16: Kuarsetin-3-ksilosid; 17: Kaempferol-3-glukozit; 18: Fisetin; 19: Naringenin; 20: Silibinin; 21: Luteolin; 22: Kapsaisin; 23: Dihidrokapkaisin

Tablo 5.6. Devamı…

Numune	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Aseton+G	132,051	0,086	8,535		0,044		0,125	0,263	0,066		0,109			0,351	0,185		0,184	0,047	0,120				0,002
Aseton+K		0,122	3,731	0,094			0,129	0,232				0,046		0,288	0,627		0,190	0,048					
Hekzan+Kç							0,060							0,011	0,181								0,002
Hekzan+M							0,049	0,085															
Hekzan+G							0,075	0,240						0,005									
Hekzan+K					0,065		0,114	0,299			0,332						0,024						
Metanol+Kç	136,674						0,045	0,165									0,030				0,902		
Metanol+M		0,082		0,061			0,023	0,084						0,380			0,120	0,048					0,002
Metanol+G	235,496	0,198	11,159		0,071		0,043	0,217	0,076			0,060	0,138	0,274	0,682		0,170						0,008
Metanol+K	3,827	0,231		0,179		0,070	0,027	0,245	0,066	0,119		0,055		0,328			0,265	0,051			1,715		
Etanol+Kç	263,203	0,135	3,354		0,063		0,050	0,289		0,237		0,043		0,051	0,241		0,063					0,003	0,004
Etanol+M			11,495		0,064		0,045	0,244	0,090					2,571		0,868	0,740	0,058	0,133			0,001	0,003
Etanol+G	124,371		5,781		0,058		0,069	0,204	0,064					0,220			0,132					0,084	0,053
Etanol+K		0,137	7,999	0,231	0,059		0,042	0,265	0,058	0,743				0,817			0,615	0,055				0,084	0,081
Saf su+Kç	120,501	8,479					0,037	0,098			0,840												
Saf su+M		1,341					0,036	0,142	0,066													0,005	
Saf su+G	32,315	5,100	2,676				0,061	0,171	0,098									0,051					
Saf su+K		0,386		0,099		0,169	0,050	0,227	0,149			0,061											

1: Şikimik asit; 2: Protokatekuik asit; 3: Kateşin; 4: Klorojenik asit; 5: Hidroksibenzaldeyde; 6: Kafeik asit; 7: Kafein; 8: Vanilin; 9: o-kumarik asit; 10: Taksifolin; 11: Kumarin; 12: Protokatehuik etil ester; 13: Hesperidin; 14: İzokuersitrin; 15: Rutin; 16: Kuarsetin-3-ksilosid; 17: Kaempferol-3-glukozit; 18: Fisetin; 19: Naringenin; 20: Silibinin; 21: Luteolin; 22: Kapsaisin; 23: Dihidrokapkaisin

Sekonder metabolitlerin yapısında iklim, topografik yapı, edafik özellikler, çevre ve biyolojik faktörlerin etkisi oldukça fazladır. Sekonder metabolitlerin en önemli sınıfını oluşturan fenolik bileşikler, bitkilerin kendini geliştirebilmeleri, stresle mücadele edebilmeleri ve ortama adaptasyonda önemli rol almaktadır. Bu sebepten bitkiler için toplanma tarihleri, saatleri ve ekolojik koşulları fenolik bileşen içeriğini etkilemektedir (Zobayed vd. 2005; Çağlar ve Demirci, 2017; Szajdek ve Borowska, 2008). Bitkilerin yetişmesinde genetik özellikleri, yetişme ortamı şartları ve ekstrakt eldesinde kullanılan bitki kısımlarındaki farklılıklar gibi etkenlerin olmasından kaynaklı mevcut tez çalışmasında da elde edilen ekstraktlardaki fenolik bileşen içerikliklerinde farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Ancak hidrofilik yapıdaki fenolik bileşenlerden yaygın olarak içeriği belirlenebilen izokuersitrin, rutin, kaempferol-3-glukozit, kafein ve vanilin bileşenleri bu çalışmada da 36 ekstrakt içerisinde birçok ekstraktda tespit edilmiştir. Kim vd. (2012), meşe ağacının yaprak ve sürgünlerinden elde ettikleri ekstrakların fenolik bilşenlerini analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda belirlemiş oldukları; yaprak ekstraktında 1199,60 µg g^{-1}, sürgün ekstraktında 541,50 µg g^{-1} protokatekuik asit, yaprak ekstraktında 6081,11 µg g^{-1}, sürgün ekstraktında 3401,00 µg g^{-1} klorojenik asit, yaprak ekstraktında 394,50 µg g^{-1}, sürgün ekstraktında tespit edilmeyen kafeik asit, yaprak ekstraktında 12,06 µg g^{-1}, sürgün ekstraktında 13,58 µg g^{-1} vanilin, yaprak ekstraktında 16,08 µg g^{-1}, sürgün ekstraktında 22,00 µg g^{-1} o-kumarik asit, yaprak ekstraktında tepit edilmeyen, sürgün ekstraktında 576,43 µg g^{-1} kateşin, yaprak ekstraktında 167,40 µg g^{-1}, sürgün ekstraktında 397,20 µg g^{-1} rutin, yaprak ekstraktında 7,05 µg g^{-1}, sürgün ekstraktında 6,08 µg g^{-1} naringenin, yaprak ekstraktında 63,85 µg g^{-1}, sürgün ekstraktında 100,83 µg g^{-1} hesperedin bileşenleri bileşenleri tespit edilmiştir. Mevcut tez çalışmasına benzer bir diğer çalışma Geana vd. (2023), göknar ağacının iğne yapraklarından mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini kullanarak elde ettikleri ekstraktın fenolik içeriğini araştırmışlar ve benzer sonuçları bulmuşlardır (53,8-186,6 µg/g kateşin, 0,1-0,4 µg/g naringin, 4,8-15,3 kuersetin, 7,3-7,8 µg/g kaempferol). Vieira vd. (2018), *Juglans regia* yapraklarından DÖÇ çözücüleri ile katı sıvı destekli ekstraksiyon yöntemi kullanarak elde ettikleri ekstraktların fenolik bileşen içeriğini HPLC analizi ile gerçekleştirmişlerdir. HPLC analiz sonuçlarına göre, 3-O-kafeoilkinik asit bileşeni ChCl:propiyonik asit ekstraktında 7,84 mg/g DW, ChCl:bütirik asit ekstraktında 7,30 mg/g DW; kuersetin 3-O-glikoz bileşeni ChCl:fenilpropiyonik asit ekstraktında 15,44 mg/g DW; kuersetin

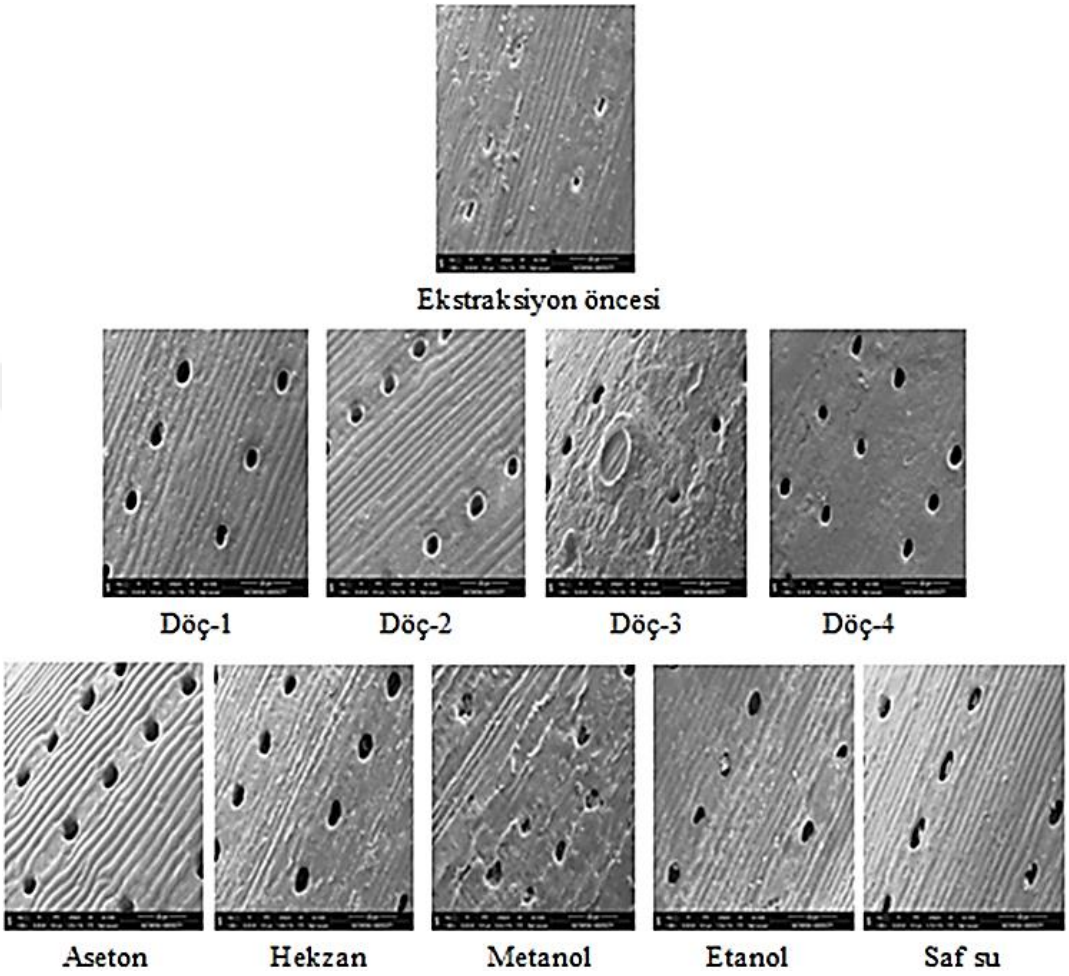
O-pentozit bileşeni ChCl:fenilpropiyonik asit ekstraktında 13,37 mg/g DW olarak elde etmişlerdir. Tanase vd. (2019), kayın ağacının kabuklarından etanol ve etanol:su kullanarak MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktların fenolik bileşenlerini analiz etmişler ve su ekstraktında 300,7 µg/g, etanol-su (50:50) ekstraktında 577,4 µg/g, etanol-su (80:20) ekstraktında 466,1 µg/g kateşin; su ekstraktında 3,3 µg/g, etanol-su (50:50) ekstraktında 6,2 µg/g, etanol-su (80:20) ekstraktında 5,7 µg/g protokatekuik asit içeriğini belirlemişlerdir. Kıvrak vd. (2013), çam ağacının kabuklarından %50 etanol kullanarak UEY ile elde ettikleri ekstraktın fenolik bileşenlerini analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda, 0,169 mg 100 g^{-1} vanilin, 2,551 mg 100 g^{-1} protokatekuik asit, 0,134 mg 100 g^{-1} naringenin, 0,349 mg 100 g^{-1} kafeik asit, 0,146 mg 100 g^{-1} luteolin bileşenlerini tespit etmişlerdir. Ferreira-Santos vd. (2019), çam kabuklarından su ve %50 etanol çözücüsü kullanarak geleneksel yöntemle elde ettikleri ekstraktların fenolik bileşenlerini analiz etmişler ve su ekstraktında 28,3 mg/L, %50 etanol ekstraktında 97,0 mg/L kateşin, su ekstraktında 103,4 mg/L, %50 etanol ekstraktında 253,5 mg/L taksifolin, su ekstraktında 6,2 mg/L, %50 etanol ekstraktında 10,9 mg/L kafeik asit, su ekstraktında 33,5 mg/L, %50 etanol ekstraktında 25,0 mg/L bileşenlerini elde etmişlerdir. Bouras vd. (2015), *Quercus robur* kabuğundan MEY ile %75'lik metanol:su ve %75'lik etanol:su çözücüleri kullanılarak elde ettikleri ekstraktların LC-MS analizi ile polyphenols, kateşin, epikateşin, epigallokateşin, syringic asit, p-kumarik asit, sinapic asit ve naringenin içeriklerini belirlemişlerdir. Subhashini vd. (2016), farklı meşe türlerinden metanol çözücüsü ile soxhlet yöntemi kullanılarak elde ettikleri ekstraktların UV-spektrofotometrik analizi gerçekleştirmişler ve 2,922-2,975 µg/mL aralığında gallik asit elde etmişlerdir. Yaşar vd. (2017), meşe ağacının dal ve gövdesinden soxhlet yöntemiyle elde ettikleri ekstraktın fenolik bileşen içeriğini belirlemek için HPLC analizi gerçekleştirmişler ve 0,69 mg/g kateşin, 0,29 mg/g klorojenik asit, 0,28 mg/g epikateşin içeriğini tespit etmişlerdir. Shang vd. (2018), yaptıkları çalışmada dokuz farklı DÖÇ çözücüsü ile UEY kullanılarak *Cyclocarya paliurus* yapraklarından elde edilen ChCl:1,4-bütanediol ekstraktın LC-MS analizi ile kaempferol-7-O-α-L-ramnozid 3,11 mg/g ve kuersetin-3-O-β-D-glucuronide 3,59 mg/g olarak elde etmişlerdir. Benouchenne vd. (2021), *Abies numidica* yapraklarından %80 metanol:su karışımı ile maserasyon yöntemi kullanarak elde ettikleri ekstraktın LC-MS/MS ile analizini gerçekleştirmiş ve 399,91 µg/g hiperosid, 147,22 µg/g astragalin ve 102,62 µg/g rutin bileşenlerini

tespit etmişlerdir. Konovalova vd. (2023), *Quercus rubra*'nın yaprak ve sürgünlerinden %70'lik etanol:su çözücüsü ile ultrasonik banyo yöntemini kullanarak elde ettikleri ekstraktın fenolik bileşen içeriğini HPLC analizi ile gerçekleştirmişlerdir. HPLC analiz sonucunda; 323,43 mg/100g rutin, 7,05 mg/100g kuersetin-3-β-glikozit, 16,12 mg/100g neohesperidin, 7,97 mg/100g quercetin, 11,96 mg/100g luteolin, 2,28 mg/100g kateşin, 1,54 mg/100g epikateşin, 25,45 mg/100g epigallokateşin gallata, 1,67 mg/100g gallokateşin, 44,66 mg/100g gallik asit; 29,61 mg/100g hidroksifenilasetik asit; 139,62 mg/100g klorojenik asit; 5,34 mg/100g kafeik asit; 3,28 mg/100g şiringik asit; 5,27 mg/100g benzoik asit; 6,01 mg/100g p-kumarik asit; 8,05 mg/100g trans-ferulik asit; 74,64 sinapik asit; 2,28 mg/100g trans-sinnamik asit bileşenleri tespit edilmiştir.

5.6 SEM Analiz Sonuçları

Farklı çözücülerle ekstraksiyon işlemi gerçekleştirmek için kullanılan karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinin ekstraksiyon işlemine tabi tutulmadan önce ve sonrası ultramikroskopik yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir (Şekil 5.1). Görüntülerde ekstraksiyon öncesi karaçam ağacının yaprağındaki stomaların içinin dolu olduğu ve yaprak yüzeyinde herhangi bir tahribatın oluşmadığı net bir şekilde görülmektedir. Ekstraksiyon sonrası yaprak görüntülerinde ise, ekstraksiyon öncesi görüntülerden farklı olarak bozunmuş bir yapı görülmektedir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun etkisiyle bitki örneğindeki hücrelerin ısısı artmış ve hücre duvarı genleşerek parçalanmış ve zarar gören hücre duvarındaki bileşikler çözücüye geçmiştir. Özellikle derin ötektik çözücüler ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlardaki yaprak örneklerinin stomalarının tamamen boşalmış olması ve yaprak yüzeyindeki bozunma dikkat çekmektedir. Bu durum, derin ötektik çözücüler ile muamele edilen yaprak örneklerindeki yüzey tahribatının, ekstraksiyon sırasında çözme kabiliyeti iyi olan derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların yüksek verimde olmaları ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Kwon vd. (2020) derin ötektik çözücüler ile muamele ettikleri kızılçam odunun işlem öncesi ve sonrası SEM görüntülerini elde etmişlerdir. İşlem öncesi görüntülerde malzeme yüzeyinin pürüzlü ve sert bir yapıda olduğunu gözlemlemişlerdir. DÖÇ ile gerçekleştirilen işlem sonrasındaki görüntülerde ise malzeme yüzeylerinin lif

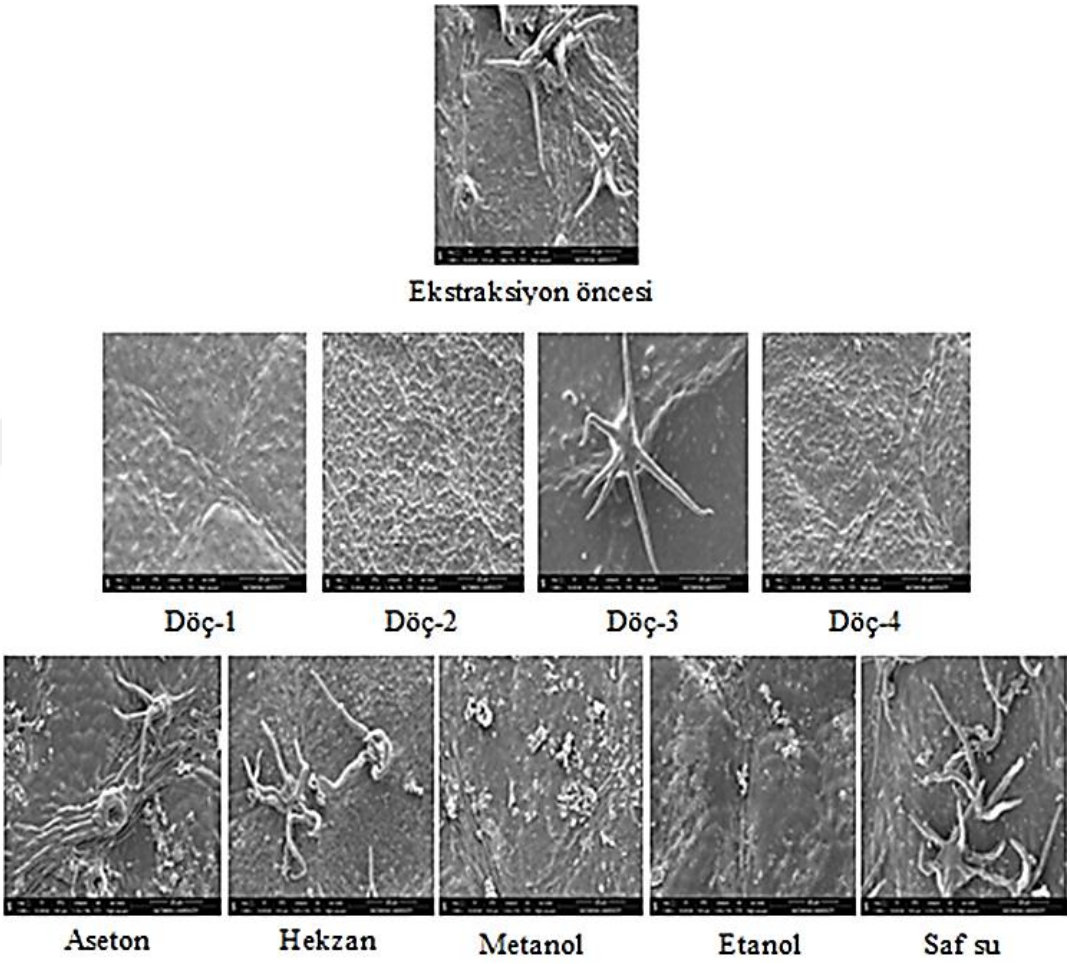
demetlerine ve liflere ayrılmış halde olduğunu ve işlem görmemiş malzemeye göre pürüzsüz bir yapıda olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sebeple DÖÇ'lerin kızılçamın kimyasal bileşenlerini önemli oranda ve farklı derecelerde etkilediğini belirlemişlerdir.



Şekil 5.1. Karaçam ağacı yapraklarının, ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (mag-1000x)

Meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinin ekstraksiyon işlemine tabi tutulmadan önce ve dokuz farklı çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri alınmıştır (Şekil 5.2). Ekstraksiyon öncesi yaprak görüntüleri ile ekstraksiyon sonrası görüntüler karşılaştırıldığında yapraktaki bozunma görülmekte ve Wang vd. (2008) yapmış oldukları benzer bir çalışmada da MEY ile gerçekleştirilen ekstraksiyon öncesi ve sonrası yaprak yüzeyindeki bozunmanın net bir şekilde görüntülendiğini ifade etmişlerdir. Hücre duvarındaki parçalanma neticesinde bileşenlerin çözücüye geçmesini sağlayan MEY'in etkisi, bitkinin yaprak yüzeyinden görülmektedir. DÖÇ kullanılan ekstraksiyonlardaki yaprak yüzeylerinde iletim

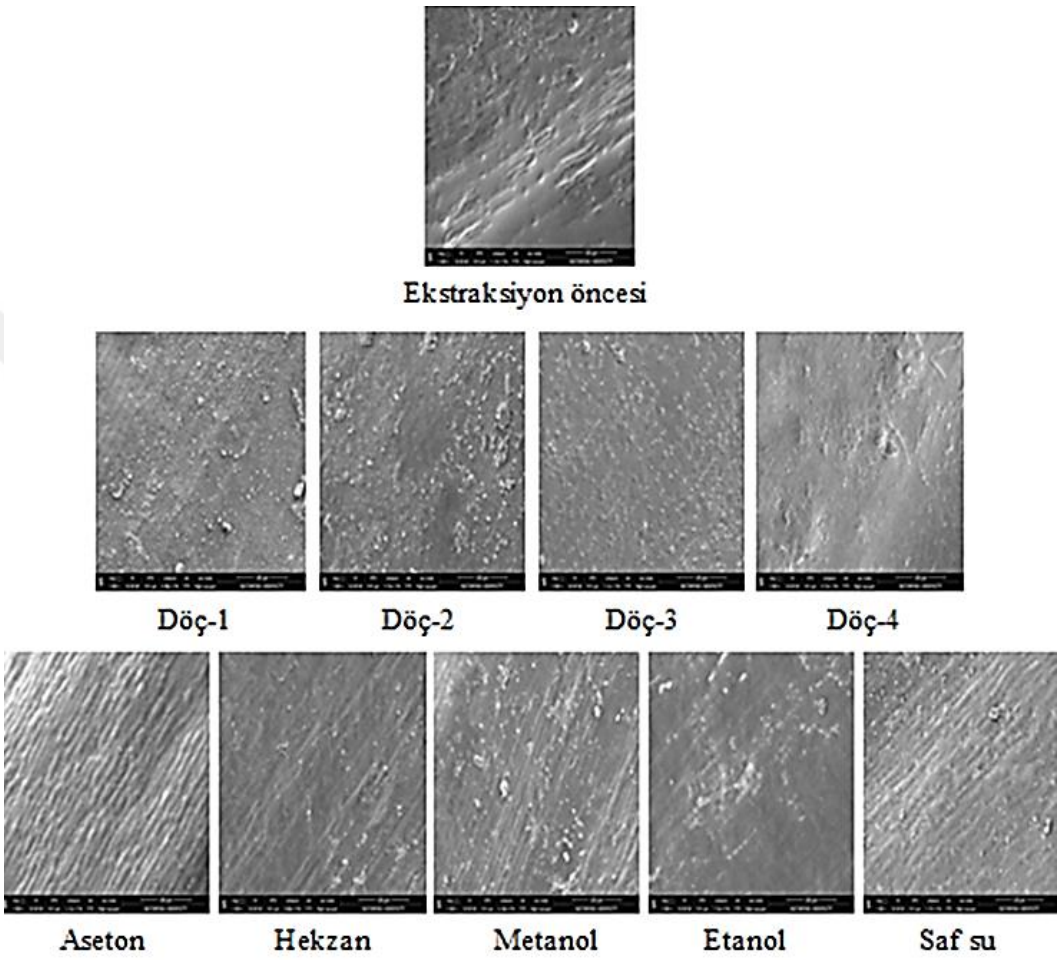
demetlerinin yaprak yüzeyine yayılmasıyla oluşan damarlı yapının daha belirgin olması tahribatı net bir şekilde göstermektedir.



Şekil 5.2. Meşe ağacı yapraklarının, ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (mag-1000x)

Her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde kullanılan göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinin ekstraksiyon işleminden önce ve sonrası taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 5.3). Görüntülerde ekstraksiyon sonrası göknar ağacının yapraklarındaki tahribat net bir şekilde görülmektedir. Görüntüler incelendiğinde diğer ağaç türlerinde de olduğu gibi kullanılan çözücülerin, ekstraksiyon işlemi esnasındaki bitki hücrelerine nüfuz etme kapasitesine göre değişkenlik göstermektedir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon sisteminde hücre içerisinde bulunan serbest suyun sıcaklığının hızla artmasıyla hücre duvarları genleşerek yırtılmakta ve bu sayede bileşikler çözücüye geçmektedir. Bu durum da SEM görüntülerinde bitki yüzeyinde oluşan bozunmayı açıklamaktadır (Camel, 2000).

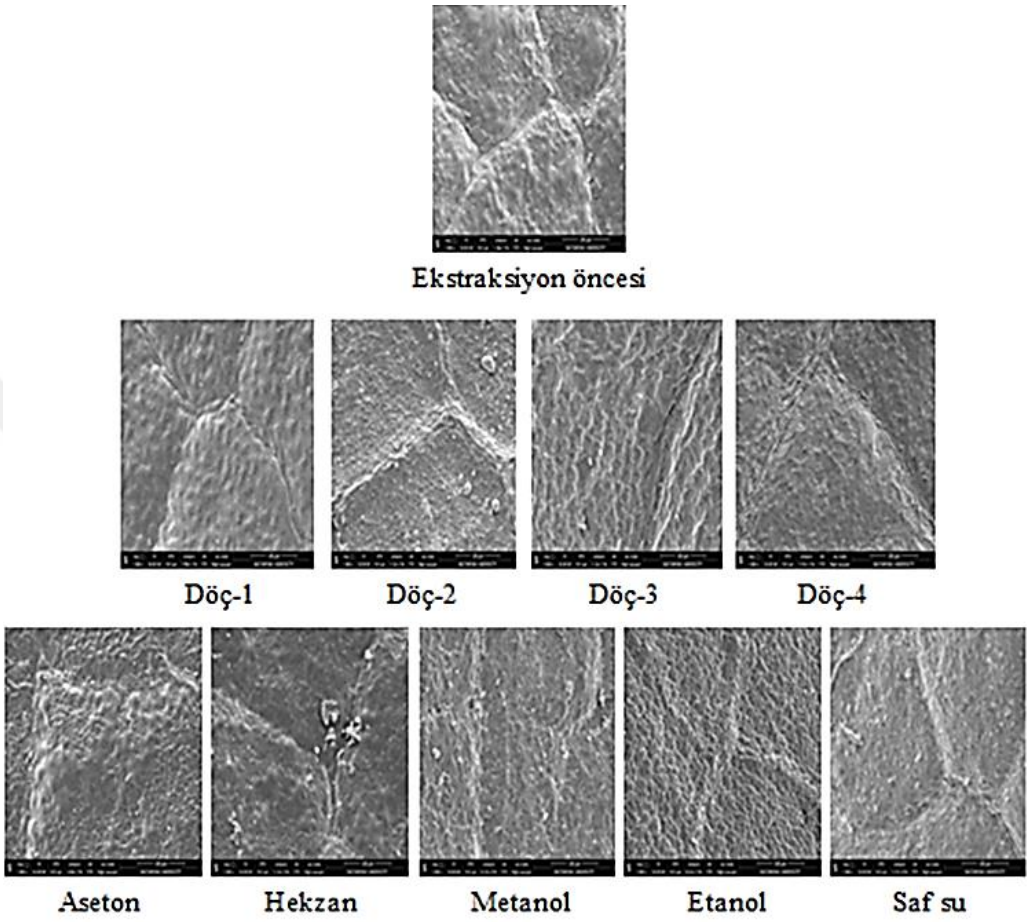
Özellikle çözücüler içerisinde, bitkinin ana bileşenlerini çözme kabiliyeti olan derin ötektik çözücüler ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlardaki, yaprak yüzeylerinde iletim demetlerinin yüzeyde oluşturduğu damarlı yapının belirginliği yapraktaki oluşan tahribata neden olmaktadır.



Şekil 5.3. Göknar ağacı yapraklarının, ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (mag-1000x)

Farklı çözücülerin uygulandığı kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraksiyon işleminde kullanılan örneklerin ekstraksiyon işlemi öncesi ve sonrası görüntüleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.4). Görüntülerde tüm örneklerin yüzeylerinde ekstraksiyon sonrası görüntüler ekstraksiyon yaprak örneklerindeki görüntülemeden farklı olarak bozunmuş yapıyı ortaya koymaktadır. MEY'in kısa sürede bitki örneğinin hücre duvarında oluşturduğu tahribat ve DÖÇ'lerin bitkilerdeki ana bileşenleri çözme kabiliyeti bir araya geldiğinde ekstraksiyon sonrası yüzey görüntülerindeki bozunma daha net görülmektedir. Her bir

çözücünün çözme kabiliyetinin bulunması yüzeyde parçalanan dokudaki bileşenlerin çözücüye geçmesini sağlamıştır. Bu sebeple ekstraksiyon verimini, fenolik bileşen içeriğini, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini de etkilemiştir.



Şekil 5.4. Kayın ağacı yapraklarının, ekstraksiyon öncesi ve her bir çözücü ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası SEM görüntüleri (mag-1000x)

5.7 Toplam Fenolik Madde Tayini Analiz Sonuçları (mg/L)

36 ekstraktın her bir çözücü için ayrı olarak ağaç örneklerindeki toplam fenolik madde içerikleri Tablo 5.7'de verilmektedir. Tablo incelendiğinde farklı çözücülerden elde edilen 36 ekstraktın fenolik madde içeriği bakımından etkin olduğu düşünülmekte ve bu tez çalışmasında elde edilen ekstraktlarla gerçekleştirilen LC-MS/MS analizine göre 23 fenolik bileşenin tespit edilmesi ile desteklenmektedir. Elde edilen her bir ekstraktın toplam fenolik madde içeriği 8,849-242,436 mg/L aralığında değerler vermiştir. Karbonhidratları çözme kabiliyetinin yüksek olmasından kaynaklı derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların veriminin yüksek olmasına karşılık,

verimi düşük çıkan organik çözücülerin hidrofilik yapıdaki fenolik bileşenleri daha fazla çözmeleri, organik çözücülerden elde edilen ekstraktlardaki toplam fenolik madde içeriğinin daha fazla olmasını açıklamaktadır. Organik çözücüler içerisinde toplam fenolik madde içeriğini, 77,238-242,436 mg/L aralığında en yüksek değerler veren polaritesi ve hidrofilik yapıdaki bileşenleri çözme kabiliyeti yüksek olan metanol ve etanol çözücüleri göstermiştir. Antioksidan aktivite bakımından etkili olan fenolik bileşikler; fonksiyonel gruplarının sayısı, tipi ve pozisyonu gibi değişkenlik gösteren durumlara sahiptir. Bu değişkenliklerin oluşmasına sebep olan unsurlardan birisi de ekstraksiyon işleminde tercih edilen çözücü türüdür. Üzerinde çalışılacak numuneden ekstrakte edilen fenolik bileşenlerin yapısı ekstraksiyon için kullanılan çözücünün polaritesine bağlı bulunmaktadır. Ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin miktarı ve kalitesi üzerinde ise seçilen çözücünün etkisinin bulunduğu düşünülmektedir (Sağlam, 2021; Sepahpour vd. 2018). Bu çalışmada diğer ekstraktlara göre en yüksek fenolik madde içeriği 242,436 mg/L değeri ile etanol çözücüsünden elde edilen karaçam ekstraktında tespit edilmiştir. Derin ötektik çözücüler içerisinde döç-1, döç-2 ve döç-4 çözücülerinden elde edilen tüm ağaç ekstraktlarında fenolik madde içeriği belirlenmiştir. Ancak döç-3 çözücüsünden elde edilen tüm ağaç ekstraktlarında diğer derin ötektik çözücülerde olduğu kadar fenolik içeriğe rastlanmamıştır. Viskozitesi yüksek olan DÖÇ'lerin çözme kabiliyetinin düşük olduğu bilindiğinden, döç-3 çözücüsünün, döç-1, döç-2 ve döç-4 çözücüsüne göre daha yüksek viskozitede olması sebebiyle çözme kabiliyetinin diğer DÖÇ'lere göre daha düşük olduğu düşünülmektedir (Kutlu vd. 2021; Zainal-Abidin vd. 2017). Tüm çözücüler arasında hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içeriğinin düşük olması, apolar yapıda olmasından kaynaklı lipofilik bileşenler için daha etkin ancak hidrofilik bileşenler için çok etkin olmaması ve bu sebepten fenolik bileşenleri çözme kabiliyetinin düşük olduğu düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen Tukey testine göre, toplam fenolik madde tayininin üç tekrarlı çalışma sonuçlarından elde edilen verilerle gerçekleştirilen Tüm-İst testinde, döç-1+K, döç-2+G, döç-2+K ve döç-4+G numuneleri aynı grupta yer aldığından toplam fenolik madde içeriği bakımından istatiksel olarak ($P<0,05$) birbirleriyle benzer ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Çöz-İst testinde, derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelerden döç-1+Kç, döç-2+Kç, döç-4+Kç ve döç-4+K aynı grupta yer

almaktadır. Bu nedenle numunelerin istatiksel anlamda (P<0,05) benzerliğinin olduğu düşünülmektedir. Tür-İst testinde, karaçam ağacının dokuz farklı çözücüden elde edilenler arasından döç-1+Kç, döç-2+Kç ve döç-4+Kç numuneleri aynı grupta bulunmaktadır. Meşe ağacından elde edilen döç-1+M, döç-2+M ve Aseton+M numuneleri aynı grupta yer almaktadır. Aynı grupta yer alan numunelerin istatiksel anlamda (P<0,05) birbirlerine benzer olduklarını göstermektedir (Tablo 5.7).

Tablo 5.7. Toplam fenolik madde miktarı (mg/L)

Numune	**Ortalama Toplam Fenolik (mg/L)**	**%RSD**
Döç-1+Kç	175,552±0,996^{efg,AB,4}	0,567
Döç-1+M	175,905±9,781^{h,B,3}	5,561
Döç-1+G	126,736±1,098^{i,D,5}	0,866
Döç-1+K	140,499±0,818^{ı,CD,3}	0,582
Döç-2+Kç	165,366±1,198^{fgh,AB,4}	0,724
Döç-2+M	172,070±5,589^{gh,B,3}	3,248
Döç-2+G	134,829±2,196^{ı,CD,4}	1,629
Döç-2+K	153,415±8,833^{ı,D,3}	5,758
Döç-3+Kç	28,070±0,898^{ö,F,6}	3,200
Döç-3+M	43,526±0,549^{o,E,5}	1,261
Döç-3+G	29,152±0,848^{ö,F,8}	2,909
Döç-3+K	8,849±0,429^{p,G,7}	4,851
Döç-4+Kç	173,811±0,749^{fgh,AB,4}	0,431
Döç-4+M	185,080±0,998^{def,A,2}	0,539
Döç-4+G	154,238±0,349^{ı,C,3}	0,226
Döç-4+K	175,552±1,187^{efg,AB,2}	0,676
Aseton+Kç	196,373±0,349^{cd,E,3}	0,178
Aseton+M	158,496±5,190^{h,G,3}	3,275
Aseton+G	73,192±0,216^{kl,J,6}	0,295
Aseton+K	65,711±1,248^{lm,K,6}	1,899
Hekzan+Kç	25,035±1,747^{ö,O,6}	6,977
Hekzan+M	39,691±1,497^{o,N,5}	3,772
Hekzan+G	57,641±0,696^{mn,L,7}	1,208
Hekzan+K	101,517±0,798^{j,I,4}	0,787
Metanol+Kç	200,748±0,200^{c,D,2}	0,099
Metanol+M	218,393±0,100^{b,C,1}	0,046
Metanol+G	237,637±4,591^{a,B,1}	1,932
Metanol+K	77,238±1,098^{k,İ,5}	1,421
Etanol+Kç	242,436±1,298^{a,A,1}	0,535
Etanol+M	210,629±3,244^{b,C,1}	1,540
Etanol+G	187,503±0,599^{cd,E,2}	0,319
Etanol+K	183,316±0,749^{de,F,1}	0,408
Saf su+Kç	50,372±1,447^{no,M,5}	2,873

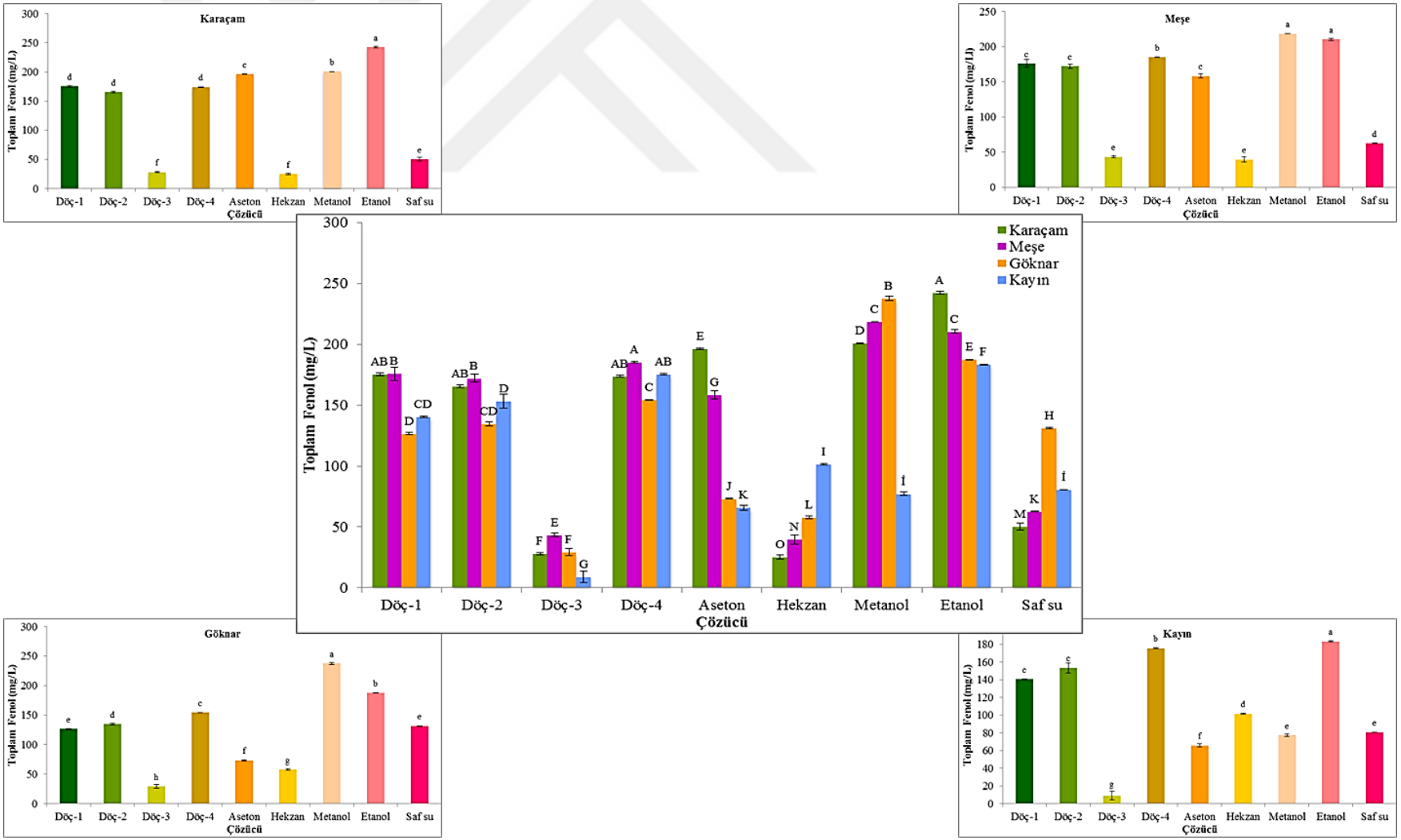
Tablo 5.7. Devamı…

Numune	Ortalama Toplam Fenolik (mg/L)	%RSD
Saf su+M	$62,558\pm0,212^{lm,K,4}$	0,338
Saf su+G	$131,371\pm0,848^{i,H,5}$	0,646
Saf su+K	$80,673\pm0,108^{k,İ,5}$	0,134

RSD: Bağıl standart sapma
Tukey testine göre, aynı sütundaki farklı harfler ilgili değerlerin toplam fenol değerlerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Değerlerin karşılaştırılması üç farklı kategoride gerçekleştirilmiştir.
1. Büyükten küçüğe a ile z aralığında sıralama
Tüm numunelere bağlı olarak, toplam fenolik madde taraması
2. Büyükten küçüğe A ile Z aralığında sıralama
Geleneksel ve derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelere bağlı olarak, toplam fenolik madde taraması
3. Büyükten küçüğe 1 ile 8 aralığında sıralama
Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın ağacından elde edilen numunelere bağlı olarak, toplam fenolik madde taraması

Tüm ekstraktlardaki toplam fenolik madde içerikleri Şekil 5.5'deki grafiklerde karşılaştırılmıştır. Genel olarak çözücüye göre karşılaştırma yapıldığında organik çözücülerinden elde edilen ekstraktların derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre yaklaşık beş kat daha yüksek toplam fenolik madde içeriği verdiği görülmüştür. Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden farklı çözücülerle elde edilen ekstraktlardaki toplam fenolik madde içeriği, karaçamdan elde edilen ekstraktlar için 25,035-242,436 mg/L; meşeden elde edilen ekstraktlar için 39,691-218,393 mg/L; göknardan elde edilen ekstraktlar için 29,152-237,637 mg/L ve kayından elde edilen ekstraktlar için 8,849-183,316 mg/L aralığında değerler vermiştir. Hamad vd. (2019), yaptıkları çalışmada göknar, kayın, çam ve meşe ağaçlarının kabuklarından elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik madde içeriğini sırasıyla 73 mg/GAE g; 42,04 mg/GAE g; 88 mg/GAE g; 48 mg/GAE g olarak belirlemişlerdir. Chupin vd. (2015), çam ağacının kabuklarından su ile MEY'i kullanarak elde ettikleri ekstraktın toplam polifenolik madde içeriğini 39,52 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir. Ştefanescu vd. (2022); Nisca vd. (2023), yaptıkları çalışmada meşe ağacından, etanol çözücüsü kullanarak MEY ile elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik madde içeriğini sırasıyla 347,74; >300 mg GAE/g olarak bulmuşlardır. Mevcut tez çalışmasında meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden etanol çözücüsü kullanılarak elde edilen ekstraktın diğer çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre 210,629 mg/L değeri ile daha yüksek toplam fenolik madde içeriği verdiği tespit edilmiştir. Nisca vd. (2022) meşe kabukları ile MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik madde içeriğini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda çözücü olarak suyun kullanıldığı ekstraktın toplam fenolik madde içeriğini 382,26 mg GAE/g; %70'lik etanol çözücüsünün kullanıldığı ekstraktın toplam fenolik

madde içeriğini 403,73 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir. Tanase vd. (2022), *Quercus rubra*'nın kabuğundan su ve %50 etanol:su çözücüleri ile UEY ve MEY kullanılarak ekstraktlar elde etmiş ve toplam polifenolik madde içeriklerini belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen ekstraktların toplam polifenolik bileşenleri; UEY ile su çözücüsünden elde edilen ekstraktta 203,58 mg GAE/g DW ve %50 etanol:su çözücüsünden elde edilen ekstraktta 226,79 mg GAE /g DW; MEY ile su çözücüsü kullanılarak elde edilen ekstraktta 216,47 mg GAE/g DW ve %50 etanol:su çözücüsünden elde edilen ekstraktta 321,08 mg GAE/g DW tespit edilmiştir. Garcia-Villalba vd. (2017), yaptıkları çalışmada saf su çözücüsü kullanarak yedi farklı meşe türünden elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik madde içeriğini 8,88-41,5 mg/L aralığında belirlemişlerdir. Gupta vd. (2011), göknar yaprakları ile soxhlet ekstraksiyonu yönteminde diklormetan, metanol ve aseton çözücülerini kullanarak ekstraktlar elde etmiş ve toplam fenolik madde içeriğini araştırmışlardır. Göknar yapraklarının toplam fenolik madde içeriğini, diklormetan ekstraktında 62,956 mg GAE/g; metanol ekstraktında 170,126 mg GAE/g; aseton ekstraktında 471,698 mg GAE/g değerleriyle belirlemişlerdir. Benouchenne vd. (2021), *Abies numidica* yapraklarından %80 metanol:su karışımı ile maserasyon yöntemi kullanarak elde ettikleri ekstraktın toplam fenolik madde miktarını 381,15 µg GAE/mL bulmuşlardır. Geana vd. (2023), *Abies alba* ve *Picea abies* kabuk ve iğne yapraklarından sulu metanol ve sulu etanol çözücüleri ile MEY kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam polifenolik bileşenlerini tespit etmişlerdir. Çalışmada toplam polifenolik bileşen miktarı *A. alba*'nın kabuk ekstraktı 30,21 mg GAE/g ve iğne yaprak ekstraktı 58,00 mg GAE/g; P. *abies*'in kabuk ekstraktı 105,83 mg GAE/g ve iğne yaprak ekstraktı 77,03 mg GAE/g olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.5. Toplam fenolik madde içerikleri (mg/L) ve istatiksel toplam fenolik madde taraması

Bouras vd. (2015) yaptıkları çalışmada meşe ağacından MEY ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik bileşen içeriğini 1,65-85,64 g GAE/100 g olarak tespit etmişlerdir. Ouyang vd. (2017), *Pinus elliottii* iğne yapraklarından %72 etanol:su çözücüsü ile MEY kullanılarak elde edilen ekstraktın toplam polifenol içeriğini 1,14-4,933 g/100g olarak tespit etmişlerdir. Alara vd. (2018), *Vernonia* cinerea'nın yapraklarından sulu etanol ile MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktın toplam fenolik bileşen içeriğini 85,64 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir. Vieira vd. (2018), *Juglans regia* yapraklarının su, etanol, %50 etanol ve DÖÇ çözücüleri ile katı sıvı destekli ekstraksiyon yöntemi kullanarak elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik bileşen içeriğini; 8,8-24,9 mg/g DW aralığında tespit etmişlerdir. Cao vd. (2019), DÖÇ (ChCl:etilen glikol) çözücüsü ile Homojenat vakum Kavitasyon yöntemi kullanılarak *Calamoideae faberii* bitkisinden elde ettikleri ekstraktın toplam fenolik bileşen içeriğini 6,82 mg/g olarak belirlemişlerdir. Toplam fenolik bileşen içeriği ise; tohumda 81,24 mg/g; epispermde 43,21 mg/g; arillusda 3,47 mg/g, yaprak kılıfında 19,5 mg/g ve yaprakta 17,81 mg/g tespit edilmiştir. Alara vd. (2019), *Vernonia amygdalina* yapraklarından etanol çözücüsü ile soxhlet ve MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktların toplam fenolik bileşenlerini MEY ile elde edilen ekstraktda 114,03 mg GAE/g, soxhlet yöntemi ile elde edilen ekstraktda 70,33 mg GAE/g olarak tespit etmişlerdir.

5.8 Toplam Flavonoid Madde Tayini Analiz Sonuçları (mg/L)

Bu çalışmada kullanılan dokuz farklı çözücünün dört farklı ağacın yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlarda, fenolik bileşenlerin önemli bir sınıfı olan flavonoidlerin araştırıldığı toplam flavonoid madde içeriği Tablo 5.8'de verilmektedir. Tablodaki sonuçlar incelendiğinde farklı çözücü ve ağaç örneklerinden elde edilen 36 ekstraktın flavonoid madde içeriği bakımından etkin olduğu düşünülmekte ve bu tez çalışmasında elde edilen ekstraktlarla gerçekleştirilen toplam fenolik madde tayini analizi sonuçları ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Elde edilen her bir ekstraktın toplam flavonoid madde içeriği 2,615-222,114 mg/L aralığında değerler vermiştir. Toplam flavonoid madde içeriğinin organik çözücülerden elde edilen ekstraktlarda derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlardan yaklaşık üç kat daha yüksek değerler verdiği için, bu tez çalışmasındaki toplam fenolik madde içeriği

sonuçları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Toplam fenolik madde içeriği analiz sonuçlarında olduğu gibi, organik çözücüler içerisinde 68,072-222,114 mg/L aralığında değerler veren en yüksek toplam flavonoid madde içeriğini, polaritesi yüksek olan metanol ve etanol çözücüleri göstermiş ve yine en yüksek flavanoid madde içeriği 222,114 mg/L değeri ile etanol çözücüsünden elde edilen karaçam ekstraktında tespit edilmiştir. Derin ötektik çözücüler içerisinde döç-1, döç-2 ve döç-4 çözücülerinden elde edilen dört farklı ağaç ekstraktlarında, döç-3 çözücüsünden elde edilen dört farklı ağaç ekstraktına göre yaklaşık dört kat daha yüksek toplam flavonoid madde içeriği belirlenmiştir. Bu durum, yine toplam fenolik madde içeriği belirlemedeki sonuçlarla ilişkilendirildiğinde döç-1, döç-2 ve döç-4 çözücülerine göre viskozitesi yüksek olan döç-3 çözücüsünün çözme kabiliyetinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Choi vd. 2011; Cunha ve Fernandes, 2018; Kutlu vd. 2021). Yapılan karşılaştırmalar, toplam fenolik ve flavonoid bileşenlerinin sonuçlarındaki tutarlığı ortaya koymaktadır.

Tukey testine göre, toplam flavonoid madde tayininin üç tekrarlı çalışma sonuçlarından elde edilen verilerle gerçekleştirilen Tüm-İst testine göre, döç-1+Kç, döç-3+M, hekzan+Kç ve hekzan+M numuneleri aynı grupta yer aldığından istatiksel anlamda ($P<0,05$) benzer oldukları tespit edilmiştir. Çöz-İst testinde, geleneksel ve derin ötektik çözücüler farklı gruplarda yer aldığından istatiksel anlamda farklı ($P>0,05$) oldukları belirlenmiştir (Tablo5.8).

Tablo 5.8. Toplam flavonoid madde miktarı (mg/L)

Numune	**Ortalama Toplam Flavonoid (mg/L)**	**%RSD**
Döç-1+Kç	$12,871\pm0,430^{s,F,7}$	3,340
Döç-1+M	$35,791\pm0,860^{mn,B,5}$	2,402
Döç-1+G	$6,263\pm0,520^{st,GH,7}$	8,297
Döç-1+K	$38,475\pm0,438^{lm,B,5}$	1,138
Döç-2+Kç	$69,380\pm1,606^{i,A,4}$	2,315
Döç-2+M	$21,612\pm0,438^{p,D,7}$	2,027
Döç-2+G	$6,125\pm0,292^{ş,G,7}$	4,767
Döç-2+K	$2,615\pm0,946^{t,I,7}$	36,185
Döç-3+Kç	$5,024\pm0,584^{st,GH,8}$	4,119
Döç-3+M	$14,178\pm0,584^{s,F,8}$	4,119
Döç-3+G	$3,235\pm0,292^{t,I,8}$	9,028
Döç-3+K	$3,441\pm0,206^{st,HI,7}$	6,001

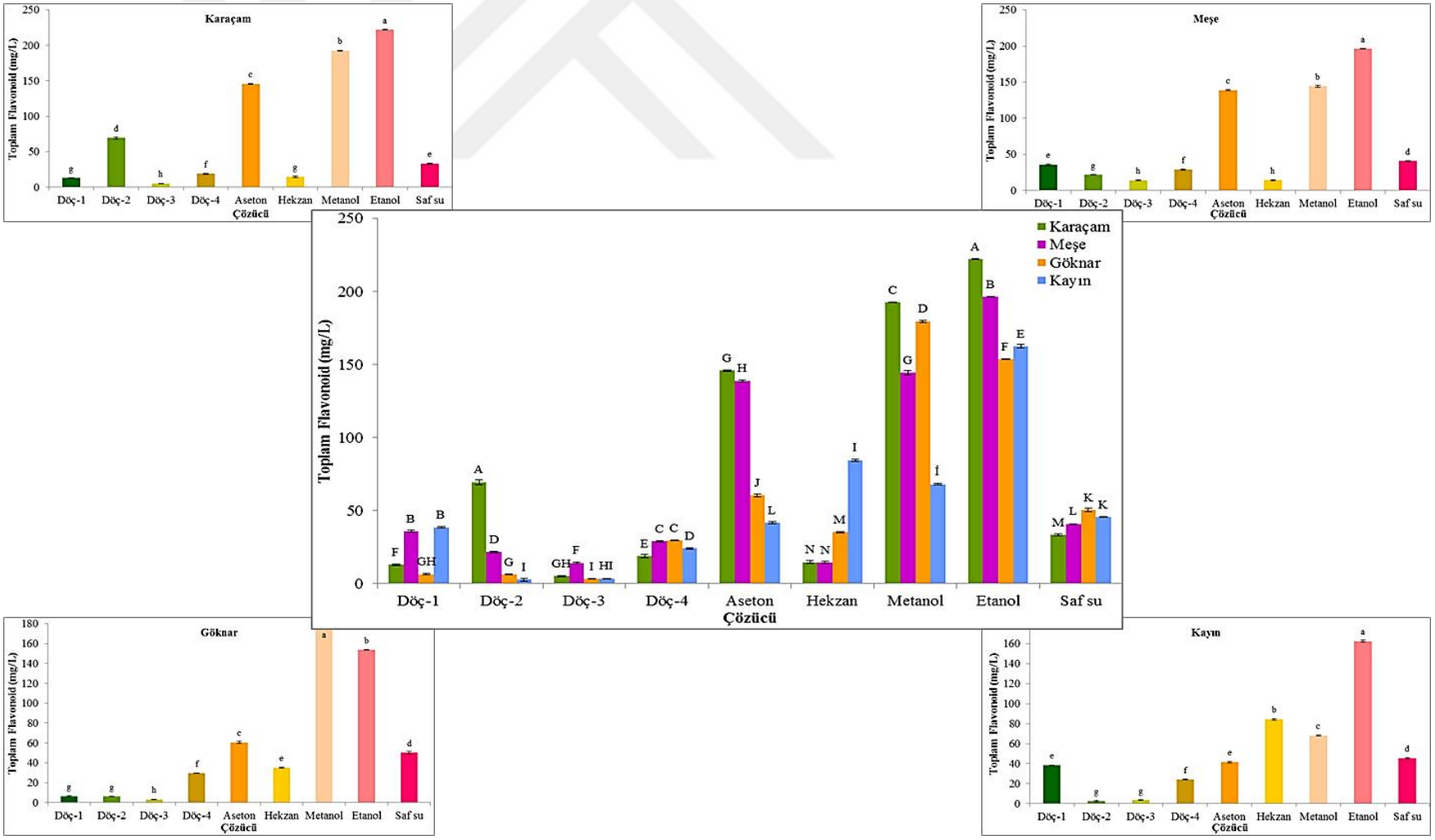
Tablo 5.8. Devamı…

Numune	Ortalama Toplam Flavonoid (mg/L)	%RSD
Döç-4+Kç	18,790±1,039^{r,E,6}	5,531
Döç-4+M	28,839±0,619^{ö,C,6}	2,148
Döç-4+G	29,390±0,292^{oö,C,6}	0,994
Döç-4+K	24,090±0,413^{p,D,6}	1,714
Aseton+Kç	145,713±0,292^{g,G,3}	0,200
Aseton +M	138,761±0,730^{h,H,3}	0,526
Aseton +G	60,363±1,060^{j,J,3}	1,755
Aseton +K	41,573±0,876^{l,L,5}	2,107
Hekzan+Kç	14,660±0,782^{s,N,7}	5,332
Hekzan +M	14,385±0,745^{s,N,8}	5,176
Hekzan +G	35,103±0,520^{mn,M,5}	1,480
Hekzan +K	84,385±0,730^{ı,I,2}	0,865
Metanol+Kç	192,517±0,438^{c,C,2}	0,228
Metanol +M	144,336±1,314^{g,G,2}	0,910
Metanol +G	179,508±0,584^{d,D,1}	0,325
Metanol +K	68,072±0,438^{i,İ,3}	0,643
Etanol+Kç	222,114±0,413^{a,A,1}	0,186
Etanol +M	196,303±0,292^{b,B,1}	0,149
Etanol +G	153,628±0,292^{f,F,2}	0,190
Etanol +K	162,369±1,060^{e,E,1}	0,653
Saf su+Kç	33,382±0,584^{no,M,5}	1,750
Saf su +M	40,678±0,438^{l,L,4}	1,077
Saf su +G	50,245±1,245^{k,K,4}	2,477
Saf su +K	45,496±0,438^{k,K,4}	0,963

RSD: Bağıl standart sapma
Tukey testine göre, aynı sütundaki farklı harfler ilgili değerlerin toplam flavonoid değerlerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Değerlerin karşılaştırılması üç farklı kategoride gerçekleştirilmiştir.
1. Büyükten küçüğe a ile z aralığında sıralama
Tüm numunelere bağlı olarak, toplam flavonoid madde taraması
2. Büyükten küçüğe A ile Z aralığında sıralama
Geleneksel ve derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelere bağlı olarak, toplam flavonoid madde taraması
3. Büyükten küçüğe 1 ile 8 aralığında sıralama
Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın ağacından elde edilen numunelere bağlı olarak, toplam flavonoid madde taraması

Tüm ekstraktlardaki toplam flavonoid madde içeriğinin gösterildiği grafik ile türler bazında karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarından dokuz farklı çözücü ile elde edilen ekstraktlardaki toplam flavonoid içeriğin gösterildiği grafikler Şekil 5.6'da verilmiştir. Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı sürgünlerinden elde edilen ekstraktların toplan flavonoid madde içerikleri, çözücülerine göre karşılaştırıldığında organik çözücülerin kullanıldığı ekstraktlar, derin ötektik çözücülerin kullanıldığı ekstraktlardan yaklaşık üç kat daha yüksek sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Dokuz farklı çözücü kullanılarak karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlardaki toplam flavonoid

madde içeriği, karaçamdan elde edilen ekstraktlarda 5,024-222,114 mg/L; meşeden elde edilen ekstraktlarda 14,178-196,303 mg/L; göknardan elde edilen ekstraktlarda 3,235-179,508 mg/L ve kayından elde edilen ekstraktlarda 2,615-162,369 mg/L aralığında değerler vermiştir. Hamad vd. (2019), yaptıkları çalışmada göknar, kayın, çam ve meşe ağaçlarının kabuklarından elde ettikleri ekstraktların toplam flavonoid madde içeriğini sırasıyla 38 mg/CE g; 31 mg/CE g; 22 mg/CE g; 32 mg/CE g olarak belirlemişlerdir. Skrypnik vd. (2019) yaptıkları çalışmada meşe ve çam ağacının kabuklarıyla geleneksel ekstraksiyon yöntemi ile su çözücüsünü kullanarak elde ettikleri ekstraktların karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Toplam flavonoid madde içeriği bakımından çam kabuğu ekstraktında 5,19 mg g^{-1}, meşe kabuğu ekstraktında 8,45 mg g^{-1} içeriğin olduğunu belirlemişlerdir. Mevcut tez çalışması, karaçam ve meşe ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden saf su ile elde edilen ekstraktlarındaki sırasıyla 33,382 mg/L, 40,678 mg/L olarak belirlenen toplam flavonoid madde içeriklerine göre aralarındaki ilişki gözlenmiştir. Garcia-Villalba vd. (2017), yaptıkları çalışmada saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen yedi farklı meşe türünden elde edilen ekstraktların toplam flavonoid madde içeriğini 9,40-57,3 mg/L aralığında hesaplamışlardır. Drozdz ve Pyrzynska (2018), meşe ağacı kabuklarının su ve etanol/su karışımlı çözücülerinden elde ettikleri ekstraktların bu tez çalışmasına benzer olarak, toplam flavonoid madde içeriğini sırasıyla 38,0 mg kateşin/g; 78,4 mg kateşin/g olarak tespit etmişlerdir.



Şekil 5.6. Toplam flavonoid madde içerikleri (mg/L) ve istatiksel toplam flavonoid madde taraması

Gupta vd. (2011), göknar yapraklarını soxhlet ekstraksiyonu yöntemiyle, diklormetan, metanol ve aseton çözücülerini kullanarak ekstraktlar elde etmiş ve toplam flavonoid madde içeriğini araştırmışlardır. Göknar yapraklarının toplam flavonoid madde içeriğini, diklormetan ekstraktında 261 mg QE/g; metanol ekstraktında 316,167 mg QE/g; aseton ekstraktında 642,5 mg QE/g değerleriyle belirlemişlerdir. Alara vd. (2018), *Vernonia* cinerea'nın yapraklarından sulu etanol ile MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktın toplam flavonoid içeriğini 52,72 mg QE/g olarak tespit etmişlerdir. Alara vd. (2019), *Vernonia amygdalina* yapraklarından etanol çözücüsü ile soxhlet ve MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktların toplam flavonoid bileşenlerini MEY ile elde edilen ekstraktda 96,29 mg QE/g, soxhlet yöntemi ile elde edilen ekstraktda 63,82 mg QE/g olarak tespit etmişlerdir. Benouchenne vd. (2021), *Abies numidica* yapraklarından %80 metanol:su karışımı ile maserasyon yöntemi kullanarak elde ettikleri ekstraktın toplam flavonoid madde miktarını 49,79 µg QE/mL bulmuşlardır. Geana vd. (2023), *Abies alba* ve *Picea abies* kabuk ve iğne yapraklarından sulu metanol ve sulu etanol çözücüleri ile MEY kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam flavonoid bileşenlerini tespit etmişlerdir. Çalışmada toplam flavonoid bileşen miktarı *A. alba*'nın kabuk ekstraktı 2,01 mg QE/g ve iğne yaprak ekstraktı 3,17 mg QE/g; P. *abies*'in kabuk ekstraktı 9,91 mg QE/g ve iğne yaprak ekstraktı 8,94 mg QE/g olarak hesaplanmıştır.

5.9 Toplam Antosiyanin Madde Tayini Sonuçları (ppm)

Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünleri ile dokuz farklı çözücünün ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilen 36 ekstraktın toplam antosiyanin madde içerikleri Tablo 5.9'da verilmektedir. Birçok bitkide bulunan antosiyaninler fenolik bileşiklerin en büyük grubunu oluşturan bileşenlerdir (Yeler, 2021). Bu tez çalışmasında kullanılan karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlar tür bazlı değerlendirildiğinde tüm ağaç türlerinden elde edilen ekstraktlarda antosiyanin madde içeriğine rastlanmıştır. Toplam antosiyanin madde içeriği analizinde birçok ekstraktın antosiyanin içeriği belirlenmiş ve mevcut tez çalışmasında toplam flavonoid madde içeriği analiz sonuçları ile benzerlik göstermiştir. Analizi gerçekleştirilen 36 ekstraktın toplam antosiyanin madde içeriği 0,142-1,920 mg/L aralığında değerler vermiştir.

Tukey testine göre, toplam antosiyanin madde tayininin üç tekrarlı çalışma sonuçlarından elde edilen verilerle gerçekleştirilen Tüm-İst testinde, yalnızca Aseton+M diğer tüm numunelerden farklı bir grupta yer aldığı için istatiksel olarak (P>0,05) farklı olduğu gözlenmiştir. Diğer tüm numunelerin ise istatiksel anlamda birbiri ile benzer (P<0,05) sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Çöz-İst testinde, geleneksel çözücüler arasındaki istatiksel farklılığa (P<0,05) göre aseton+M haricindeki tüm numuneler aynı grupta yer aldığından istatiksel anlamda (P<0,05) birbirlerine benzer oldukları belirlenmiştir. Derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen numunelerin hepsinin istatiksel olarak anlamlı (P<0,05) düzeyde benzer oldukları görülmüştür. Tür-İst testinde, karaçam, göknar ve kayın ağacının dokuz farklı çözücüden elde edilen numunelerin aynı grup içerisinde yer aldıkları ve bundan dolayı istatiksel olarak (P<0,05) benzer özellikler sergilediği tespit edilmiştir. Meşe ağacının farklı çözücülerinden elde edilen numuneler içerisinde ise sadece aseton+M istatiksel olarak (P>0,05) anlamlı bir fark göstererek diğerlerinden ayrılmıştır (Tablo 5.9).

Tablo 5.9. Toplam antosiyanin madde miktarı (mg/L)

Numune	**Ortalama Toplam Antosiyanin (mg/L)**	**%RSD**
Döç-1+Kç	$0,479\pm0,094^{b,A,1}$	0,063
Döç-1+M	$0,328\pm0,083^{b,A,2}$	0,102
Döç-1+G	$0,312\pm0,035^{b,A,1}$	0,040
Döç-1+K	$0,518\pm0,272^{b,A,1}$	0,265
Döç-2+Kç	$0,217\pm0,124^{b,A,1}$	0,067
Döç-2+M	$0,417\pm0,100^{b,A,2}$	0,010
Döç-2+G	$0,429\pm0,094^{b,A,1}$	0,014
Döç-2+K	$0,167\pm0,033^{b,A,1}$	0,001
Döç-3+Kç	$0,395\pm0,154^{b,A,1}$	0,024
Döç-3+M	$0,273\pm0,201^{b,A,2}$	0,041
Döç-3+G	$0,306\pm0,024^{b,A,1}$	0,063
Döç-3+K	$0,301\pm0,154^{b,A,1}$	0,104
Döç-4+Kç	$0,443\pm0,012^{b,A,1}$	0,282
Döç-4+M	$0,250\pm0,146^{b,A,2}$	0,021
Döç-4+G	-	-
Döç-4+K	-	-
Aseton+Kç	-	-
Aseton +M	$1,920\pm0,181^{a,A,1}$	0,033
Aseton +G	-	-
Aseton +K	-	-
Hekzan+Kç	-	-

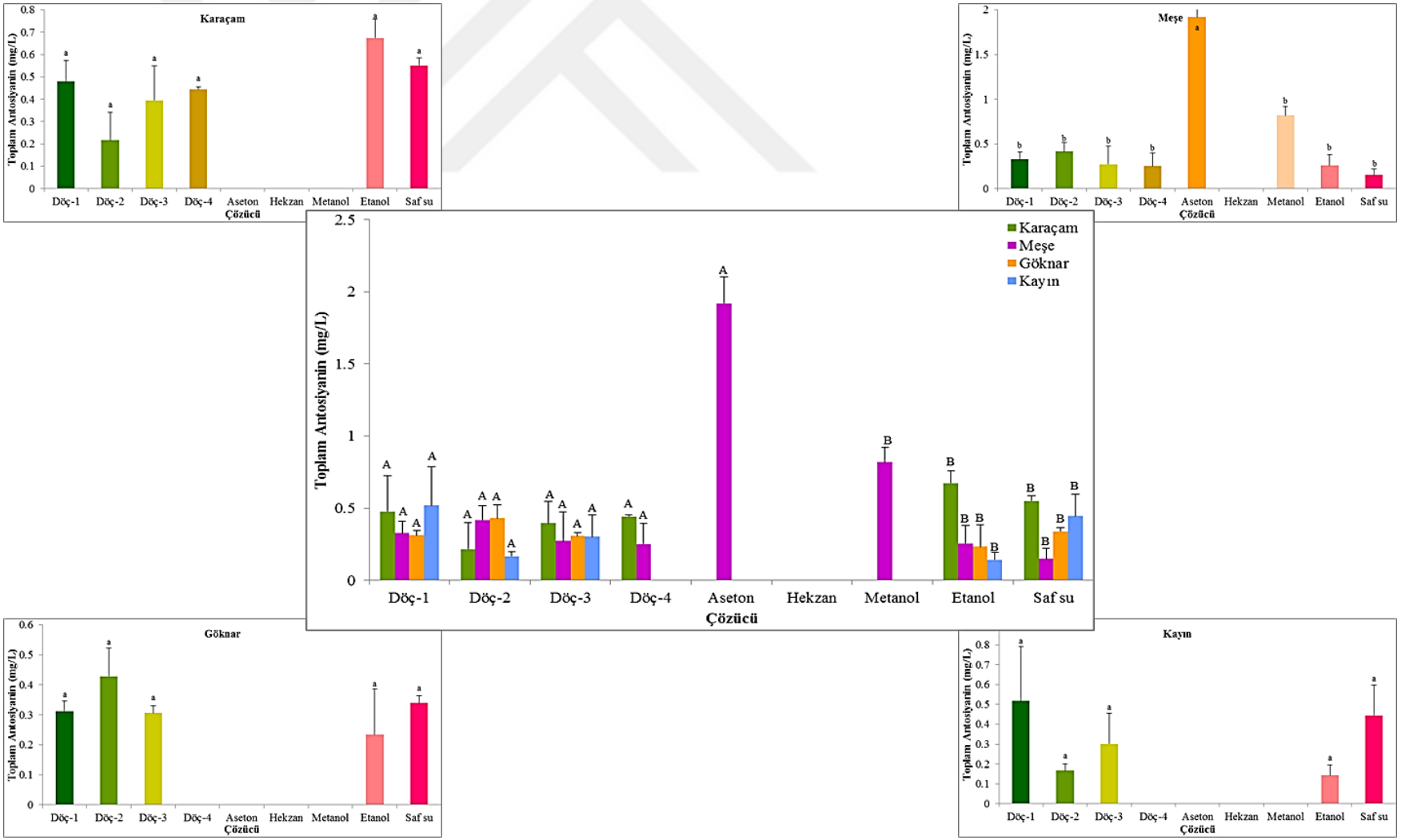
Tablo 5.9. Devamı…

Numune	Ortalama Toplam Antosiyanin (mg/L)	%RSD
Hekzan +M	-	-
Hekzan +G	-	-
Hekzan +K	-	-
Metanol+Kç	-	-
Metanol +M	$0,818\pm0,101^{b,B,2}$	0,181
Metanol +G	-	-
Metanol +K	-	-
Etanol+Kç	$0,674\pm0,083^{b,B,1}$	0,222
Etanol +M	$0,256\pm0,126^{b,B,2}$	0,016
Etanol +G	$0,234\pm0,153^{b,B,1}$	0,094
Etanol +K	$0,142\pm0,053^{b,B,1}$	0,011
Saf su+Kç	$0,551\pm0,033^{b,B,1}$	0,001
Saf su+M	$0,150\pm0,071^{b,B,2}$	0,047
Saf su+G	$0,340\pm0,024^{b,B,1}$	0,058
Saf su+K	$0,445\pm0,152^{b,B,1}$	0,023

"-'': içerik tespit edilemedi.
RSD: Bağıl standart sapma
Tukey testine göre, aynı sütundaki farklı harfler ilgili değerlerin toplam antosiyanin değerlerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Değerlerin karşılaştırılması üç farklı kategoride gerçekleştirilmiştir.
1. Büyükten küçüğe a ile b aralığında sıralama
Tüm numunelere bağlı olarak, toplam antosiyanin madde taraması
2. Büyükten küçüğe A ile C aralığında sıralama
Geleneksel ve derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelere bağlı olarak, toplam antosiyanin madde taraması
3. Büyükten küçüğe 1 ile 2 aralığında sıralama
Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın ağacından elde edilen numunelere bağlı olarak, toplam antosiyanin madde taraması

Dört farklı ağacın yapraklı yıllık halka sürgünlerinden elde edilen ekstraktlarındaki toplam antosiyanin madde içeriğini gösteren grafik ve her bir ağaç örneğinin dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktlarındaki toplam antosiyanin madde içerikleri farklı grafiklerle Şekil 5.7'de gösterilmiştir. Şekil 5.7'de gösterilen grafiklerde toplam antosiyanin madde içeriği bakımından ekstraktlar birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktlardaki toplam antosiyanin madde içeriği, karaçamdan elde edilen ekstraktlarda 0,217-0,674 mg/L; meşeden elde edilen ekstraktlarda 0,150-1,920 mg/L; göknardan elde edilen ekstraktlarda 0,234-0,429 mg/L ve kayından elde edilen ekstraktlarda 0,142-0,518 mg/L aralığında değerler elde edilmiştir. Asetonun polar yapıda olması ve asidik özelliğinden kaynaklı olarak tüm ekstraktlar içerisinde Aseton+M ekstraktının 1,920 mg/L ile en yüksek antosiyanin içeriği gösterdiği gözlenmiştir. Dört farklı ağaç ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan dokuz farklı çözücü karşılaştırıldığında hekzan hariç tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlarda toplam

antosiyanin madde içeriği tespit edilmiştir. Antosiyaninlerin, alkali pH'da ve nötre yakın olan ortamlarda sabit olamaması, asidik özelliği olan çözücülerde daha iyi elde edilmesini sağlamaktadır (Bhaskaran ve Mehta, 2007; Luo vd., 2022). Bu durum, tez çalışmasındaki polar özellikteki çözücülerin flavonoidleri ve dolayısıyla antosiyaninleri çözme kabiliyetinin iyi olduğu düşünüldüğünden, bu çalışmada apolar özellikte olan hekzandan elde edilen ekstraktda toplam antosiyanin içeriğinin belirlenememesini açıklamaktadır. Skrypnik vd. (2019) yaptıkları çalışmada meşe ve çam ağacının kabuklarıyla geleneksel ekstraksiyon yöntemi ile su çözücüsünü kullanarak elde ettikleri ekstraktların proantosiyanin madde içeriğini incelemişler çam kabuğu ekstraktında 0,43 mg g^{-1}, meşe kabuğu ekstraktında 2,13 mg g^{-1} içeriğin olduğunu belirlemişlerdir. Valencia-Aviles vd. (2018), meşe türlerinden farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde ettikleri ekstraktlar ile karakterizasyon çalışmaları sonucu proantosiyanin madde içeriğini 9,4-53,5 mg CChE/g aralığında tespit etmişlerdir. Chupin vd. (2015), tarafından *Pinus pinaster* kabuğundan sulu etanol çözücüsü ile MEY kullanılarak elde edilen ekstraktın toplam proantosiyanin içeriğini 11,99 mg CyaW/g olarak hesaplanmıştır. Garcia-Villalba vd. (2017), yedi farklı meşe türünün yapraklarından su ile demleme yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam prosiyanidin içeriğini 36,5-347,00 mg/L aralığında belirlemişlerdir.



Şekil 5.7. Toplam antosiyanin madde içerikleri (mg/L) ve istatiksel toplam antosiyanin madde taraması

5.10 Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları

Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde, örnek içerisindeki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliğinden dolayı değişikler olabilmekte ve bu sebeple antioksidan aktivite için kullanılan yöntemler arasında her zaman doğrusal bir ilişki olamayabilmektedir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için seçilen yöntemin antioksidan aktivite ile yakın bir ilişkisi bulunmakta ve bununla bağlantılı olarak bitki ekstraktının toplam fenolik madde içeriği ile arasında tam korelasyon görülemeyebilmekte ancak genel olarak ekstraksiyon yönteminde kullanılan çözücünün polaritesinin artmasıyla birlikte antioksidan aktivitesinin de artacağı öngörülmektedir (Pinelo vd. 2004; Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2006). Anatioksidan aktivite tayini için kullanılan analizlerin sonuçları bu bilgilerden yararlanılarak yorumlanmıştır. Elde edilen tüm ekstrakt ve uçucu yağların antioksidan aktiviteleri farklı yöntemlerle incelenip, sonuçlarını değerlendirebilmek adına, DPPH, ABTS ve CUPRAC analizleri ile antioksidan aktiviteleri belirlenmeye çalışılmıştır. DPPH, ABTS ve CUPRAC yöntemleri, hem hidrofilik hemde lipofilik bileşenlerin antioksidan aktivitelerini belirlemede uygun yöntemler olması sebebiyle tercih edilmiştir (Albayrak vd. 2010). Tüm analizlerde her bir örneğin 130, 85 ve 40 mg/100 ml derişimlerdeki ortamdaki süpürme yüzdesi ve trolox değerleri hesaplanmıştır. Farklı derişimlerdeki süpürme yüzdeleri ile yapılan hesaplamalarla kalibrasyon grafiğinden elde edilen eşitlik ile DPPH ve ABTS derişimini %50 oranında azaltmak için gerekli olan antioksidan miktarını veren IC_{50} değeri hesaplanmıştır. Serbest radikali süpürme yüzdeleri, ekstraktlardaki antioksidan özellikte olan maddelerin ortamdaki serbest radikali ne kadar süpürdüğünü yüzde olarak ifade etmektedir. Yani süpürme yüzdesi, antioksidan aktivite ile doğru orantılı değerlendirilmekte ve süpürme yüzdesi büyükse ekstraktın antioksidan aktivitesinin yüksek, eğer süpürme yüzdesi düşükse ekstraktın antioksidan aktivitesinin düşük olduğu söylenebilmektedir. Numunelerin trolox ve IC_{50} değerleri; DPPH ve ABTS analizleri için ters, trolox değeri CUPRAC analizi için doğru orantılıdır. DPPH ve ABTS analizleri için trolox değeri; numunedeki antioksidan tarafından süpürülen serbest radikallerden sonra ortamda kalan serbest radikal değerlerini ifade etmektedir. Trolox değerinin değerlendirmesi yapılırken, değer ne kadar düşükse, ortamdaki serbest radikal de o kadar azalmıştır. Yani düşük trolox değeri yüksek antioksidan aktivite manasına gelmektedir. CUPRAC

analizi için hesaplanan trolox değeri ise örneklerdeki antioksidan aktiviteyi ifade etmektedir. Yani yüksek trolox değeri yüksek antioksidan aktivite manasına gelmektedir. Ayrıca DPPH ve ABTS analizlerinde IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Numunelerin IC_{50} değeri; ortamda bulunan serbest radikal derişiminin yarısını inhibe eden derişimi ifade etmektedir. Ortamda bulunan aynı miktardaki serbest radikali en düşük derişimde süpürebilen ekstraktlar en kuvvetli antioksidan aktiviteyi göstermektedir. Yani IC_{50} değeri ne kadar küçükse antioksidan aktivite o kadar yüksektir.

5.10.1 DPPH Analiz Sonuçları

Dört uçucu yağ ve 36 ekstraktın antioksidan aktivite tayini için gerçekleştirilen DPPH analiz sonuçları Tablo 5.10'da verilmektedir. Tablo incelendiğinde tüm ekstrakt ve uçucu yağların %0,122-98,852 aralığında ortalama süpürme; 5,718-734,885 mg/L aralığında trolox ve 5,18-1509,86 mg/L aralığında IC_{50} değerleri verdiği belirlenmiştir. Bitki kaynaklarından elde edilen gıda ürünlerinde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler ve flavonoidlerin, serbest radikalleri inhibe edici özelliği sebebiyle antioksidan aktivitede oldukları düşünülmektedir (Hosseinimehr vd. 2007; Sağlam, 2021). Tüm örneklerin çözücüler arasındaki ilişkileri incelendiğinde en yüksek süpürme yüzdesi ile en düşük trolox ve IC_{50} değerlerini veren yani en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterenler polaritesi yüksek olan çözücüler olmuş ve bu durum toplam fenolik madde tayini sonuçları ile ilişkilendirilmiştir. Ortamda kalan serbest radikali ifade eden trolox ile ortamdaki serbest radikali %50 oranında azaltabilecek IC_{50} değerleri polaritesi yüksek olan organik çözücülerde yani aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktlarda yaklaşık dört kat düşük değerler vermiş ve dolayısıyla yüksek antioksidan aktivitede olduklarını göstermiştir. Organik çözücüler içerisinde polaritesi düşük olan hekzan ise 685,417-719,043 mg/L aralığında ortalama trolox ve 531,17-1509,86 mg/L aralığında IC_{50} değeri ile antioksidan aktivitesinin zayıf olduğunu göstermiştir. Polar yapıdaki organik çözücülerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesi derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre yaklaşık iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Derin ötektik çözücülerin kendi arasındaki IC_{50} değerlerinin karşılaştırılmasında ise döç-1, döç-2 ve döç-4 çözücülerinden elde edilen ekstraktların döç-3 çözücüsünden elde edilen

ekstraktlara göre üç kat daha yüksek antioksidan aktivitede olduğu ve toplam fenolik madde içeriği ile bağlantılı olduğu öngörülmüştür. Ayrıca polar yapıda oldukları bilinen derin ötektik çözücülerin polaritelerine göre antioksidan aktivite bakımından farklı sonuçlar gösterdiği düşünülmektedir. Analizi gerçekleştirilen 40 örnek içerisinde en yüksek antioksidan aktiviteyi, 130 mg/100ml; 85 mg/100ml; 40 mg/100ml derişimlerdeki ortalama trolox değerleri sırasıyla 46,967 mg/L; 148,742 mg/L; 244,689 mg/L ve IC_{50} değeri 5,18 mg/L olan aseton çözücüsünden elde edilen kayın ekstraktı, en düşük antioksidan aktiviteyi ise 130 mg/100ml; 85 mg/100ml; 40 mg/100ml derişimlerdeki ortalama trolox değerleri sırasıyla 705,892 mg/L; 719,043 mg/L; 728,010 mg/L ve IC_{50} değeri 1509,86 mg/L olan hekzan çözücüsünden elde edilen göknar ekstraktı vermiştir. Tablo 5.10 incelendiğinde, yüksek ya da düşük 5,18-1509,86 mg/L aralığındaki IC_{50} değerleri, her bir çözücünün karaçam, meşe, göknar ve kayın ağacı örneklerinden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağlarının antioksidan aktivite bakımından etkin olduğunu göstermektedir. Bouras vd. (2015), *Quercus robur* kabuğundan MEY ile %75'lik metanol:su ve %75'lik etanol:su çözücüleri kullanılarak elde ettikleri ekstraktların antioksidan aktivitesini DPPH analizi ile 4-6 g TE/100 g olarak belirlemişlerdir. Alara vd. (2019), DPPH analizi ile antioksidan aktivitesini belirlemek istedikleri ekstraktları soxhlet ve MEY ile elde etmişler ve sırasıyla IC_{50} değerlerini 321,37 µg/mL; 286,00 µg/mL olarak hesaplamışlardır. Bu çalışma, MEY ile elde edilen ekstraktın antioksidan aktivitesinin geleneksel yöntemle elde edilen ekstraktın antioksidan aktivitesinden daha yüksek olduğunu ortaya koymuş ve mevcut tez çalışmasındaki ekstraktların yüksek antioksidan aktivitede olmasını desteklemiştir.

Tukey testine göre, DPPH analizinde üç tekrarlı çalışma sonuçlarından elde edilen verilerle gerçekleştirilen Tüm-İst testinde, numunelerin IC_{50} değerinin sonuçları arasındaki istatiksel farklılığa ($P<0,05$) göre aseton+Kç, metanol+M ve etanol+K numuneleri; aseton+G, metanol+G ve metanol+K numuneleri ile aseton+M, etanol+M ve saf su+G numuneleri aynı grup içerisinde bulunduklarından istatiksel anlamda ($P<0,05$) aralarında belirgin bir faklılık olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 5.10).

Çöz-İst testinde, geleneksel çözücülerden elde edilen numunelerin IC_{50} değerleri arasındaki istatiksel farklılık ($P<0,05$) incelendiğinde aseton+M, aseton+G, metanol+M, metanol+G, metanol+K ve saf su+G numuneleri istatiksel olarak

(P<0,05) birbirine yakın özellikler göstermişler ve aynı grupta yer almışlardır. Derin ötektik çözücülerden elde edilen döç-1+Kç, döç-2+K ve döç-4+G numuneleri aynı grupta bulundukları için istatiksel olarak (P<0,05) fark göstermemişlerdir. Yapılan homojenlik grubu testleri sonucunda geleneksel çözücülerden aseton, metanol, etanol ile derin ötektik çözücülerden döç-1, döç-2 ve döç-3 çözücülerinden elde edilen numunelerin ortak gruplarda yer alması birbirine yakın antioksidan aktivitede olmalarını da açıklamaktadır (Tablo 5.10).

Tür-İst testinde, bitki türüne göre gruplar değerlendirildiğinde tüm ağaç türlerinden elde edilen numunelerin tekrarlı olarak aynı gruplarda bulunmadığı gözlenmiştir. Karaçam, meşe ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen numunelerin IC_{50} değerleri istatiksel olarak (P>0,05) anlamlı bir farka sahip olmasından dolayı harflerle çok sayıda gruba ayrılmıştır. Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen aseton+G, metanol+G ve etanol+G numuneleri aynı grup içerisinde yer aldıklarından istatiksel anlamda (P<0,05) benzer özellikler gösterdikleri belirlenmiştir (Tablo 5.10).

Tablo 5.10. DPPH analiz verileri

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Antioksidan Süpürme (%)	%RSD	Ortalama Trolox (mg/L)	%RSD	Eşitlik	R^2	IC_{50} (mg/L)
				Serbest radikal 734,287				
Des-1+Kç	130	36,533±0,460^{j,E,4}	0,212	464,679±3,395^{k,F,5}	0,731	y = 0,2502x + 4,6534	0,9902	181,24^{klm,G,7}
	85	27,217±0,172^{hı,DE,4}	0,030	533,426±1,268^{i,F,5}	0,238			
	40	14,014±0,612^{kl,DE,4}	0,374	630,868±4,513^{gh,D,3}	0,715			
Döç-1+M	130	95,180±1,217^{abc,A,1}	1,481	26,791±2,536^{tu,J,5}	9,467	y = 0,6289x + 16,929	0,9560	52,59^{öprsş,J,6,7}
	85	77,400±1,203^{ab,A,1}	1,447	163,089±8,877^{öp,İ,7}	5,443			
	40	38,578±1,117^{g,A,3}	1,248	449,585±8,243^{n,H,6}	1,833			
Döç-1+G	130	42,122±0,491^{i,D,4}	0,241	423,431±3,624^{l,G,6}	0,856	y = 0,3026x + 3,1612	0,9977	154,79^{lmn,H,45}
	85	29,648±1,718^{h,D,4}	2,953	498,455±11,413^{j,G,6}	2,290			
	40	14,885±0,086^{jk,CD,4}	0,007	624,441±0,634^{h,D,5}	0,102			
Döç-1+K	130	73,876±0,344^{f,B,4}	0,118	189,094±2,536^{ö,I,5}	1,341	y = 0,5247x + 6,0253	0,9993	83,81^{oöpr,İ,6}
	85	51,357±1,033^{ef,B,4}	1,068	350,948±1,902^{m,I,4}	0,542			
	40	26,650±1,096^{ıi,B,5}	1,201	533,426±5,073^{j,G,4}	0,951			

Tablo 5.10. Devamı…

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Antioksidan Süpürme (%)	%RSD	Ortalama Trolox (mg/L)	%RSD	Eşitlik	R^2	IC_{50} (mg/L)
				Serbest radikal 734,287				
	130	8,343±0,669^{p,İ,8}	0,448	670,173±3,170^{bc,A,1}	0,473			
Döç-2+Kç	85	3,443±1,103^{oö,I,7}	1,216	708,283±4,438^{a,A,1}	0,627	y = 0,0913x - 3,7949	0,9879	589,21^{e,A,2}
	40	0,122±1,380^{öp,I,8}	1,905	739,219±1,902^{a,A,1}	0,257			
	130	75,638±0,086^{ef,B,2}	0,007	176,091±0634^{p,İ,4}	0,360			
Döç-2+M	85	53,524±0,258^{de,B,2}	0,066	339,291±1,902^{m,I,6}	0,561	y = 0,5913x + 0,2633	0,9906	84,11^{oöpr,İ,56}
	40	22,418±0,086^{i,B,4}	0,007	568,846±0,634^{i,F,5}	0,111			
	130	18,834±0,859^{mn,HI,7}	0,738	595,299±6,341^{f,B,3}	1,065			
Döç-2+G	85	10,652±0,460^{klm,HI,6}	0,212	655,676±3,395^{cd,B,2}	0,518	y = 0,1735x - 3,8446	0,9992	310,34^{hı,D,3}
	40	3,220±0,601^{oöp,HI,67}	0,362	710,525±4,438^{cd,B,2}	0,625			
	130	32,382±1,117^{k,EF,5}	1,248	495,317±8,243^{ij,DE,4}	1,664			
Döç-2+K	85	14,338±0,516^{jk,FGH,5}	0,266	628,477±3,804^{ef,C,2}	0,605	y = 0,3159x - 9,9637	0,9764	189,82^{kl,G,5}
	40	3,949±0,258^{noö,GHI,7}	0,066	705,144±1,902^{d,B,2}	0,270			
				Serbest radikal 673,312				
	130	15,629±0,530^{no,I,7}	0,281	567,501±3,587^{hı,C,23}	0,632			
Döç-3+Kç	85	9,360±0,626^{klmno,HI,6}	0,392	609,945±4,238^{fg,D,3}	0,695	y = 0,102x + 1,8055	0,9574	472,50^{f,B,3}
	40	6,446±0,276^{no,GH,5}	0,076	629,672±1,867^{gh,D,3}	0,296			
	130	30,861±0,562^{k,EF,3}	0,316	464,380±3,804^{k,F,2}	0,819			
Döç-3+M	85	21,589±0,397^{ii,EF,4}	0,158	527,149±2,690^{i,F,4}	0,510	y = 0,2237x + 2,0448	0,9979	214,37^{jkl,F,4}
	40	10,728±0,350^{lm,EF,5}	0,123	600,679±2,372^{ı,E,4}	0,395			
	130	24,459±0,333^{l,G,6}	0,111	507,721±2,257^{i,D,4}	0,444			
Döç-3+G	85	20,265±1,084^{ij,EFG,5}	1,175	532,081±3,170^{i,F,5}	0,596	y = 0,1217x + 9,0706	0,9821	336,31^{gh,C,3}
	40	13,510±0,869^{kl,DE,4}	0,754	578,710±3,170^{i,F,6}	0,548			
	130	16,159±0,132^{no,I,7}	0,018	563,914±0,897^{hı,C,3}	0,159			
Döç-3+K	85	11,523±0,397^{klm,H,56}	0,158	595,299±2,690^{gh,D,3}	0,452	y = 0,0966x + 3,4996	0,9986	481,37^{f,B,3}
	40	7,461±0,667^{mn,FG,6}	0,444	620,406±2,536^{h,D,3}	0,409			
				Serbest radikal 734,287				
	130	21,466±0,612^{lm,GH,6}	0,374	575,870±4,513^{gh,C,2}	0,784			
Döç-4+Kç	85	11,665±1,114^{kl,H,6}	1,240	643,720±3,804^{cde,BC,2}	0,591	y = 0,1899x - 3,6408	0,9929	282,47^{hıi,E,5}
	40	4,374±0,687^{noöp,GHI,67}	0,472	702,006±5,073^{d,B,2}	0,723			
	130	58,080±1,458^{h,C,3}	1,063	300,284±7,609^{n,H,3}	2,534			
Döç-4+M	85	40,340±0,729^{g,C,3}	0,531	436,583±5,380^{k,F,5}	1,232	y = 0,4327x + 2,4062	0,9974	109,99^{noö,I,5}
	40	19,137±0,086^{j,C,4}	0,007	593,057±0,634^{ı,E,4}	0,107			
	130	33,657±0,859^{jk,EF,5}	0,738	485,901±6,341^{i,E,5}	1,305			
Döç-4+G	85	21,871±2,921^{ii,E,5}	8,534	572,881±21,558^{ı,E,4}	3,763	y = 0,297x - 4,4279	0,9954	183,26^{klm,G,4}
	40	6,926±1,890^{no,FGH,5}	3,573	683,175±13,949^{e,C,3}	2,042			
	130	22,843±1,890^{l,G,6}	3,573	565,708±13,949^{hı,C,3}	2,466			
Döç-4+K	85	13,001±1,031^{k,GH,56}	1,063	638,340±7,609^{de,BC,2}	1,192	y = 0,2012x - 3,5706	0,9975	266,26^{ij,E,4}
	40	4,739±0687^{noö,GHI,7}	0,472	699,316±5,073^{d,B,2}	0,725			

Tablo 5.10. Devamı…

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Antioksidan Süpürme (%)	%RSD	Ortalama Trolox (mg/L)	%RSD	Eşitlik	R^2	IC_{50} (mg/L)
				Serbest radikal 673,312				
	130	96,336±0,465^{abc,ABC,1}	0,216	22,756±1,902^{tuü,KLM,8}	8,359			
As+Kç	85	79,603±1,051^{bc,BC,1}	1,105	138,430±1,902^{rs,İJ,5}	1,374	y = 0,5671x + 25,543	0,9620	43,13^{prsş,HİİJ,9}
	40	45,298±0,187^{f,G,1}	0,035	366,640±1,268^{ö,H,6}	0,346			
	130	98,234±1,071^{ab,A,1}	1,146	11,547±6,341^{üv,NO,5}	54,912			
As+M	85	80,706±0,753^{abc,B,1}	0,567	126,922±5,099^{s,J,9}	4,017	y = 0,4101x + 45,23	0,9992	11,63^{sş,İİ,8}
	40	61,325±1,311^{ab,AB,1}	1,719	258,139±8,877^{ş,K,8}	3,439			
	130	96,115±0,426^{abc,ABC,1}	0,181	20,962±0,634^{tuü,LM,9}	3,025			
As+G	85	77,130±1,333^{bc,BCD,2}	1,778	155,916±5,073^{öpr,İİ,8}	3,253	y = 0,416x + 41,947	0,9999	19,36^{rsş,İİ,6}
	40	58,675±0,375^{bc,BC,12}	0,140	279,062±5,479^{s,J,9}	1,963			
	130	93,201±1,273^{c,C,2}	1,620	46,967±4,438^{ş,J,7}	9,450			
As+K	85	76,733±1,327^{bc,BCD,2}	1,760	148,742±2,536^{öpr,İİ,67}	1,705	y = 0,3434x + 48,222	0,9986	5,18^{ş,İ,8}
	40	62,296±1,837^{a,A,1}	3,374	244,689±5,073^{t,L,8}	2,073			
				Serbest radikal 734,287				
	130	8,222±0,253^{p,İ,h8}	0,064	673,610±1,867^{b,B,1}	0,277			
Hk+Kç	85	4,374±1,159^{noö,İ,7}	1,344	706,938±0,634^{a,A,1}	0,090	y = 0,065x - 0,5395	0,9680	777,53^{c,B,1}
	40	2,369±1,976^{öp,,L,78}	3,905	733,839±9,511^{a,A,1}	1,296			
	130	10,571±1,059^{öp,İ,6}	1,122	660,758±1,268^{c,C,1}	0,192			
Hk+M	85	6,622±1,461^{lmnoö,İİ,5}	2,133	685,417±10,779^{b,B,1}	1,573	y = 0,0979x - 2,0013	0,9964	531,17^{ef,D,2}
	40	1,762±0,601^{öp,L,6}	0,362	721,285±4,438^{bc,AB,1}	0,615			
	130	3,848±0,516^{r,J,9}	0,266	705,892±2,882^{a,A,1}	0,408			
Hk+G	85	2,957±1,548^{ö,İ,7}	3,255	719,043±1,268^{a,A,1}	0,176	y = 0,0333x - 0,2785	0,9481	1509,86^{a,A,1}
	40	0,851±1,031^{p,L,7}	1,063	728,010±7,609^{ab,A,1}	1,045			
	130	7,857±1,519^{p,İ,8}	2,308	670,621±7,609^{bc,B,1}	1,135			
Hk+K	85	5,711±1,059^{mnoö,İİ,7}	1,122	687,659±1,268^{b,B,1}	0,184	y = 0,0785x - 1,8884	0,9511	661,00^{d,C,2}
	40	0,790±0,258^{p,L,8}	0,066	728,459±1,902^{ab,A,1}	0,261			
				Serbest radikal 673,312				
	130	64,106±1,000^{g,F,2}	1,000	235,722±3,804^{o,G,7}	1,614			
Mt+Kç	85	50,199±0,795^{f,,F,2}	0,632	336,152±3,804^{m,F,7}	1,132	y = 0,3939x + 14,169	0,9848	90,96^{noöp,GH,8}
	40	28,653±0,667^{t,İ,2}	0,444	479,325±4,513^{m,F,5}	0,942			
	130	96,556±1,034^{abc,ABC,1}	1,070	15,582±0,634^{uüv,MN,4}	4,069			
Mt+M	85	78,896±1,677^{bc,BCD,1}	2,813	145,604±3,170^{prs,İJ,8}	2,177	y = 0,4628x + 37,444	0,9923	27,13^{prsş,İİ,78}
	40	54,901±1,030^{d,E,2}	1,061	301,629±6,975^{r,İ,7}	2,312			
	130	96,336±0,862^{abc,ABC,1}	0,743	24,101±3,804^{tuü,KL,9}	15,785			
Mt+G	85	76,247±0,597^{bc,CD,2}	0,357	157,111±4,043^{öpr,İİ,8}	2,574	y = 0,4221x + 41,094	0,9989	21,10^{rsş,İİ,6}
	40	58,344±0,656^{bc,BC,1}	0,430	278,315±4,438^{s,J,9}	1,595			
	130	94,746±0,535^{bc,BC,12}	0,287	29,929±1,902^{t,K,8}	6,356			
Mt+K	85	74,901±1,030^{c,D,2}	1,061	166,228±6,975^{ö,I,6}	4,196	y = 0,4148x + 40,433	0,9987	23,06^{rsş,İİ,78}
	40	57,417±0,094^{cd,CD,2}	0,009	284,592±0,634^{s,J,7}	0,223			
	130	51,788±0,375^{ı,,G,3}	0,140	322,702±2,536^{m,F,6}	0,786			
Et+Kç	85	41,258±1,405^{g,G,3}	1,974	393,989±9,511^{l,E,6}	2,414	y = 0,3105x + 12,568	0,9802	120,55^{mno,G,8}
	40	23,841±0,607^{i,J,3}	0,368	511,906±4,109^{k,D,4}	0,803			

Tablo 5.10. Devamı…

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Antioksidan Süpürme (%)	%RSD	Ortalama Trolox (mg/L)	%RSD	Eşitlik	R^2	IC_{50} (mg/L)
				Serbest radikal 673,312				
Et+M	130	96,600±0,798^{abc,AB,1}	0,637	16,479±3,170^{uüv,LMN,5}	19,239	y = 0,3743x + 47,111	0,9927	7,72^{ss,İ,8}
	85	77,263±0,930^{bc,BCD,1}	0,865	150,237±6,298^{öpr,Iİ,78}	4,192			
	40	62,914±0,749^{a,A,1}	0,561	247,379±5,073^{st,KL,8}	2,050			
Et+G	130	77,748±0,350^{e,E,3}	0,123	146,949±2,372^{r,I,7}	1,614	y = 0,4474x + 20,677	0,9913	65,54^{oöprss,GHİİ,56}
	85	60,883±0,902^{d,E,3}	0,813	257,691±1,902^{o,,H,7}	0,738			
	40	37,483±0,701^{g,H,3}	0,491	419,545±4,745^{o,G,7}	1,131			
Et+K	130	98,852±0,465^{a,A,1}	0,216	5,718±1,902^{v,NO,9}	33,265	y = 0,5509x + 29,436	0,9769	37,33^{prss,HIİ,7}
	85	80,662±0,375^{abc,B,1}	0,140	129,015±3,587^{s,J,7}	2,780			
	40	49,272±0,375^{e,F,3}	0,140	339,739±2,536^{p,I,6}	0,747			
				Serbest radikal 734,287				
Ss+Kç	130	31,470±0,687^{jk,H,5}	0,472	502,042±5,073^{i,E,4}	1,010	y = 0,2075x + 3,8256	0,9846	222,53^{ijk,F,6}
	85	20,109±0,773^{ii,H,5}	0,598	585,883±5,707^{h,ı,D,4}	0,974			
	40	12,799±0,712^{kl,K,4}	0,507	639,835±5,254^{fg,C,3}	0,821			
Ss+M	130	15,391±1,096^{no,I,5}	1,201	624,890±5,073^{d,D,1}	0,812	y = 0,1332x - 1,8319	0,9993	389,13^{g,E,3}
	85	9,680±0,599^{klmn,I,5}	0,359	662,850±4,423^{c,C,2}	0,667			
	40	3,402±0,530^{oöp,L,6}	0,281	709,180±3,909^{cd,B,2}	0,551			
Ss+G	130	86,189±1,450^{d,D,2}	2,101	92,250±3,804^{s,İ,8}	4,124	y = 0,3582x + 44,926	0,7547	14,17^{ss,İİ,6}
	85	85,986±0,612^{a,A,1}	0,374	99,722±4,513^{ş,K,9}	4,526			
	40	53,949±0,516^{cd,DE,2}	0,266	336,152±3,804^{p,I,8}	1,132			
Ss+K	130	77,217±0,086^{e,E,3}	0,007	164,434±0,634^{p,H,6}	0,386	y = 0,4955x + 14,102	0,9900	72,45^{oöprs,GHI,6}
	85	58,809±4,124^{d,E,3}	17,008	300,284±30,435^{n,G,5}	10,135			
	40	32,625±0,258^{h,I,4}	0,066	493,523±1,902^{l,E,5}	0,385			
				Serbest radikal 673,312				
U.Y.+Kç	130	16,623±0,094^{no,7}	0,009	560,776±0,634^{ı,3}	0,113	y = 0,1356x - 0,1461	0,9432	369,81^{g,4}
	85	13,113±0,749^{k,6}	0,561	584,538±5,073^{hı,4}	0,868			
	40	4,415±0,798^{noöp,56}	0,637	640,582±3,170^{fg,3}	0,495			
U.Y.+M	130	8,124±0,202^{p,6}	0,041	618,314±1,370^{de,1}	0,222	y = 0,0451x + 2,4773	0,9658	1053,72^{b,1}
	85	6,755±0,737^{lmnoö,5}	0,544	627,580±4,993^{ef,7}	0,796			
	40	4,062±0,551^{noöp,6}	0,304	645,813±3,733^{f,3}	0,578			
U.Y.+G	130	9,316±0,729^{öp,8}	0,532	610,244±4,939^{e,2}	0,809	y = 0,0454x + 3,0819	0,9253	1033,44^{b,2}
	85	6,269±0,551^{lmnoö,7}	0,304	630,868±3,733^{e,3}	0,592			
	40	5,232±0,281^{noöp,56}	0,079	637,892±1,902^{fg,4}	0,298			
U.Y.+K	130	12,892±0,597^{oö,7}	0,357	586,033±4,043^{fg,2}	0,690	y = 0,0633x + 4,6571	1,0000	716,32^{cd,1}
	85	10,022±0,276^{klmn,6}	0,076	605,461±1,867^{g,3}	0,308			
	40	7,196±0,153^{mn,6}	0,023	624,591±1,035^{h,3}	0,166			

RSD: Bağıl standart sapma

Tukey testine göre, aynı sütundaki farklı harfler ilgili değerlerin antioksidan aktivite (DPPH) değerlerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Değerlerin karşılaştırılması üç farklı kategoride gerçekleştirilmiştir.

1. Büyükten küçüğe a ile z aralığında sıralama

Tüm numunelere bağlı olarak, 130, 85, 40 mg/100 ml derişimdeki % süpürme ve trolox ile IC_{50} taraması

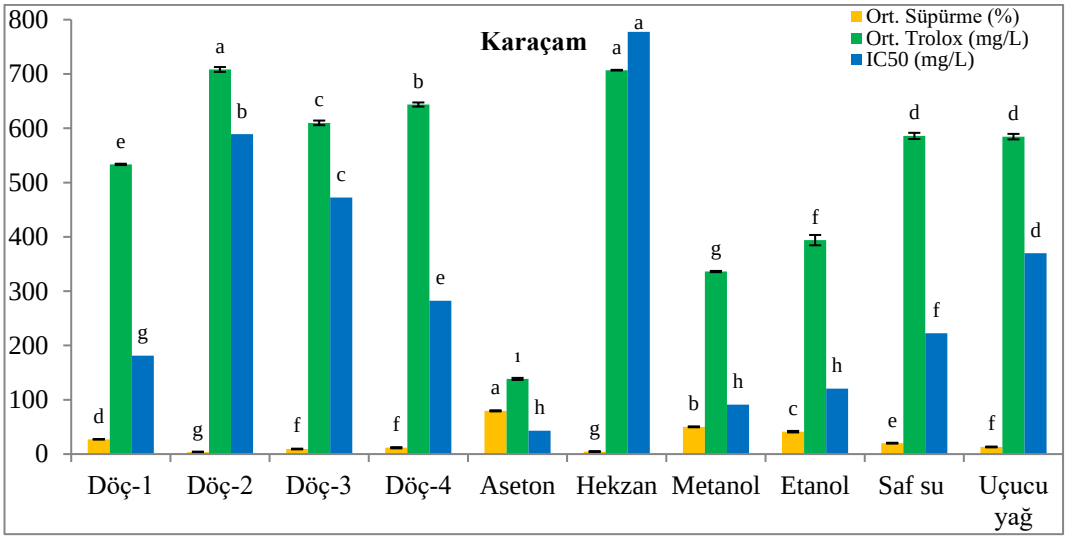
2. Büyükten küçüğe A ile Z aralığında sıralama

Geleneksel ve derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelere bağlı olarak, 130, 85, 40 mg/100 ml derişimdeki % süpürme ve trolox ile IC_{50} taraması

3. Büyükten küçüğe 1 ile 9 aralığında sıralama

Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın ağacından elde edilen numunelere bağlı olarak, 130, 85, 40 mg/100 ml derişimdeki % süpürme ve trolox ile IC_{50} taraması

Karaçam ağacından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktlarının ve uçucu yağının antioksidan aktivesini belirlemek için DPPH analizi ile elde edilen ortalama süpürme yüzdesi, ortalama trolox değerleri ve IC_{50} değerleri Grafik 5.10'de verilmiştir. Organik çözücüler içerisinde polaritesi yüksek olan aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama süpürme yüzdesi sırasıyla %79,603; %50,199; %41,258; %20,109 olarak hesaplanmıştır. Yine aynı şekilde organik çözücüler içerisinde polaritesi yüksek olan aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama trolox değerleri sırasıyla 134,395 mg/L; 333,462 mg/L; 401,910 mg/L; 577,962 mg/L ve IC_{50} değerleri ise sırasıyla 43,13 mg/L; 90,96 mg/L; 120,55 mg/L; 222,53 mg/L olarak elde edilmiş ve diğer çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre antioksidan aktivite bakımından etkinlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Toplam fenolik bileşen içeriğin yoğun olarak elde edildiği polaritesi yüksek organik çözücülerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite sonuçlarıyla paralellik göstermesi beklenen bir sonuç olmuştur. Karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın içerisinde %79,603 süpürme yüzdesi, 138,430 mg/L ortalama trolox ve 43,13 mg/L IC_{50} değerlerini veren aseton çözücüsünden elde edilen ekstraktın antioksidan aktivite bakımından diğer ekstraktlara göre yaklaşık dokuz kat daha yüksek antioksidan aktivitede olduğu gözlemlenmiştir. Tüm çözücüler içerisinde apolar yapıdaki hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktın ortamdaki serbest radikali süpürme yüzdesi %4,374; ortalama trolox ve IC_{50} değerleri sırasıyla 702,006 mg/L; 777,53 mg/L olarak belirlenmiş ve antioksidan aktivitesinin zayıf olduğu tespit edilmiştir. Milic vd. (2021), yaptıkları çalışmada karaçam ağacından aseton, metanol ve etanolden elde edilen ekstraktların, antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH analizi gerçekleştirmiş ve her bir ekstrakt için sırasıyla 3,35 mg/g; 10,6 mg/g; 8,36 mg/g trolox değerlerini elde etmişlerdir.



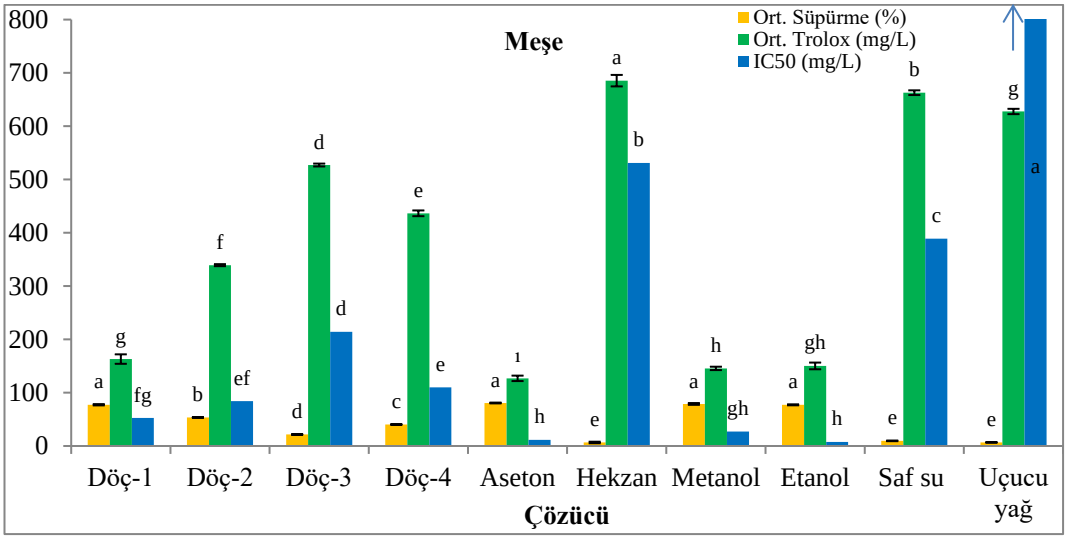
Grafik 5.10. Karaçam ekstraktları ve uçucu yağı için DPPH analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortamda kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması

Bu çalışmada karaçam ağacının metanol ekstraktından elde edilen 90,96 mg/L IC_{50} değeri ile yüksek antioksidan aktivitede olduğu belirlenmiş ve Horozic vd.'de (2019) yapmış oldukları çalışmada karaçam yapraklarından elde ettikleri ekstraktın DPPH analizi ile IC_{50} değerini 1,632 mg/ml elde edip antioksidan aktivitesini belirlemişlerdir. Bu tez çalışmasında karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinde etanol kullanılarak elde edilen ekstraktının IC_{50} değeri 120,55 mg/L olarak hesaplanmıştır. Ouyang vd. (2017), yaptıkları çalışmada etanol çözücüsü kullanılarak elde edilen karaçam ekstraktlarının IC_{50} değerlerini 5,23-18,80 mg/mL aralığında elde etmişlerdir. Döç-1, döç-4, aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktların düşük IC_{50} değerleri vererek yüksek antioksidan aktivitede olduğu belirlenirken döç-2, döç-3 ve hekzan çözücülerinden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın yaklaşık üç kat daha düşük antioksidan aktivitede olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite bakımından bu farkın oluşmasını sağlayan durum çözücülerin polariteleri olduğu düşünülmektedir. Derin ötektik çözücüler arasındaki ilişki incelendiğinde döç-1 ve döç-4 çözücülerinden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesinin döç-2 ve döç-3 çözücülerinden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesinden yaklaşık %50 daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Derin ötektik çözücüler arasındaki antioksidan aktivite farkının çözücülerin polaritelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Organik çözücüler arasındaki ilişki incelendiğinde ise aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesinin, hekzan

çözücüsünden elde edilen ekstraktın antioksidan aktivitesinden yaklaşık beş kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Çünkü; aseton, metanol ve etanol gibi polar yapıda olan çözücülerin antioksidan aktivite bakımından belirleyici olan fenolik bileşenleri çözme kabiliyeti apolar yapıdaki hekzana göre iyi sonuçlar vermektedir.

Grafik 5.11'de meşe ağacından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın DPPH analizi ile elde edilen süpürme yüzdesi, trolox ve IC_{50} değerlerine göre antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Meşe ağacından elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın içerisinde tüm derişimlerinde %80,706 ile en yüksek ortalama süpürme yüzdesi değerini veren aseton çözücüsünden elde edilen ekstrakt olmuştur. Ayrıca aseton çözücüsünden elde edilen ekstrakt en düşük 126,922 mg/L ortalama trolox ve 11,63 mg/L IC_{50} değerlerini vererek yüksek antioksidan aktivite olduğunu göstermiştir. Karaçam ağacı için en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren aseton ekstraktı meşe ağacı içinde yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. En düşük trolox ve IC_{50} değerlerini veren aseton çözücüsünden elde edilen ekstraktın ortamdaki en düşük serbest radikale sahip olduğu ve ortamdaki serbest radikalin %50'sini süpürmek için en düşük IC_{50} değerini verdiği tespit edilmiştir. Polaritesi yüksek olan organik çözücüler; aseton, metanol ve etanolden elde edilen ekstraktların, ortalama süpürme yüzdesi olarak sırasıyla %80,706; %78,896; %77,263 ile yüksek değerler vermiştir. Aynı organik çözücüler aseton, metanol ve etanolden elde edilen ekstraktların, sırasıyla 126,922 mg/L; 145,604 mg/L; 150,237 mg/L ortalama trolox değerleri ve IC_{50} için sırasıyla 11,63 mg/L; 27,13 mg/L; 7,72 mg/L olarak elde edilen sonuçlar, diğer çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre antioksidan aktivite bakımından daha etkin olduğunu göstermektedir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar ise yüksek antioksidan aktivite gösteren aseton, metanol ve etanol çözücülerinden elde edilen ekstraktlar ile düşük antioksidan aktivitede olan hekzandan elde edilen ekstrakt ve uçucu yağ değerleri arasında değerler vererek antioksidan aktivitede oldukları tespit edilmiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri IC_{50} değerlerine göre değerlendirildiğinde büyükten küçüğe döç-1, döç-2, döç-4 ve döç-3 çözücülerinden elde edilen ekstraktlar sırasıyla 52,59 mg/L; 84,11 mg/L; 109,99 mg/L; 214,37 mg/L değerlerini vermişlerdir. Meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden, polaritesi yüksek olan geleneksel aseton, metanol ve etanol çözücüleri kullanılarak elde edilen ekstraktların antioksidan

aktiviteleri daha etkin sonuçlar vermiştir. Grafik 5.11 incelendiğinde tüm numuneler arasından en düşük antioksidan aktiviteyi gösteren ise apolar yapıdaki hekzan çözücüsünden elde edilen ekstrakt ve meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen uçucu yağ olmuştur. Uçucu yağın ve hekzan ekstraktının süpürme yüzdesi sırasıyla %6,755; %6,622 olarak belirlenmiştir. Ortalama trolox ve IC_{50} değerleri ise uçucu yağ için sırasıyla 627,580 mg/L; 1053,72 mg/L hekzan ekstraktı için ise sırasıyla 685,417 mg/L; 531,17 mg/L olarak belirlenmiş ve diğer ekstraktlara göre yaklaşık 3 kat düşük antioksidan aktivitede oldukları tespit edilmiştir. Organik çözücüler arasında yüksek antioksidan aktivitede olan etanol çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktının ortalama trolox değeri 138,031 mg/L olarak hesaplanmış ve başka bir çalışmada, Başyiğit vd. (2020), meşe ağacından etanol çözücüsü kullanılarak elde ettikleri meşe ekstraktın trolox değerini 2,29 mmol TEAC/g olarak hesaplamış ve yüksek antioksidan aktivitede olduğunu ifade etmişlerdir. Hekzan, saf su çözücülerinden elde edilen meşe ağacı ekstraktları ve meşe ağacından elde edilen uçucu yağ ise tüm derişimlerinde yüksek trolox değerleri vererek düşük antioksidan aktivitede olduğunu göstermiştir. Sharba vd. (2020), meşe ağacının meyvesinden etanol çözücüsünü kullanarak elde ettikleri ekstraktın, DPPH analizi ile antioksidan aktivitesini %60-80 aralığında belirlemişlerdir.



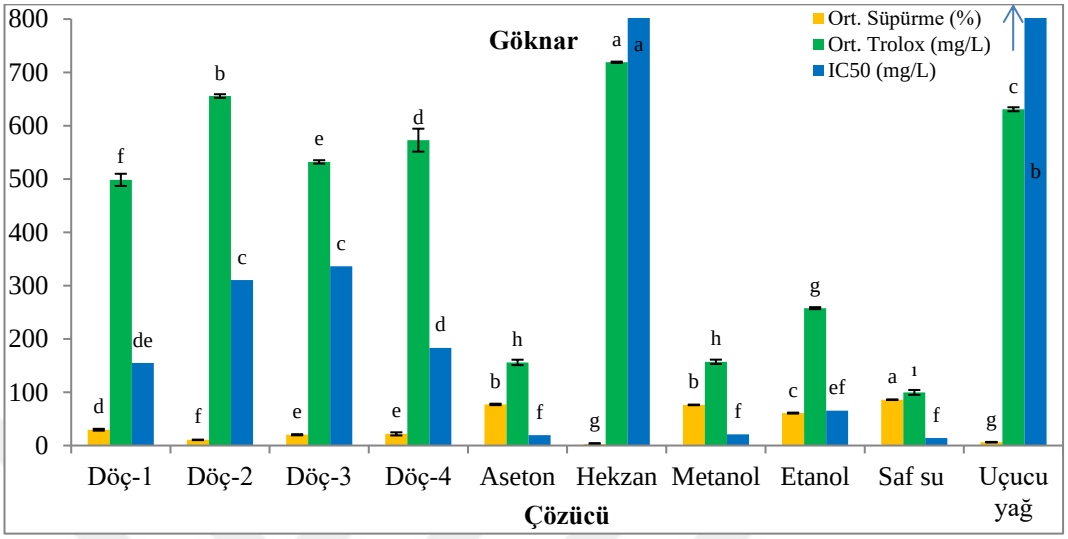
Grafik 5.11. Meşe ekstraktları ve uçucu yağı için DPPH analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortamda kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması

Tüm ekstraktların ve uçucu yağın içerisinde en yüksek antioksidan aktiviteyi 7,72 mg/L ile en düşük IC_{50} değerini veren etanol çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktı sonucu, Ştefanescu vd. (2022) yaptıkları çalışmada meşe ağacından, etanol çözücüsü kullanarak MEY ile elde ettikleri ekstraktın 11,99 µg/mL olan IC_{50} değeri ile antioksidan aktivitesini belirlemişlerdir. Yine aynı şekilde Tanase vd. (2022), yapmış oldukları çalışmada meşe ağacından, etanol çözücüsü kullanarak MEY ile elde ettikleri ekstraktın 6,24 µg/mL olan IC_{50} değeri ile antioksidan aktiviteyi hesaplamışlardır. Bu çalışmada meşe ağacının etanol ekstraktının IC_{50} değeri 7,72 mg/L olarak elde edilmiştir. Nisca vd. (2022) meşe kabuklarından su ve %70 etanol:su çözücüsü ile MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktların antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH analizi ile su ekstraktının IC_{50} değerini 2,45 µg/mL ve %70 etanol: ekstraktının IC_{50} değerini 6,92 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Nisca vd. (2023), *Quercus petreaea* ve *Quercus pubescens* kabuk ve yapraklarından su ve %70 etanol:su çözücüleri ile MEY, UEY yöntemlerini kullanarak elde ettikleri ekstraktların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen DPPH analizi ile *Q. petreaea* için IC_{50} değerini 4-6 µg/mL ve *Q. pubescens* için IC_{50} değerini 8-10 µg/mL olarak hesaplamışlardır. Tanase vd. (2022), meşe ağacı kabukları ile MEY ve UEY yöntemlerinde su ve sulu etanol çözücülerini kullanarak elde ettikleri ekstraktların antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için gerçekleştirilen DPPH analizinde, MEY yöntemi ile sudan elde ettikleri ekstraktın IC_{50} değerini; 6,91 µg/mL, MEY ile sulu etanolden elde ettikleri ekstraktın IC_{50} değerini; 6,24 µg/mL, UEY yöntemi ile sudan elde ettikleri ekstraktın IC_{50} değerini; 3,54 µg/mL, UEY yöntemi ile sulu etanolden elde ettikleri ekstraktın IC_{50} değerini; 3,32 µg/mL olarak hesaplamışlardır.

Grafik 5.12'de göknar ağacından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivesini belirlemek için DPPH analizi kullanılarak ortalama süpürme yüzdesi, ortalama trolox değerleri ve IC_{50} değerleri verilmiştir. Organik çözücüler içerisinde polaritesi yüksek olan aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama süpürme yüzdesi sırasıyla %77,130; %76,247; %60,883; %85,986 olarak hesaplanmıştır. Organik çözücüler içerisinde aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama trolox değerleri sırasıyla 155,916 mg/L; 157,111 mg/L; 257,691 mg/L; 99,722 mg/L ve IC_{50} için ise

sırasıyla 19,36 mg/L; 21,10 mg/L; 65,54 mg/L; 14,17 mg/L olarak elde edilen değerler, diğer çözücülerden elde edilen ekstraktların değerlerine göre daha düşük olduğu için yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Karaçam ağacından elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri gibi göknar ağacının, polaritesi yüksek organik çözücülerden elde edilen ekstraktları da yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. En yüksek antioksidan aktivitelerin belirlendiği aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktlar içerisinde en yüksek ortalama süpürme yüzdesini %85,986 oranını veren saf su ekstraktı olmuştur. Yine aynı şekilde saf sudan elde edilen ekstraktın ortalama trolox yani ortamda kalan serbest radikal değeri 99,722 mg/L ve IC_{50} değeri ise 14,17 mg/L olarak hesaplanmıştır. Antioksidan aktivite, trolox ve IC_{50} sonuçları ile ters orantılı olduğu için düşük ortalama trolox ve IC_{50} değerleri veren saf su ekstraktının antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Tüm ekstraktlar içerisinde en düşük antioksidan aktivitenin görüldüğü ekstrakt ise apolar yapıdaki hekzan çözücüsünden elde edilen ekstrakt olmuştur. Hekzan çözücüsünden elde edilen göknar ağacı ekstraktının süpürme yüzdesi %2,957 olarak belirlenmiştir. Ortalama trolox ve IC_{50} değerleri ise sırasıyla 719,043 mg/L; 1509,86 mg/L olarak tüm ekstraktlar içerisinde çok yüksek sonuçlar vermiş ve ters orantılı olduğu için düşük antioksidan aktivitede olduğu tespit edilmiştir. Grafik 5.12 genel olarak incelendiğinde tüm çözücülerden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivite bakımından etkin olduğu tespit edilmiştir. Tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağ 14,14-1509,86 mg/L aralığında IC_{50} değerleri vermiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar, aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen yüksek antioksidan aktivitedeki ekstraktlar ile düşük antioksidan aktivede olan uçucu yağ ve hekzan ekstraktı arasında bir seviyede antioksidan aktivite göstermiştir. Derin ötektik çözücülerden büyükten küçüğe 154,79 mg/L; 183,26 mg/L; 310,34 mg/L; 336,31 mg/L IC_{50} değerlerine veren ekstraktların antioksidan aktiviteleri büyükten küçüğe döç-1, döç-4, döç-2 ve döç-3 olarak sıralanmaktadır. Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden etanol kullanılarak elde edilen ekstraktın ortalama trolox değeri 274,728 mg/L olarak hesaplanmış ve bu çalışmaya benzer, Geana vd. (2023), *Abies alba*'nın kabuk ve iğne yapraklarından sulu metanol ve sulu etanol çözücüleri ile MEY kullanılarak elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde DPPH analizi ile *A. alba*'nın kabuğundan

elde edilen ekstrakta 135,77 mol trolox/g ve iğne yaprağından elde edilen ekstrakta 265,91 mol trolox/g değerlerini elde etmişlerdir.



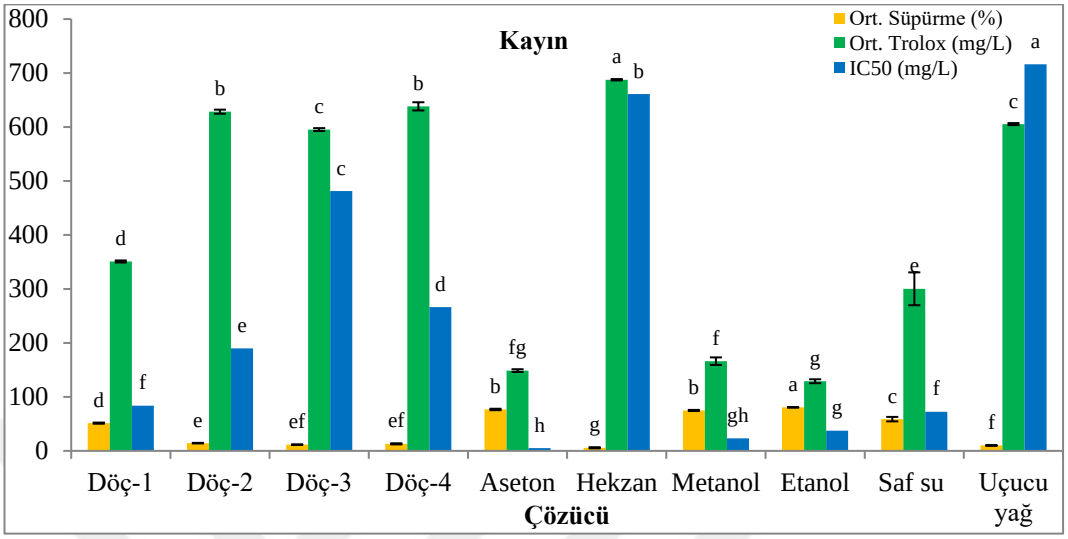
Grafik 5.12. Göknar ekstraktları ve uçucu yağı için DPPH analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortamda kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması

Göknar ağacının yapraklı sürgünlerinin metanol ve aseton çözücülerinden elde edilen ekstraktlarının 5,18-90,96 mg/L aralığında düşük IC_{50} değerleri ile yüksek antioksidan aktivitede olduğu belirlenmiş ve buna benzer başka bir çalışmada da Gupta vd. (2011), göknar ağacının yapraklarından elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri DPPH analizi ile metanol ve aseton çözücülerinden elde edilen ekstraktların sırasıyla 0,163 mg/mL; 0,194 mg/mL ile düşük IC_{50} değerlerini elde etmişlerdir. Benouchenne vd. (2021), göknar ağacının yapraklarından elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH analizi ile IC_{50} değerini 5,28 µg/mL olarak hesaplamışlardır.

Kayın ağacından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivesini belirlemek için DPPH analizi ile elde edilen ortalama süpürme yüzdesi, ortalama trolox değerleri ve IC_{50} değerleri Grafik 5.13'de verilmiştir. Organik çözücülerin içerisinde etanol, aseton, metanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama süpürme yüzdesi sırasıyla %80,662; %76,733; %74,901; %58,809 olarak hesaplanmıştır. Organik çözücüler içerisinde etanol, aseton, metanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama trolox değerleri sırasıyla 129,015 mg/L; 148,742 mg/L; 166,228 mg/L; 300,284 mg/L ve IC_{50} ise sırasıyla 37,33 mg/L;

5,18 mg/L; 23,06 mg/L; 72,45 mg/L olarak elde edilen değerler, diğer çözücülerden elde edilen ekstraktların değerlerine göre daha düşük olduğu için yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan aktivitelerin belirlendiği aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktların içerisinde 5,18 mg/L ile en düşük IC_{50} değerini veren Aseton+K ekstraktı en yüksek antioksidan aktivitenin olduğu ekstrakt olarak belirlenmiştir. Karaçam ağacının en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği aseton çözücüsünden elde edilen ekstrakt gibi kayın ağacının aseton çözücüsünden elde edilen ekstraktda en yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Tüm numuneler arasından IC_{50} değerine göre en düşük antioksidan aktiviteyi, kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen uçucu yağ ve hekzan çözücüsünden elde edilen ekstrakt sırasıyla 716,32 mg/L ve 661,00 mg/L değerleri ile göstermiştir. Uçucu yağın ve hekzan ekstraktının süpürme yüzdesi sırasıyla %10,022; %5,711 oranlarını vermiştir. Kayın ağacından elde edilen diğer ekstraktlara göre yaklaşık üç kat yüksek sonuç elde edilen ortalama trolox ve IC_{50} değerleri uçucu yağ için sırasıyla 605,461 mg/L; 716,32 mg/L hekzan ekstraktı için ise sırasıyla 687,659 mg/L; 661,00 mg/L olarak belirlenmiş ve düşük antioksidan aktivitede oldukları tespit edilmiştir. Grafik 5.13 genel olarak incelendiğinde tüm çözücülerden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivite bakımından etkin oldukları tespit edilmiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar, aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen yüksek antioksidan aktivitedeki ekstraktlar ile düşük antioksidan aktivede olan uçucu yağ ve hekzan ekstraktı arasında bir seviyede antioksidan aktivite göstermiştir. Antioksidan aktiviteleri IC_{50} değerlerine göre değerlendirilen derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların, büyükten küçüğe döç-1, döç-2, döç-4 ve döç-3 çözücülerinden elde edilen ekstraktlar sırasıyla 83,81 mg/L; 189,82 mg/L; 266,26 mg/L; 481,37 mg/L değerlerini vermiştir. Kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasındaki antioksidan aktivite ilişkisi, diğer bir geniş yapraklı ağaç türü olan meşe ağacının yapraklı sürgünlerinden derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasındaki antioksidan aktivite ilişkisi ile benzerlik göstermektedir. Hofmann vd. (2015), yaptıkları çalışmada metanol ve etanol çözücülerini kullanarak elde edilen kayın ekstraktlarının IC_{50} değerlerini sırasıyla 18,34 µg/ml; 18,68 µg/ml olarak elde etmişlerdir. Tanase vd. (2019) kayın ağacının kabuklarından elde ettikleri ekstraktların antioksidan

aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri DPPH analizinde 8,52-11,68 mg/g aralığında trolox değerleri elde etmişlerdir.



Grafik 5.13. Kayın ekstraktları ve uçucu yağı için DPPH analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortamda kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması

5.10.2 ABTS Analiz Sonuçları

Tablo 5.11'de, karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen 36 ekstrakt ve her bir ağaç örneğinden elde edilen dört uçucu yağın antioksidan aktivite tayini için gerçekleştirilen ABTS analiz sonuçları verilmektedir. Tablo'daki sonuçlar incelendiğinde 40 numune için, %0,546-98,586 aralığında ortalama süpürme; 26,369-444,734 mg/L aralığında trolox ve 1,79-844,62 mg/L aralığında IC_{50} değerleri verdiği belirlenmiştir. 36 ekstrakt ve dört uçucu yağ arasında yüksek antioksidan aktivite gösterenler yani yüksek süpürme yüzdesi ile düşük trolox ve IC_{50} değerlerini verenler yüksek ve orta seviye polaritedeki çözücüler olarak belirlenmiş ve bu tez çalışmasındaki toplam fenolik madde tayini sonuçları ile örtüşmüştür. Ortamda süpürmeden sonra kalan serbest radikali ifade eden trolox ile ortamdaki serbest radikali %50 oranında azaltabilecek IC_{50} değerleri polaritesi yüksek olan organik çözücülerden aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktlarda en düşük değerleri vererek en yüksek antioksidan aktivitede oldukları tespit edilmiş ve bu sonuç DPPH analiz sonuçları ile örtüşmüştür. ABTS analiz sonuçlarında, DPPH analiz sonuçlarından farklı olarak yüksek polaritedeki aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden daha düşük

polaritede olduğu düşünülen döç-1, döç-2, döç-3 ve döç-4 çözücülerinden elde edilen ekstraktların da söz konusu organik çözücülerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerine yakın olduğu düşünülmektedir. DPPH analiz sonuçlarında olduğu gibi ABTS analiz sonuçlarında da organik çözücüler içerisinde apolar yapıda olan hekzan çözücüsü düşük süpürme yüzdesi ve yüksek trolox ve IC_{50} değerleri ile diğer çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre yaklaşık dört kat daha düşük antioksidan aktivite göstermiştir. Derin ötektik çözücüler arasındaki karşılaştırmada, tüm ağaç örnekleri için döç-1, döç-2 ve döç-4 çözücülerinden elde edilen ekstraktların döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktda göre yaklaşık %50 daha yüksek antioksidan aktivitede olduğu belirlenmiş ve polar yapıda oldukları bilinen derin ötektik çözücülerin kendi aralarındaki polarite farklılıklarından dolayı farklı çözme karakteristiği gösterdiği ve bunlarla elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu değerlerin DPPH analizine göre belirlenmiş antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde analiz sonuçları ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Analizi gerçekleştirilen numuneler içerisinde genel olarak en yüksek antioksidan aktiviteyi, karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlar arasından 85 mg/100ml derişimdeki ortalama trolox değerleri sırasıyla 97,488 mg/L; 102,145 mg/L; 108,548 mg/L; 111,459 mg/L ve IC_{50} değerleri sırasıyla 36,85 mg/L; 20,57 mg/L; 21,42 mg/L; 26,46 mg/L olan aseton çözücüsünden elde edilen ekstraktlar göstermiştir. Çalışmada kullanılan geleneksel çözücülerden metanol, etanol ve saf su da aseton gibi yüksek polaritede olduğundan bu çözücülerden elde edilen ekstraktların da antioksidan aktivite bakımından daha etkin oldukları gözlenmiştir. En düşük antioksidan aktiviteyi ise; karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlar içerisinden 85 mg/100ml derişimdeki ortalama trolox değerleri sırasıyla 392,924 mg/L; 421,837 mg/L; 440,368 mg/L; 425,815 mg/L ve IC_{50} değerleri sırasıyla 189,24 mg/L; 844,62 mg/L; 769,90 mg/L; 635,26 mg/L olan uçucu yağlar vermiştir. Tüm numunelerin ortalama trolox ve IC_{50} sonuçları incelendiğinde antioksidan aktivite bakımından etkin oldukları gözlenmiştir. Alara vd. (2018), *Vernonia* cinerea'nın yapraklarından sulu etanol ile MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için ABTS analizi ile IC_{50} değerini 169,52 µg/mL ve H_2O_2 analizi ile IC_{50} değerini 145,34 µg/mL olarak belirlemişlerdir.

Tukey testine göre, ABTS analizinde üç tekrarlı çalışma sonuçlarından elde edilen verilerle gerçekleştirilen Tüm-İst testinde, numunelerin IC_{50} sonuçları arasındaki istatiksel farklılık değerlendirildiğinde hekzan+K, uçucu yağ+M ve uçucu yağ+G numuneleri istatiksel anlamda (P>0,05) farklı gruplarda yer alarak diğer numunelerden tamamen farklı olduğu gözlenmiştir. Homojenlik grubuna göre, 40 numune içerisinden 16 numune istatiksel anlamda (P<0,05) benzer özellikler gösterdikleri için aynı grup içerisinde yer almıştır (Tablo 5.11).

Çöz-İst testinde, geleneksel çözücülerden elde edilen aseton+M, aseton+G, metanol+K, etanol+G ve etanol+K numunelerin IC_{50} değerinin sonuçları istatiksel olarak (P<0,05) değerlendirildiğinde aynı grup içerisinde yer aldıklarından ötürü benzerlik gösterdikleri gözlenmiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelerin IC_{50} değerinin sonuçları arasındaki istatiksel farklılık (P<0,05) değerlendirildiğinde ise döç-2+G, döç-2+K, döç-4+Kç ve döç-4+K numunelerinin birbirlerine yakın özellikte olmalarından kaynaklı aynı grupta bulundukları tespit edilmiştir. Yapılan homojenlik grubu testlerinin sonucunda geleneksel çözücülerden aseton, metanol, etanol ile derin ötektik çözücülerden döç-1, döç-2 ve döç-3 çözücülerinden elde edilen numunelerin ortak gruplarda yer alması istatiksel anlamda (P<0,05) benzerliklerini ve birbirlerine yakın antioksidan aktivitede olmalarını göstermektedir (Tablo 5.11).

Tür-İst testinde, IC_{50} değerleri ile yapılan istatiksel anlamda (P<0,05) karşılaştırmalarda karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen döç-1+Kç ve hekzan+Kç numuneleri diğer tüm numunelerden istatiksel olarak (P<0,05) anlamlı bir farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden farklı çözücüler kullanılarak elde edilen döç-3+M ve uçucu yağ+M farklı grupta bulundukları için istatiksel olarak (P<0,05) anlamlı bir farklılık göstermiştir. Ancak döç-1+M, döç-2+M, döç-4+M, aseton+M, metanol+M, Etanol+M ve Saf su+M numuneleri aynı özellikte olmaları sebebiyle ortak grupta bulundukları ve bu nedenle istatiksel anlamda (P<0,05) aralarında belirgin bir fark olmadığı belirlenmiştir. Göknar ağacından elde edilen numunelerin IC_{50} değerleri arasındaki ilişkiye göre döç-2+G, döç-3+G, hekzan+G ve uçucu yağ+G istatiksel olarak (P>0,05) diğer numunelerden anlamlı bir farklılık göstermiştir. Kayın ağacının yapraklı yıllık

sürgünlerinden elde edilen numunelerden aseton+K, metanol+K, etanol+K ve saf su+K aynı grup içerisinde yer aldıklarından istatiksel anlamda ($P<0,05$) birbirlerine benzer özellikte oldukları gözlenmiştir (Tablo 5.11).

Tablo 5.11. ABTS analiz verileri

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Antioksidan Süpürme (%)	%RSD	Ortalama Trolox (mg/L)	%RSD	Denklem	R^2	IC_{50} (mg/L)
				Serbest radikal 447,063				
	130	76,739±0,289^{f,E,2}	0,377	119,609±1,235^{hı,H,4}	1,032			
Döç-1+Kç	85	58,117±1,158^{i,D,4}	1,992	199,071±4,940^{k,H,7}	2,481	y = 0,4972x + 13,355	0,9907	73,70^{ijkl,E,4}
	40	31,992±0,482^{ı,D,3}	1,508	310,551±2,058^{j,E,5}	0,663			
	130	97,681±0,625^{ab,A,1}	0,640	31,706±1,235^{k,K,5}	3,895			
Döç-1+M	85	79,877±0,482^{bcde,A,1}	0,604	106,220±2,058^{prsş,K,6}	1,938	y = 0,4328x + 41,977	0,9976	18,54^{lm,GH,3}
	40	58,731±0,868^{bcd,A,12}	1,478	200,041±6,747^{pr,İ,7}	3,373			
	130	83,447±0,479^{e,D,2}	0,574	90,987±2,044^{ıi,I,6}	2,247			
Döç-1+G	85	64,188±1,640^{ı,C,3}	2,555	173,166±6,998^{l,I,6}	4,041	y = 0,4611x + 24,005	0,9983	56,38^{jklm,EF,45}
	40	41,951±1,061^{h,C,4}	2,529	268,055±4,528^{k,H,6}	1,689			
	130	87,176±0,760^{d,C,3}	0,871	73,329±1,647^{ij,İ,6}	2,245			
Döç-1+K	85	73,806±0,772^{h,B,3}	1,046	132,125±3,293^{m,İ,6}	2,492	y = 0,289x + 49,482	0,9989	1,79^{m,H,6}
	40	61,255±0,579^{a,A,a}	0,945	186,070±1,871^{sş,H,8}	1,006			
	130	32,606±0,965^{k,İ,5}	2,959	307,931±4,116^{e,B,2}	1,337			
Döç-2+Kç	85	20,668±1,061^{m,H,7}	5,134	358,868±4,528^{g,C,4}	1,262	y = 0,285x - 4,1458	0,9984	189,99^{g,B,2}
	40	7,731±0,965^{l,HI,5}	12,478	414,075±4,116^{ef,B,3}	0,994			
	130	98,499±0,361^{a,A,1}	0,366	27,631±0,412^{k,K,5}	1,490			
Döç-2+M	85	77,012±0,675^{efgh,AB,2}	0,877	118,445±2,881^{noöJ,45}	2,433	y = 0,4616x + 38,257	0,9996	25,44^{lm,G,3}
	40	56,958±1,061^{bcd,A,12}	1,863	204,019±4,528^{oöpr,G,67}	2,219			
	130	52,319±0,289^{ı,H,4}	0,553	223,812±1,235^{g,D,4}	0,552			
Döç-2+G	85	34,857±2,990^{l,G,5}	8,579	298,326±12,761^{ı,E,4}	4,277	y = 0,3661x + 4,3994	0,9988	124,56^{hii,D,4}
	40	19,372±1,736^{jk,FG,6}	8,963	364,399±7,409^{gh,D,4}	2,033			
	130	55,525±0,895^{h,G,4}	1,611	208,094±2,058^{g,F,5}	0,989			
Döç-2+K	85	40,041±1,254^{k,F,5}	3,132	276,205±5,351^{i,F,4}	1,937	y = 0,3249x + 13,001	0,9988	113,88^{hiij,D,4}
	40	26,285±0,615^{i,E,4}	2,340	334,904±2,625^{i,D,5}	0,784			
				Serbest radikal 445,898				
	130	32,330±0,971^{k,İ,5}	3,002	310,551±2,058^{e,B,2}	0,663			
Döç-3+Kç	85	9,394±0,802^{noöI,9}	8,533	403,984±0,823^{de,A,2}	0,204	y = 0,3106x - 11,032	0,8795	196,50^{g,B,2}
	40	4,378±1,161^{mno,I,6}	26,517	427,270±4,940^{cd,B,2}	1,156			
	130	40,971±1,258^{j,I,3}	3,069	271,547±5,351^{f,C,3}	1,971			
Döç-3+M	85	31,965±0,961^{l,G,3}	3,006	312,006±2,470^{h,D,3}	0,792	y = 0,2662x + 7,3509	0,9799	160,21^{gh,C,2}
	40	17,009±0,440^{k,G,5}	2,585	373,519±1,871^{g,C,3}	0,501			
	130	22,503±0,871^{l,J,5}	3,869	350,136±3,705^{d,A,3}	1,058			
Döç-3+G	85	17,237±0,958^{m,H,6}	5,556	374,877±0,823^{f,B,3}	0,220	y = 0,1685x + 1,3753	0,9699	288,57^{f,A,3}
	40	7,342±0,617^{lm,HI,7}	8,402	413,299±1,647^{ef,A,3}	0,398			
	130	23,187±0,677^{l,J,5}	2,920	347,226±2,881^{d,A,3}	0,830			
Döç-3+K	85	18,331±0,274^{m,H,6}	1,493	367,892±1,164^{fg,BC,3}	0,316	y = 0,1619x + 2,9524	0,9643	290,60^{f,A,3}
	40	8,618±0,897^{l,H,6}	10,409	411,261±2,058^{f,A,3}	0,500			

Tablo 5.11. Devamı…

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Antioksidan Süpürme (%)	%RSD	Ortalama Trolox (mg/L)	%RSD	Denklem	R^2	IC_{50} (mg/L)
				Serbest radikal 447,063				
Döç-4+Kç	130	52,797±0,772^{hı,GH,3}	1,462	221,774±3,293^{g,D,3}	1,485	y = 0,3512x + 7,8639	0,9938	119,98^{hıi,D,3}
	85	39,154±0,386^{k,F,5}	0,986	279,988±1,647^{i,F,6}	0,588			
	40	21,191±0,568^{j,F,4}	2,680	357,995±0,823^{hı,D,4}	0,230			
Döç-4+M	130	94,497±0,908^{c,B,2}	0,961	45,968±1,647^{jk,J,4}	3,582	y = 0,5027x + 31,876	0,958	36,05^{lm,FG,3}
	85	80,082±0,772^{bcdefg,A,12}	0,964	105,346±3,293^{prsş,K,6}	3,126			
	40	49,250±0,722^{g,B,3}	1,466	235,164±0,823^{l,FG,5}	0,350			
Döç-4+G	130	71,351±0,386^{g,F,3}	0,541	142,603±1,647^{h,G,5}	1,155	y = 0,4396x + 15,772	0,9815	77,86^{iijkl,E,45}
	85	56,276±0,289^{i,D,4}	0,514	206,930±1,235^{k,H,5}	0,597			
	40	31,787±0,193^{ı,D,5}	0,607	311,424±0,823^{j,E,5}	0,264			
Döç-4+K	130	53,843±0,888^{hı,GH,4}	1,649	215,371±2,470^{g,E,4}	1,147	y = 0,3502x + 10,747	0,9336	112,09^{hıijk,D,4}
	85	45,362±0,868^{j,E,4}	1,914	253,501±3,705^{j,G,5}	1,461			
	40	22,328±0,968^{j,F,5}	4,335	349,554±2,058^{ı,D,4}	0,589			
				Serbest radikal 445,898				
As+Kç	130	97,629±0,418^{ab,AB,1}	0,428	30,444±1,778^{k,C,5}	5,842	y = 0,5406x + 30,078	0,9636	36,85^{lm,F,5}
	85	81,487±0,675^{bc,BC,2}	0,828	97,488±0,412^{sş,I,9}	0,422			
	40	48,974±0,000^{g,H,2}	0,000	237,492±0,000^{l,E,6}	0,000			
As+M	130	96,990±0,493^{abc,AB,1}	0,509	31,997±0,823^{k,C,5}	2,573	y = 0,4413x + 40,921	0,9873	20,57^{lm,HII,3}
	85	81,031±0,480^{bc,BCD,1}	0,593	102,145±1,235^{rsş,HI,6}	1,209			
	40	57,273±0,617^{bcde,CDE,12}	1,077	200,817±1,647^{öpr,HI,7}	0,820			
As+G	130	96,215±0,285^{abc,BC,1}	0,296	36,460±1,212^{k,C,7}	3,324	y = 0,4317x + 40,751	0,9966	21,42^{lm,HII,5}
	85	78,751±1,027^{bcdefg,DEF,12}	1,304	108,548±2,881^{oöprs,FGH,8}	2,655			
	40	57,364±1,097^{bcde,CDE,2}	1,913	199,362±2,881^{pr,HI,8}	1,445			
As+K	130	97,446±0,617^{ab,AB,1}	0,633	31,221±2,625^{k,C,8}	8,408	y = 0,4664x + 37,657	0,9952	26,46^{lm,GHI,5}
	85	78,979±0,753^{bcdefg,CDEF,12}	0,954	111,459±2,058^{noöpr,EFG,7}	1,847			
	40	55,472±0,484^{cdef,DEF,3}	0,872	209,841±2,058^{noö,G,6}	0,981			
Hk+Kç	130	10,397±0,387^{oö,G,6}	3,722	401,656±1,647^{abc,A,1}	0,410	y = 0,0887x - 1,4413	0,982	579,95^{cd,A,1}
	85	5,472±0,897^{p,I,10}	16,394	420,575±2,058^{bc,A,1}	0,489			
	40	2,417±0,836^{oö,K,67}	34,585	433,673±1,647^{bc,A,2}	0,380			
Hk+M	130	13,908±0,418^{mn,F,4}	3,005	386,714±1,778^{bc,A,2}	0,460	y = 0,0922x + 2,0117	0,9986	52,05^{klm,E,3}
	85	10,032±0,344^{no,H,4}	3,432	403,208±1,465^{e,B,2}	0,363			
	40	5,609±0,274^{lmn,J,6}	4,878	422,031±1,164^{de,B,2}	0,276			
Hk+G	130	12,449±0,410^{no,F,6}	3,297	392,924±1,746^{abc,A,2}	0,444	y = 0,0953x - 0,1927	0,9892	526,68^{d,B,2}
	85	7,387±0,774^{oöp,HI,7}	10,476	414,463±3,293^{cd,A,2}	0,795			
	40	3,876±0,480^{no,JK,8}	12,395	428,434±1,647^{bcd,AB,2}	0,384			
Hk+K	130	16,233±0,617^{m,E,6}	3,800	376,818±2,625^{cd,A,2}	0,697	y = 0,1439x - 2,4419	0,9999	364,43^{e,C,2}
	85	9,850±0,193^{no,H,7}	1,964	403,984±0,823^{de,B,2}	0,204			
	40	3,283±0,762^{noö,JK,7}	23,199	433,673±1,647^{bc,A,2}	0,380			

Tablo 5.11. Devamı…

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Antioksidan Süpürme (%)	%RSD	Ortalama Trolox (mg/L)	%RSD	Denklem	R^2	IC_{50} (mg/L)
				Serbest radikal 445,898				
	130	97,469±0,677^{abc,ABC,1}	0,695	31,124±2,881^{k,C,5}	9,258			
Mt+Kç	85	78,523±0,547^{bcdefg,DEF,3}	0,697	110,586±1,647^{noöpr,EFGH,8}	1,489	y = 0,4758x + 36,442	0,9956	28,50^{lm,FGH,5}
	40	54,651±1,258^{ef,FG,1}	2,301	213,333±5,351^{n,G,7}	2,508			
	130	96,899±0,344^{abc,AB,1}	0,355	33,549±1,465^{k,C,5}	4,367			
Mt+M	85	80,643±0,677^{bcde,BCD,1}	0,840	102,727±2,881^{rsş,GHI,6}	2,805	y = 0,4664x + 37,847	0,9833	26,06^{lm,GHI,3}
	40	54,925±1,644^{def,EFG,2}	2,994	212,169±6,998^{no,G,6}	3,298			
	130	97,720±0,570^{a,AB,1}	0,583	31,415±0,823^{k,C,8}	2,621			
Mt+G	85	76,744±0,387^{fgh,F,2}	0,504	119,318±1,647^{no,DE,7}	1,380	y = 0,4991x + 33,335	0,9986	33,39^{lm,FG,45}
	40	52,804±0,958^{f,G,3}	1,813	223,230±2,881^{m,F,7}	1,291			
	130	97,446±0,553^{ab,AB,1}	0,567	29,959±1,235^{k,C,8}	4,122			
Mt+K	85	80,848±0,387^{bcdef,BCD,1}	0,479	101,854±1,647^{rsş,HI,8}	1,617	y = 0,4565x + 39,416	0,9879	23,19^{lm,HIİ,5}
	40	56,361±0,774^{cde,CDEF,3}	1,373	206,057±3,293^{noöp,GH,6}	1,598			
	130	98,586±0,285^{a,A,1}	0,289	26,369±1,212^{k,C,5}	4,596			
Et+Kç	85	87,483±0,484^{a,A,1}	0,553	73,620±2,058^{t,İ,10}	2,796	y = 0,5482x + 31,842	0,9084	33,12^{lm,FG,5}
	40	49,248±0,493^{g,H,2}	1,002	235,164±0,823^{l,E,6}	0,350			
	130	97,538±0,362^{ab,AB,1}	0,371	30,833±1,540^{k,C,5}	4,995			
Et+M	85	79,799±0,753^{bcdefg,BCDE,12}	0,944	107,966±2,058^{öprs,FGH,56}	1,906	y = 0,4233x + 42,943	0,9984	16,67^{lm,İJ,3}
	40	59,439±0,871^{ab,AB,1}	1,465	187,719±3,705^{sş,İJ,8}	1,974			
	130	97,355±0,480^{ab,AB,1}	0,493	30,541±1,235^{k,C,8}	4,043			
Et+G	85	78,386±0,684^{cdefg,DEF,2}	0,873	112,332±2,911^{noöpr,DEF,78}	2,591	y = 0,4393x + 40,515	0,9995	21,59^{lm,HIİ,5}
	40	57,820±0,480^{bcd,BCD,2}	0,831	199,847±2,044^{pr,HI,8}	1,023			
	130	97,902±0,344^{a,AB,1}	0,352	29,280±1,465^{k,C,h8}	5,003			
Et+K	85	80,803±0,344^{bcd,BCD,1}	0,426	102,048±1,465^{rsş,HI,8}	1,436	y = 0,457x + 39,647	0,9906	22,65^{lm,HIİ,5}
	40	56,772±0,774^{bcde,CDE,23}	1,363	199,944±2,881^{pr,HI,7}	1,441			
	130	48,090±1,254^{i,D,4}	2,608	241,858±5,351^{f,B,2}	2,213			
Ss+Kç	85	34,470±0,834^{l,G,6}	2,418	298,035±1,647^{ı,C,5}	0,552	y = 0,3017x + 8,8596	1	136,36^{ghı,D,3}
	40	20,941±0,289^{j,İ,4}	1,382	357,704±1,235^{hı,C,4}	0,345			
	130	96,862±2,122^{abc,AB,1}	2,191	33,743±9,056^{k,C,5}	26,838			
Ss+M	85	76,398±3,859^{gh,F,2}	5,051	121,064±16,465^{mn,D,4}	13,601	y = 0,6344x + 17,087	0,974	51,88^{klm,E,3}
	40	39,768±2,026^{h,I,4}	5,094	265,144±8,644^{k,D,4}	3,260			
	130	96,908±0,079^{abc,AB,1}	0,081	33,549±0,336^{k,C,78}	1,002			
Ss+G	85	82,128±0,136^{b,B,1}	0,166	96,614±0,582^{ş,I,9}	0,603	y = 0,3954x + 46,512	0,9905	8,82^{m,J,5}
	40	61,323±0,868^{a,A,1}	1,416	185,391±3,705^{ş,J,9}	1,998			
	130	94,907±0,208^{bc,C,2}	0,220	42,087±0,889^{k,C,7}	2,113			
Ss+K	85	77,308±0,834^{defgh,EF,2}	1,078	115,243±1,647^{noöp,DEF,7}	1,429	y = 0,4095x + 41,944	0,9993	19,67^{lm,İİ,5}
	40	58,049±0,868^{abc,BC,2}	1,496	194,996±2,470^{rs,İİ,7}	1,267			

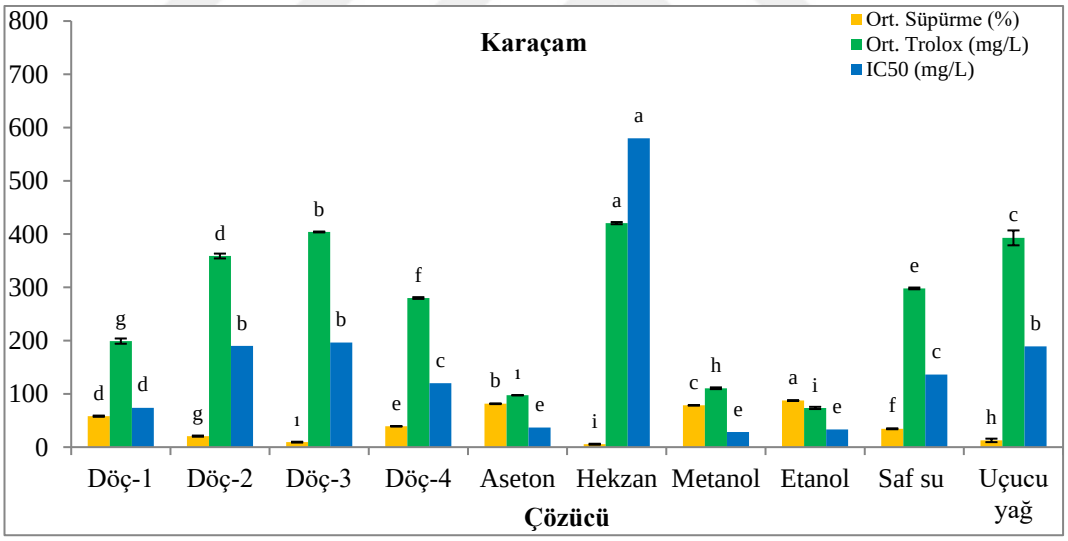
Tablo 5.11. Devamı…

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Antioksidan Süpürme (%)	%RSD	Ortalama Trolox (mg/L)	%RSD	Denklem	R^2	IC_{50} (mg/L)
				Serbest radikal 447,063				
	130	31,514±0,772^{k,5}	2,449	312,588±3,293^{e,2}	1,053			
U.Y.+Kç	85	12,688±3,280^{n,8}	25,851	392,924±13,996^{e,3}	3,562	y = 0,3335x - 13,111	0,9789	189,24^{g,2}
	40	1,501±0,579^{oö,7}	38,569	444,152±2,470^{a,1}	0,556			
	130	7,367±0,273^{p,5}	3,704	415,627±1,164^{ab,1}	0,280			
U.Y.+M	85	5,912±0,343^{öp,5}	5,808	421,837±1,465^{bc,1}	0,347	y = 0,0591x + 0,0829	0,9359	844,62^{a,1}
	40	2,046±0,386^{oö,7}	18,856	438,331±1,647^{ab,1}	0,376			
	130	6,730±0,751^{p,7}	11,164	419,993±2,058^{a,1}	0,490			
U.Y.+G	85	1,569±0,675^{r,8}	43,041	440,368±2,881^{a,1}	0,654	y = 0,0687x - 2,8921	0,8701	769,90^{b,1}
	40	0,546±0,193^{ö,9}	35,355	444,734±0,823^{a,1}	0,185			
	130	8,004±0,834^{öp,7}	10,415	410,970±1,^{647ab,1}	0,401			
U.Y.+K	85	4,593±0,700^{pr,8}	15,242	425,815±1,235^{b,1}	0,290	y = 0,0829x - 2,6627	0,9976	635,26^{c,1}
	40	0,546±0,193^{ö,8}	35,355	444,734±0,823^{a,1}	0,185			

RSD: Bağıl standart sapma
Tukey testine göre, aynı sütundaki farklı harfler ilgili değerlerin antioksidan aktivite (ABTS) değerlerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Değerlerin karşılaştırılması üç farklı kategoride gerçekleştirilmiştir.
1. Büyükten küçüğe a ile z aralığında sıralama
Tüm numunelere bağlı olarak, 130, 85, 40 mg/100 ml derişimdeki % süpürme ve trolox ile IC_{50} taraması
2. Büyükten küçüğe A ile Z aralığında sıralama
Geleneksel ve derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelere bağlı olarak, 130, 85, 40 mg/100 ml derişimdeki % süpürme ve trolox ile IC_{50} taraması
3. Büyükten küçüğe 1 ile 10 aralığında sıralama
Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın ağacından elde edilen numunelere bağlı olarak, 130, 85, 40 mg/100 ml derişimdeki % süpürme ve trolox ile IC_{50} taraması

Karaçam ağacından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivesini belirlemek için ABTS analizi ile elde edilen ortalama süpürme yüzdesi, ortalama trolox değerleri ve IC_{50} değerleri Grafik 5.14'de verilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan organik çözücüler içerisinde polaritesi yüksek olan aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama süpürme yüzdesi sırasıyla %81,487; %78,523; %87,483; %34,470 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde organik çözücüler içerisinde polaritesi yüksek olan aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama trolox değerleri sırasıyla 97,488 mg/L; 110,586 mg/L; 73,620 mg/L; 298,035 mg/L ve IC_{50} ise sırasıyla 36,85 mg/L; 28,50 mg/L; 33,12 mg/L; 136,36 mg/L olarak elde edilen değerler, diğer çözücülerden elde edilen ekstraktların değerlerine göre daha düşük olduğu için yüksek antioksidan aktivite gösterdiği düşünülmektedir. Toplam fenolik bileşen içeriğin yoğun olarak elde edildiği polaritesi yüksek organik çözücülerden elde edilen ekstraktların yüksek antioksidan aktivitede olması da sonuçların örtüştüğünü göstermektedir. Karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın içerisinde %78,523 ve %87,483 değerlerinde süpürme

yüzdesi; 110,586 mg/L ve 73,620 mg/L değerlerinde ortalama trolox ve 28,50 mg/L; 33,12 mg/L ile IC_{50} değerlerini veren sırasıyla metanol ve etanol ve çözücülerinden elde edilen ekstraktlar, diğer ekstraktlara göre en yüksek antioksidan aktiviteyi gösteren ekstraktlar olmuştur. Tüm çözücüler arasından en düşük antioksidan aktiviteyi, apolar yapıdaki hekzan çözücüsü göstermiştir. Hekzan çözücüsünden elde edilen ekstrakt %5,472 oranında düşük bir ortalama süpürme yüzdesi vermiştir. Ortalama trolox ve IC_{50} değerleri sırasıyla 420,575 mg/L; 579,95 mg/L olarak belirlenmiş ve diğer karaçam ekstraktlarına göre daha düşük antioksidan aktivitede olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar DPPH analizi ile karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların antioksidana aktivite sonuçları ile birbirini desteklediği düşünülmektedir. Milic vd. (2021), yaptıkları çalışmada karaçam ağacından aseton, metanol ve etanolden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesini belirlemek için ABTS analizi gerçekleştirmiş ve her bir ekstrakt için sırasıyla 4,32 mg/g; 17,16 mg/g; 14,58 mg/g trolox değerlerini elde etmişlerdir.

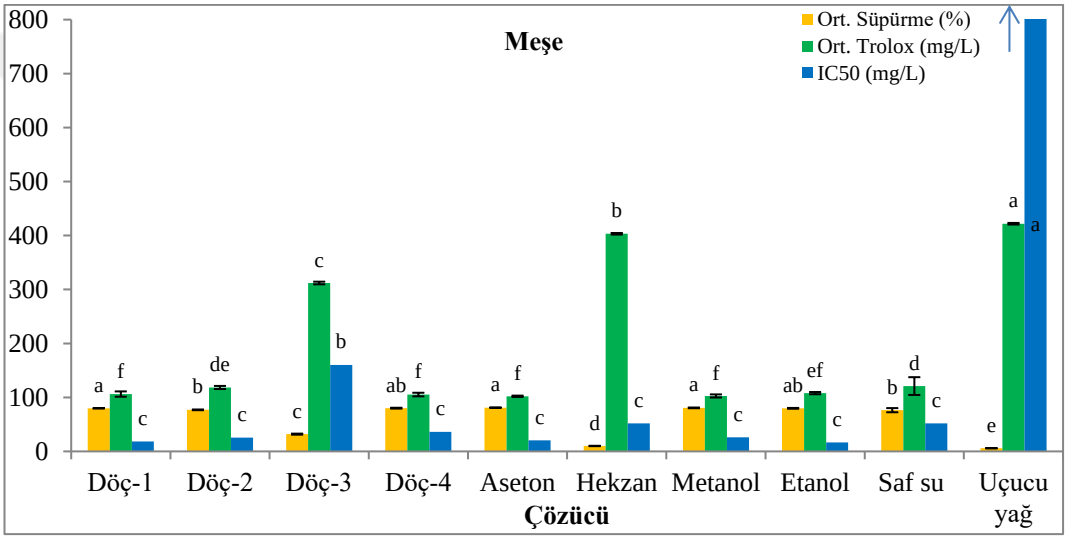


Grafik 5.14. Karaçam ekstraktları ve uçucu yağı için ABTS analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortamda kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması

Grafik 5.15'de meşe ağacından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın ABTS analizi ile elde edilen süpürme yüzdesi, trolox ve IC_{50} değerlerine göre antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Meşe ağacından elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın içerisinde tüm derişimlerinde %79,799 ile yüksek ortalama süpürme yüzdesi değerini veren etanol çözücüsünden elde edilen ekstrakt

olmuştur. Ayrıca etanol çözücüsünden elde edilen ekstrakt 107,966 mg/L ortalama trolox ve 16,67 mg/L IC_{50} değerlerini vererek diğer meşe ekstraktlarına göre en yüksek antioksidan aktivitede olduğunu göstermiştir. Polaritesi yüksek olan organik çözücüler; aseton, metanol etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama süpürme yüzdesi değerleri sırasıyla %81,031; %80,643; %79,799; %76,398 olarak yüksek sonuçlar vermiştir. Aynı organik çözücüler aseton, metanol ve etanolden elde edilen ekstraktların, ortalama trolox değerleri sırasıyla 102,145 mg/L; 102,727 mg/L; 107,966 mg/L; 121,064 mg/L ve IC_{50} için sırasıyla 20,57 mg/L; 26,06 mg/L; 16,67 mg/L; 51,88 mg/L olarak elde edilen değerler, diğer çözücülerden elde edilen ekstraktların değerlerine göre daha düşük olduğu için yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar ise yüksek antioksidan aktivite gösteren aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktlara yakın antioksidan aktivite göstermiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri IC_{50} değerlerine göre değerlendirildiğinde büyükten küçüğe döç-1, döç-2, döç-4 ve döç-3 çözücülerinden elde edilen ekstraktlar sırasıyla 18,54 mg/L; 25,44 mg/L; 36,05 mg/L; 160,21 mg/L değerlerini vermişlerdir. Bu sonuçlar DPPH analizi ile meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Grafik 5.15'de incelendiğinde tüm numuneler arasından en düşük antioksidan aktiviteyi gösteren meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen uçucu yağ olmuştur. Uçucu yağın ortalama süpürme yüzdesi %5,912 sonucu ile ekstraktlara göre düşük bir oran vermiştir. Uçucu yağın ortalama trolox ve IC_{50} değerleri sırasıyla 421,837 mg/L; 844,62 mg/L olarak belirlenmiş ve düşük antioksidan aktivitede oldukları tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan organik çözücüler arasında en yüksek antioksidan aktivitede olan etanol çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktının ortalama trolox değeri 108,839 mg/L olarak hesaplanmıştır. Başyiğit vd. (2020), meşe ağacının etanol çözücüsü ile muamelesinden elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri CUPRAC analizinde 1,98 mmol/g TEAC/g sonucunu elde etmişlerdir. Döç-3 ve hekzan çözücülerinden elde edilen meşe ağacı ekstraktları ve meşe ağacından elde edilen uçucu yağ ise tüm derişimlerinde yüksek trolox değerleri vererek düşük antioksidan aktivitede olduğunu göstermiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen meşe ağacının su ekstraktının, 139,983 mg/L olarak

hesaplanan ortalama trolox değerine göre antioksidan aktivite bakımından etkin olduğu düşünülmektedir. Sanchez-Gutierrez vd. (2022), tarafından *Quercus ilex*'in öğütülmüş ve toz haline getirilmiş yapraklarından su çözücüsü ile MEY ile kullanılarak elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için gerçekleştirilen ABTS analizi ile toz halindeki yapraktan elde edilen ekstraktda 500-3000 mM TE/g DW ve öğütülmüş yapraktan elde edilen ekstraktda 100-500 mM TE/g DW; ORAC analizi ile toz halindeki yapraktan elde edilen ekstraktda 500-3500 mM TE/g DW ve öğütülmüş yapraktan elde edilen ekstraktda 100-600 mM TE/g DW değerlerini elde etmişlerdir.



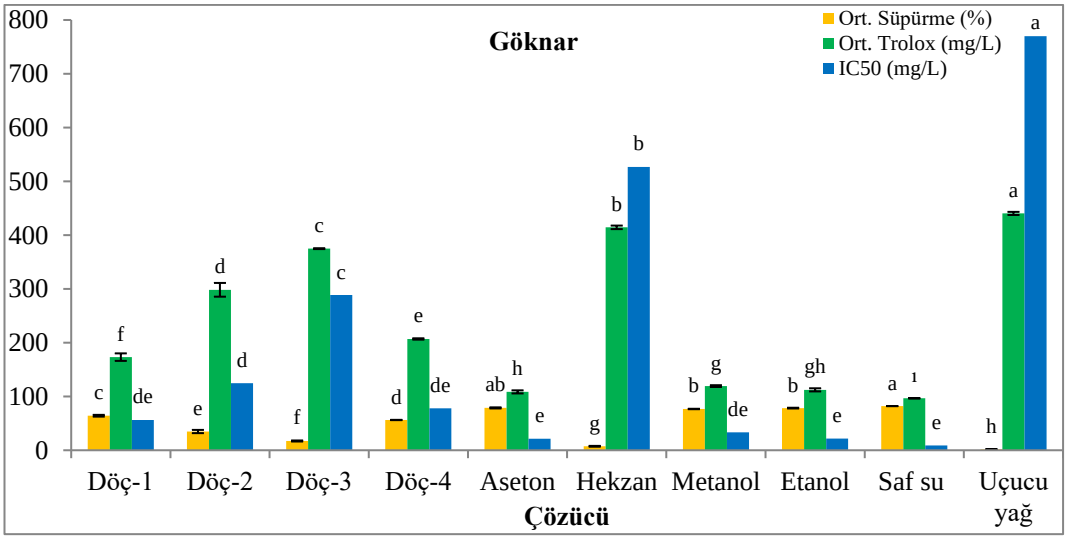
Grafik 5.15. Meşe ekstraktları ve uçucu yağı için ABTS analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortamda kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması

Grafik 5.15 genel olarak incelendiğinde tüm çözücülerden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağ 16,67-844,62 mg/L aralığında IC_{50} değerleri vermiştir. Çalışmadaki ekstraktların ve uçucu yağın içerisinde en yüksek antioksidan aktiviteyi 16,67 mg/L ile en düşük IC_{50} değerini veren etanol çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktı, en düşük antioksidan aktiviteyi ise 844,62 mg/L ile en yüksek IC_{50} değerini veren meşe ağacından elde edilen uçucu yağ göstermiştir. Tüm ekstraktların ve uçucu yağın içerisinde en yüksek antioksidan aktiviteyi 16,67 mg/L ile en düşük IC_{50} değerini veren etanol çözücüsünün kullanıldığı meşe ağacının yapraklı sürgünlerinden elde edilen ekstrakt vermiştir. 210,629 mg/L ile yüksek toplam fenolik madde içeriği

belirlenen Etanol+M'nin antioksidan aktivite bakımından etkinliği de desteklenmektedir. Ştefanescu vd. (2022) yaptıkları çalışmada meşe ağacından, etanol çözücüsü kullanarak MEY ile elde ettikleri ekstraktın 8,68 µg/mL olan IC_{50} değeri ile yüksek antioksidan aktivitede olduğunu tespit etmişlerdir. Yine aynı şekilde Tanase vd. (2022), meşe ağacı kabukları ile MEY ve UEY yöntemlerinde su ve sulu etanol çözücülerini kullanarak elde ettikleri ekstraktların antioksidan aktivitesini incelemişlerdir. Antioksidan aktiviteyi belirlemek için gerçekleştirilen ABTS analizinde, MEY ile sudan elde ettikleri ekstraktın IC_{50} değerini; 8,28 µg/mL, MEY ile sulu etanolden elde ettikleri ekstraktın IC_{50} değerini; 7,89 µg/mL, UEY yöntemi ile sudan elde ettikleri ekstraktın IC_{50} değerini; 7,41 µg/mL, UEY yöntemi ile sulu etanolden elde ettikleri ekstraktın IC_{50} değerini; 6,07 µg/mL olarak hesaplamışlardır. Nisca vd. (2022) meşe kabuklarından su ve %70 etanol:su çözücüsü ile MEY kullanarak elde ettikleri ekstraktların antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH analizi ile su ekstraktının IC_{50} değerini 2,45 µg/mL ve %70 etanol: ekstraktının IC_{50} değerini 6,92 µg/mL olarak belirlemişlerdir. Nisca vd. (2023), *Quercus petreaea* ve *Quercus pubescens* kabuk ve yapraklarından su ve %70 etanol:su çözücüleri ile MEY, UEY yöntemlerini kullanarak elde ettikleri ekstraktların, antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için gerçekleştirilen DPPH analizi ile *Q. petreaea* için IC_{50} değerini 4-6 µg/mL ve *Q. pubescens* için IC_{50} değerini 8-10 µg/mL olarak hesaplamışlardır.

Göknar ağacından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivesini belirlemek için ABTS analizi ile elde edilen ortalama süpürme yüzdesi, ortalama trolox değerleri ve IC_{50} değerleri Grafik 5.16'da verilmiştir. Organik çözücüler içerisinde polaritesi yüksek olan aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama süpürme yüzdesi sırasıyla %78,751; %76,744; %78,386; %82,128 olarak hesaplanmıştır. Organik çözücüler içerisinde aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama trolox sonuçları sırasıyla 108,548 mg/L; 119,318 mg/L; 112,332 mg/L; 96,614 mg/L ve IC_{50} sonuçları ise sırasıyla 21,42 mg/L; 33,39 mg/L; 21,59 mg/L; 8,82 mg/L olarak belirlenmiş ve diğer çözücülerden elde edilen ekstraktların değerlerine göre daha düşük olduğu için yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada en yüksek antioksidan aktivitelerin belirlendiği aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktların içerisinden, ortalama süpürme yüzdesi

%82,128 olan saf su ekstraktı en yüksek sonucu vermiştir. Aynı şekilde saf sudan elde edilen ekstraktın ortalama trolox yani ortamda kalan serbest radikal değeri 96,614 mg/L ve IC_{50} değeri ise 8,82 mg/L olarak hesaplanmıştır. Ortalama trolox ve IC_{50} sonuçları ile antioksidan aktivite ters orantılı olduğu için düşük ortalama trolox ve IC_{50} değerleri veren saf su ekstraktının antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağ içerisinde en düşük antioksidan aktivite ise göknar ağacından elde edilen uçucu yağda tespit edilmiştir. Uçucu yağın ortalama süpürme yüzdesi %1,569 ile düşük bir oran vermiştir. Ortalama trolox ve IC_{50} değerleri ise sırasıyla 440,368 mg/L; 769,90 mg/L olarak yüksek sonuçlar vermiş ve ters orantılı olduğu için düşük antioksidan aktivitede olduğu tespit edilmiştir. Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivitesi ile meşe ağacından elde edilen uçucu yağ ve ekstraktların antioksidan aktivitesi benzerlik göstermiştir. Grafik 5.16 genel olarak incelendiğinde tüm çözücülerden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm çözücülerden elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağ 8,82-769,9 mg/L aralığında IC_{50} değerleri vermiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar, aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen yüksek antioksidan aktivitedeki ekstraktlar ile düşük antioksidan aktivede olan uçucu yağ ve hekzan ekstraktı arasında bir seviyede antioksidan aktivite göstermiştir. Derin ötektik çözücülerden büyükten küçüğe 56,38 mg/L; 77,86 mg/L; 124,56 mg/L; 288,57 mg/L IC_{50} değerlerine veren ekstraktların antioksidan aktiviteleri büyükten küçüğe döç-1, döç-4, döç-2 ve döç-3 olarak sıralanmaktadır. Derin ötektik çözücülerden elde edilen göknar ekstraktları arasındaki bu ilişki DPPH analizi ile göknar ağacının yapraklı sürgünlerinden derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasındaki ilişki ile benzerlik göstermektedir.

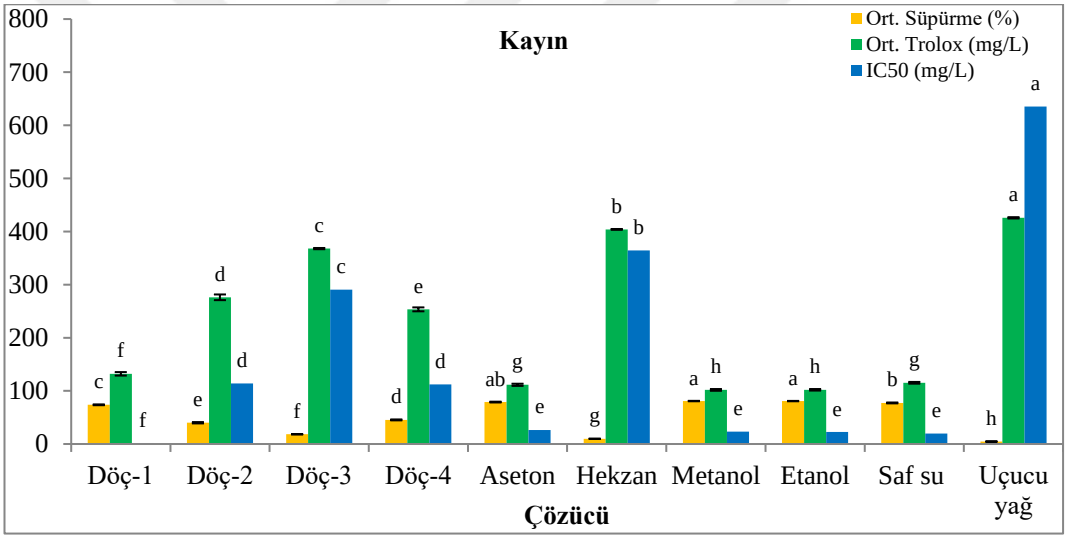


Grafik 5.16. Göknar ekstraktları ve uçucu yağı için ABTS analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortamda kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme trolox, IC_{50} taraması

Gupta vd. (2011), göknar ağacının yapraklarından elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri ABTS analizi ile aseton çözücüsünden elde edilen ekstraktın 0,099 mg/mL IC_{50} değerini vermiş olması, bu tez çalışmasındaki tüm çözücüler arasında aseton çözücüsünden elde edilen göknar ekstraktının en düşük IC_{50} değerlerini vermesiyle desteklenmektedir. Benouchenne vd. (2021), göknar ağacının yapraklarından elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için DPPH analizi ile IC_{50} değerini 3,48 µg/mL olarak hesaplamışlardır.

Grafik 5.17'de kayın ağacından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktlarının ve uçucu yağının antioksidan aktivesini belirlemek için ABTS analizi kullanılarak hesaplanan ortalama süpürme yüzdesi, ortalama trolox değerleri ve IC_{50} değerleri verilmiştir. Organik çözücülerin içerisinde aseton, metanol, etanol ve saf sudan elde edilen ekstraktların, ortalama süpürme yüzdesi sırasıyla %78,979; %80,848; %80,803; %77,308 olarak hesaplanmıştır. Söz konusu çözücülerin, ortalama trolox sonuçları sırasıyla 111,459 mg/L; 101,854 mg/L; 102,048 mg/L; 115,243 mg/L ve IC_{50}'de ise sırasıyla 26,46 mg/L; 23,19 mg/L; 22,65 mg/L; 19,67 mg/L olarak elde edilen sonuçlar, diğer çözücülerden elde edilen ekstraktların sonuçlarına göre daha düşük olduğu için yüksek antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm çözücüler kullanılarak elde edilen ekstrakt örneklerinin karşılaştırılmasında, en yüksek antioksidan aktivitelerin belirlendiği aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden

elde edilen ekstraktların içerisinde 19,67 mg/L ile düşük IC_{50} değerini veren saf su ekstraktı yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Göknar ağacının en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği saf su çözücüsünden elde edilen ekstrakt gibi kayın ağacının saf su çözücüsünden elde edilen ekstrakt numunesi de yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Göknar ve kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların yüksek fenolik madde içeriği gösterdikleri ve fenoliklerin de serbest radikalleri süpürücü özelliğinden kaynaklı antioksidan aktivite bakımından etkin oldukları düşünülmektedir. Ortalama süpürme yüzdesi %4,593; ortalama trolox ve IC_{50} sonuçları sırasıyla 425,815 mg/L; 635,26 mg/L olan uçucu yağ, kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen tüm numuneler içerisinde en düşük antioksidan aktiviteyi göstermiştir.



Grafik 5.17. Kayın ekstraktları ve uçucu yağı için ABTS analizi ortalama süpürme (%), trolox cinsinden ortamda kalan serbest radikal (mg/L), IC_{50} (mg/L) sonuçları ve istatiksel % süpürme, trolox, IC_{50} taraması

Grafik 5.17'de tüm çözücülerden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın antioksidan aktivite gösterdiği görülmektedir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar, aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen yüksek antioksidan aktivitedeki ekstraktlar ile düşük antioksidan aktivitede olan uçucu yağ ve hekzan ekstraktı arasında bir seviyede aktivite göstermiştir. Kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasındaki antioksidan aktivite ilişkisi göknar ağacının yapraklı sürgünlerinden derin ötektik çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasındaki antioksidan aktivite ilişkisi ile

benzerlik göstermektedir. Hofmann vd. (2015), yaptıkları çalışmada metanol, etanol ve saf su çözücüleri kullanarak elde ettikleri kayın ekstraktlarının trolox değerlerini sırasıyla 146,24 mg/g; 143,40 mg/g; 138,39 mg/g olarak belirlemişlerdir. Tanase vd. (2019) kayın ağacının kabuklarından elde ettikleri ekstraktların antioksidan aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri ABTS analizinde 20,39-37,23 mg/g aralığında trolox değerleri elde etmişlerdir.

5.10.3 CUPRAC Analiz Sonuçları

36 ekstrakt ve dört uçucu yağın antioksidan aktivite tayini için gerçekleştirilen CUPRAC analiz sonuçları Tablo 5.12'de verilmektedir. CUPRAC analiz sonuçlarında elde edilen ortalama trolox değeri antioksidan aktivite ile doğru orantılı olduğundan, yüksek değer veren ortalama trolox değeri yüksek antioksidan aktivitede olduğunu ifade etmektedir. Elde edilen tüm ekstrakt ve uçucu yağlar 14,929-116,077 mg/L aralığında ortalama trolox değeri vermiştir. Farklı çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktların çözücüleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde, yaklaşık dört kat yüksek ortalama trolox değeri veren yani en yüksek antioksidan aktiviteyi gösterenler toplam fenolik madde içeriği 77,238-242,436 mg/L ve toplam flavonoid madde içeriği 68,072-196,303 mg/L aralığında değerler veren polar yapıdaki metanol ve etanol çözücüleri olmuştur. Bu tez çalışmasında toplam fenolik madde tayininde yüksek sonuçlar elde edilen polaritesi yüksek çözücüler, CUPRAC analizinde de yüksek ortalama trolox değerleri ile antioksidan aktivite etkinliklerini göstermiştir. Organik çözücüler içerisinde polaritesi düşük olan hekzan ise yaklaşık üç kat düşük ortalama trolox değeri ile düşük antioksidan aktivite göstermiştir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar, 14,929-70,575 mg/L aralığında organik çözücülerden elde edilen ekstraktlar ise 18,975-116,077 mg/L aralığında ortalama trolox değerleri vermiştir. Bu değerler karşılaştırıldığında döç-1, döç-2, döç-3 ve döç-4 çözücülerinden elde edilen ekstraktarın organik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre yaklaşık iki kat daha düşük ortalama trolox değeri verdiği görülmektedir. Ancak yine de organik çözücülerden elde edilen ekstraktlara yakın antikoksidan aktivitede oldukları da düşünülmektedir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 85 mg/100ml derişimde döç-1 25,039-46,106 mg/L; döç-2 18,508-39,050 mg/L; döç-3 15,574-22,613 mg/L; döç-4 ise 21,222-30,569 mg/L

aralığında ortalama trolox değerleri vermiştir. Bu sonuçlara göre derin ötektik çözücüler için antioksidan aktivite büyükten küçüğe döç-1, döç-2, döç-4 ve döç-3 olarak sıralanabilmektedir. Derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içerik sonuçlarının, çözücüler arasındaki ilişkisi CUPRAC analizindeki derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin çözücüler arasındaki ilişkisi ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Analizi gerçekleştirilen 40 numune içerisinde en düşük antioksidan aktivite gösteren ekstrakta göre yaklaşık yedi kat yüksek antioksidan aktiviteyi, 40 mg/100ml; 85 mg/100ml; 130 mg/100ml derişimlerdeki ortalama trolox değerleri sırasıyla 54,316 mg/L; 91,821 mg/L; 116,077 mg/L olan Etanol+K, en düşük antioksidan aktiviteyi ise 40 mg/100ml; 85 mg/100ml; 130 mg/100ml derişimlerdeki ortalama trolox değerleri sırasıyla 14,929 mg/L; 15,574 mg/L; 17,643 mg/L olan döç-3+K vermiştir. Mevcut tez çalışmasında kullanılan ağaç örnekleri ve ekstraksiyon işlemindeki farklı parametreler sonuçlarda değişikliklere sebep olsada Tablo 5.12'deki CUPRAC analizinde ortalama trolox sonuçları incelendiğinde, her bir çözücünün karaçam, meşe, göknar ve kayın ağacı örneklerinden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağlarının antioksidan aktivite bakımından etkin olduğunu göstermektedir.

Tukey testine göre, CUPRAC analizinde üç tekrarlı çalışma sonuçlarından elde edilen verilerle gerçekleştirilen Tüm-İst testinde, tüm numunelerin trolox 85 mg/100 ml derişimdeki sonuçlarına göre döç-1+G, döç-4+G ve Hekzan+Kç numuneleri aynı grupta; Des-2+G, Des-4+Kç ve Des-4+M numuneleri aynı grupta; döç-2+Kç, döç-3+Kç ve döç-3+G numuneleri aynı grupta yer aldıklarından istatiksel anlamda ($P<0,05$) birbirlerine benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Diğer numuneler ise genel olarak farklı gruplarda yer aldıklarından istatiksel olarak ($P>0,05$) anlamlı bir farklılık göstermiştir (Tablo 5.12).

Çöz-İst testinde, derin ötektik çözücülerden elde edilen 85 mg/100 ml derişimdeki trolox sonuçlarına göre döç-1+Kç, döç-1+G ve döç-4+G numuneleri ile döç-2+G, döç-4+Kç ve döç-4+K numuneleri özellikleri itibariyle aynı grupta yer aldıklarından istatiksel anlamda ($P<0,05$) birbirlerine benzerlik göstermektedirler. Geleneksel çözücülerden elde edilen numunelerin ise genel olarak farklı grupta yer almaları sebebiyle istatiksel olarak ($P>0,05$) farklılık gösterdikleri gözlenmiştir (Tablo 5.12).

Tür-İst testinde, karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen numunelere göre gruplar değerlendirildiğinde numunelerin tekrarlı olarak aynı gruplarda bulunmadığı gözlenmiştir. Genel olarak tüm bitki türlerinin farklı çözücülerden elde edilen numuneleri birbirinden bağımsız gruplarda yer aldıkları için istatiksel olarak (P>0,05) anlamlı bir farklılık göstermiştir (Tablo 5.12).

Tablo 5.12. CUPRAC analizi trolox sonuçları (mg/L)

Numune	**Ekstrakt derişimi (mg/100ml)**	**Ortalama Trolox**	**%RSD**
	40	18,237±0,102^{rsş,EFG,6}	0,558
Döç-1+Kç	85	25,039±0,311^{r,E,5}	1,242
	130	30,755±0,269^{sş,F,6}	0,876
	40	33,605±0,288^{h,A,4}	0,857
Döç-1+M	85	46,106±0,445^{ii,A,5}	0,964
	130	70,575±1,259^{g,A,4}	1,785
	40	24,292±0,587^{m,C,4}	2,416
Döç-1+G	85	26,557±0,180^{pr,E,6}	0,677
	130	30,399±0,144^{ş,F,7}	0,473
	40	28,898±0,108^{i,B,5}	0,374
Döç-1+K	85	42,493±1,280^{j,B,4}	3,011
	130	55,605±1,292^{j,B,4}	2,323
	40	15,760±0,502^{tu,HI,8}	3,186
Döç-2+Kç	85	18,508±0,522^{t,H,7}	2,822
	130	19,390±0,933^{y,İ,8}	4,813
	40	29,483±1,456^{i,B,5}	4,940
Döç-2+M	85	39,050±0,305^{l,C,6}	0,782
	130	49,838±0,432^{l,C,6}	0,866
	40	19,814±0,808^{oöp,DE,5}	4,077
Döç-2+G	85	21,443±0,712^{ş,G,8}	3,323
	130	23,783±0,254^{v,I,9}	1,070
	40	20,645±0,106^{no,D,7}	0,513
Döç-2+K	85	23,173±1,016^{s,F,7}	4,387
	130	25,836±0,590^{uü,GH,7}	2,283
	40	17,032±0,106^{şt,GH,7}	0,622
Döç-3+Kç	85	17,643±0,155^{t,H,7}	0,881
	130	18,593±0,204^{yz,İJ,8}	1,095
	40	19,543±0,128^{oöpr,DE,6}	0,655
Döç-3+M	85	22,613±0,135^{sş,FG,9}	0,595
	130	23,512±0,078^{v,I,10}	0,331
	40	15,692±0,600^{u,HI,7}	3,823
Döç-3+G	85	17,422±0,144^{t,H,9}	0,826
	130	18,508±0,128^{yz,İJ,10}	0,692

Tablo 5.12. Devamı…

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Trolox	%RSD
	40	14,929±0,135^{u,I,10}	0,902
Döç-3+K	85	15,574±0,206^{u,I,9}	1,321
	130	17,643±0,289^{z,J,8}	1,640
	40	18,881±0,654^{prs,EF,6}	3,465
Döç-4+Kç	85	21,392±0,650^{ş,G,6}	3,037
	130	26,302±0,180^{u,G,7}	0,684
	40	28,397±1,033^{ij,B,5}	3,639
Döç-4+M	85	30,569±0,206^{oö,D,8}	0,673
	130	36,887±0,036^{ö,D,8}	0,098
	40	17,601±0,108^{sş,FG,6}	0,613
Döç-4+G	85	26,447±0,395^{pr,E,6}	1,495
	130	33,079±0,331^{r,E,6}	1,001
	40	17,143±0,180^{ş,FGH,9}	1,050
Döç-4+K	85	21,222±0,155^{ş,G,8}	0,733
	130	24,623±0,252^{üv,HI,7}	1,023
	40	24,513±0,059^{m,L,3}	0,240
As+Kç	85	45,309±0,712^{i,J,2}	1,572
	130	56,835±0,180^{j,J,2}	0,317
	40	47,574±0,108^{c,C,1}	0,227
As+M	85	72,059±0,905^{e,F,3}	1,256
	130	104,212±0,108^{d,E,3}	0,104
	40	26,124±0,153^{l,K,3}	0,584
As+G	85	49,787±0,051^{h,I,3}	0,102
	130	61,771±0,180^{i,İ,3}	0,291
	40	37,549±0,180^{f,F,4}	0,479
As+K	85	68,955±0,164^{f,G,2}	0,237
	130	87,767±0,357^{f,G,3}	0,407
	40	21,392±0,384^{n,M,4}	1,796
Hk+Kç	85	26,107±0,212^{pr,Ö,45}	0,812
	130	34,521±0,233^{p,Ö,5}	0,676
	40	28,160±0,144^{ijk,İ,5}	0,511
Hk+M	85	33,011±0,128^{n,N,7}	0,388
	130	38,566±0,252^{o,N,7}	0,653
	40	29,364±0,613^{i,I,2}	2,089
Hk+G	85	34,707±0,558^{m,M,5}	1,608
	130	41,925±0,324^{n,M,5}	0,772
	40	26,989±0,288^{kl,J,6}	1,067
Hk+K	85	30,959±0,144^{o,O,5}	0,465
	130	37,421±0,254^{oö,O,5}	0,680
	40	32,044±0,106^{ı,H,1}	0,331
Mt+Kç	85	47,328±0,594^{ı,İ,1}	1,255
	130	64,969±0,596^{ı,I,1}	0,918
	40	47,412±0,433^{c,C,1}	0,913
Mt+M	85	84,696±0,072^{b,B,1}	0,085
	130	111,311±0,072^{b,B,1}	0,065
	40	52,128±0,072^{b,B,1}	0,138
Mt+G	85	78,810±0,078^{c,C,1}	0,099
	130	108,639±0,108^{c,C,2}	0,099

Tablo 5.12. Devamı…

Numune	Ekstrakt derişimi (mg/100ml)	Ortalama Trolox	%RSD
	40	39,050±0,384^{e,E,3}	0,984
Mt+K	85	65,461±0,576^{g,H,3}	0,880
	130	87,877±0,108^{f,G,3}	0,123
	40	27,269±0,180^{jkl,J,2}	0,660
Et+Kç	85	40,950±0,942^{jk,K,3}	2,299
	130	53,621±0,818^{k,K,3}	1,525
	40	42,154±0,144^{d,D,2}	0,341
Et+M	85	73,628±0,108^{e,E,2}	0,147
	130	105,577±0,858^{d,D,2}	0,813
	40	28,821±0,216^{i,İ,2}	0,749
Et+G	85	39,135±0,622^{l,L,4}	1,589
	130	56,326±0,108^{j,J,4}	0,192
	40	54,316±0,072^{a,A,1}	0,132
Et+K	85	91,821±0,072^{a,A,1}	0,078
	130	116,077±0,128^{a,A,1}	0,110
	40	21,494±0,216^{n,M,4}	1,004
Ss+Kç	85	40,220±0,288^{kl,KL,3}	0,716
	130	46,700±0,596^{m,L,4}	1,277
	40	35,386±0,072^{g,G,3}	0,203
Ss+M	85	49,363±0,549^{h,I,4}	1,112
	130	67,547±0,216^{h,H,5}	0,320
	40	52,790±0,216^{b,B,1}	0,409
Ss+G	85	76,911±0,288^{d,D,2}	0,374
	130	111,896±0,396^{b,B,1}	0,354
	40	42,052±0,144^{d,D,2}	0,342
Ss+K	85	64,748±0,432^{g,H,3}	0,667
	130	95,637±0,144^{e,F,2}	0,150
	40	20,374±0,144^{noö,5}	0,706
U.Y.+Kç	85	26,905±0,925^{p,4}	3,438
	130	32,078±0,144^{rs,6}	0,449
	40	19,153±0,135^{öpr,6}	0,703
U.Y.+M	85	22,545±0,229^{sş,9}	1,018
	130	27,727±0,108^{t,9}	0,389
	40	18,975±0,108^{pr,5}	0,569
U.Y.+G	85	23,105±0,078^{s,7}	0,336
	130	24,615±0,357^{üv,8}	1,452
	40	19,229±0,108^{öpr,8}	0,561
U.Y.+K	85	28,940±0,664^{ö,6}	2,295
	130	32,350±0,128^{r,6}	0,396

RSD: Bağıl standart sapma

Tukey testine göre, aynı sütundaki farklı harfler ilgili değerlerin antioksidan aktivite (CUPRAC) değerlerinin istatiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Değerlerin karşılaştırılması üç farklı kategoride gerçekleştirilmiştir.

1. Büyükten küçüğe a ile z aralığında sıralama

Tüm numunelere bağlı olarak, trolox taraması

2. Büyükten küçüğe A ile Z aralığında sıralama

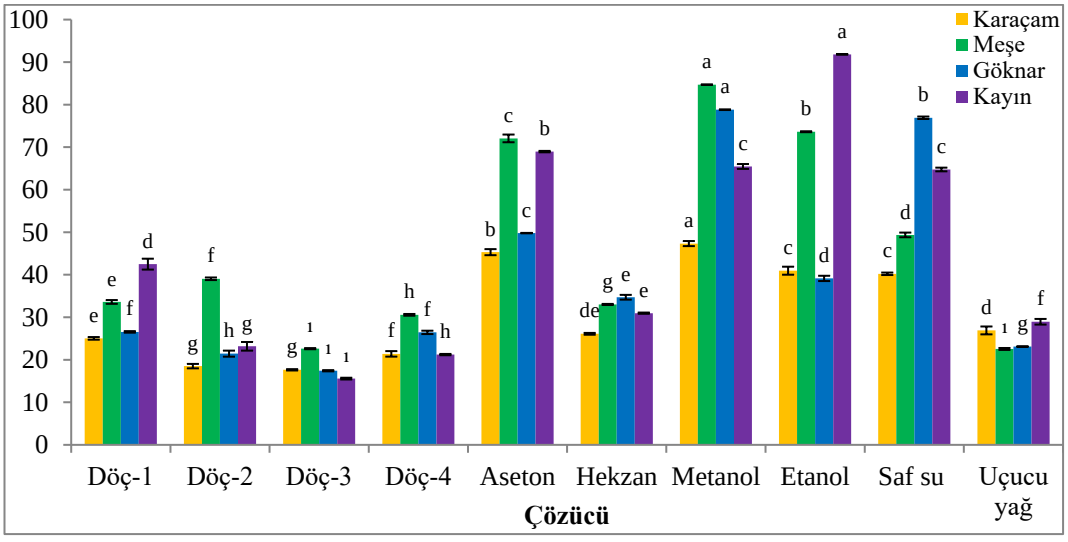
Geleneksel ve derin ötektik çözücülerden elde edilen numunelere bağlı olarak, trolox taraması

3. Büyükten küçüğe 1 ile 10 aralığında sıralama

Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın ağacından elde edilen numunelere bağlı olarak, trolox taraması

Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarından dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların ve uçucu yağların, antioksidan aktivesini belirlemek için

CUPRAC analizi ile elde edilen ortalama trolox değerleri Grafik 5.18'de verilmiştir. Tüm ağaç örneklerinin yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların ve uçucu yağın içerisinde en yüksek ortalama trolox değerlerini veren aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite bakımından etkin olduğu tespit edilmiştir. Organik çözücülerden elde edilen ekstraktlar kendi aralarında karşılaştırıldıklarında 85 mg/100ml derişimde aseton 45,309-72,059 mg/L; metanol 47,328-84,696 mg/L; etanol 39,135-91,821 mg/L; saf su ise 40,220-76,911 mg/L aralığında ortalama trolox değerleri vermiştir. Bu sonuçlara göre organik çözücüler için antioksidan aktivite büyükten küçüğe etanol, metanol, saf su ve aseton olarak sıralanabilmektedir. Tüm çözücüler içerisinde en yüksek antioksidan aktiviteye göre yaklaşık altı kat daha düşük antioksidan aktivite gösteren, döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktlar olmuştur. Döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktın 85 mg/100ml derişimde ortalama trolox değeri 15,574-22,613 mg/L olarak belirlenmiş ve antioksidan aktivite etkinliğinin zayıf olduğu belirlenmiştir. Tüm ağaçların yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktlar ve uçucu yağ 85 mg/100ml derişimde karaçam için 17,643-47,328 mg/L; meşe için 22,545-84,696 mg/L; göknar için 17,422-78,810 mg/L; kayın için 15,574-91,821 mg/L aralığında ortalama trolox sonuçları vermiştir.



Grafik 5.18. Karaçam, meşe, göknar ve kayın ekstraktları ve uçucu yağları için trolox cinsinden CUPRAC analiz sonuçları (mg/L) ve istatiksel trolox taraması

Bu tez çalışmasında ortalama trolox değerine göre, yüksek antioksidan aktivitede olan meşe ağacından elde edilen metanol ekstraktının 81,139 mg/L olarak hesaplanan

ortalama trolox değerinin antioksidan aktivite bakımından etkin olduğu düşünülmektedir. Ceylan vd. (2021), meşe ağacından geleneksel ekstraksiyon yöntemi ile metanol çözücüsü kullanarak elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için yaptıkları CUPRAC analizinde 13,23 mmol TEAC/g sonucunu elde etmişlerdir. Mevcut tez çalışmasında, bir diğer antioksidan aktivitesi yüksek ortalama trolox değeri 73,786 mg/L olan etanol çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktı olduğu gözlemlenmiştir. Başyiğit vd. (2020), meşe ağacının etanol çözücüsü ile muamelesinden elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri CUPRAC analizinde 1,98 mmol/g TEAC/g sonucunu elde etmişlerdir. Mokaddem-Daroui vd. (2021), göknar kozaklarından elde ettikleri hidrometanolik ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için CUPRAC analizi gerçekleştirmişler ve bunun sonucunda farklı fraksiyonlardaki 0,500 µg/ml derişime karşılık gelen 31,2-183,0 µg/ml aralığında değerler elde etmişlerdir. Benouchenne vd. (2021), göknar ağacının iğne yapraklarından elde ettikleri ekstraktın antioksidan aktivitesini belirlemek için gerçekleştirilen CUPRAC analizinde 0,500 µg/ml derişime karşılık gelen 5,79 µg/ml değerini hesaplamışlardır.

5.11 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Elde edilen ekstrakt ve uçucu yağ numunelerinin antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak dört bakteri (*Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* ve *Bacillus cereus*) ve bir mantar (*Candida albicans*) olmak üzere beş farklı mikroorganizma üzerinde test edilmiştir. Numunelerin mikroorganizmalara karşı etkileri emdirildikleri disklerin vermiş olduğu zonlarla tespit edilmiştir. Numunelerin konstrasyonlarının 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirildiği antibiyotik disklerin besiyerlerinde göstermiş olduğu zonlar ölçülerek, mm cinsinden ifade edilmiştir.

5.11.1 Disk Difüzyon Metodu Sonuçları (mm)

Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen 36 ekstrakt ve dört uçucu yağın *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus cereus* ve *Candida*

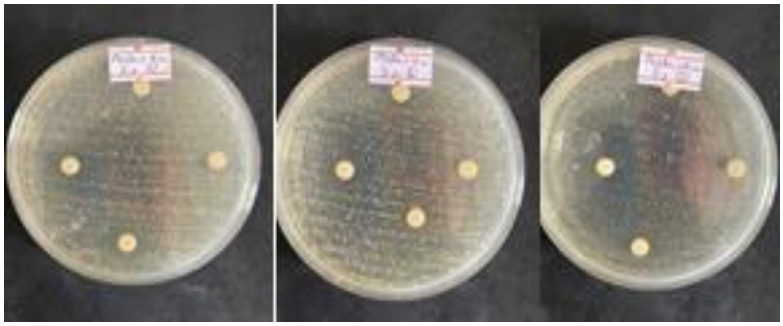
albicans suşlarına karşı antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri Tablo 5.13'de verilmektedir. Antimikrobiyal ve antifungal aktivitesi belirlenmeyen ekstrakt ve uçucu yağlar Tablo 5.13'den çıkarılmıştır. "±" ekstraktın mikroorganizmayı öldürmediği ancak bakteri ya da mantarın üremesini engelleyici bakteriyostatik ve fungistatik özellikte olduğunu ifade etmektedir. Antibakteriyel ve antifungal aktivitenin belirlenmesi için kullanılan disk difüzyon yönteminde, 40 numuneden elde edilen derişimler 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında boş antibiyotiklere emdirilmiştir. Bakteri ve mantar ekimi yapılmış besiyerlerinde yüklü disklerin oluşturduğu zonlar ölçülerek mm cinsinden elde edilen sonuçlar Tablo 5.13'e işlenmiştir. Bütün sonuçlar incelendiğinde ekstraktlar, *P. aeruginosa* bakterisine karşı 20 µl emdirilmiş disklerde 7-7,5 mm; 50 µl emdirilmiş disklerde 6,5-9 mm; 100 µl emdirilmiş disklerde ise 8,5-12 mm aralığında zonlar, *S. aureus* bakterisine karşı 20 µl emdirilmiş disklerde 7-8 mm; 50 µl emdirilmiş disklerde 7-10 mm; 100 µl emdirilmiş disklerde ise 8-11 mm aralığında zonlar, *E. coli* bakterisine karşı 20 µl emdirilmiş disklerde 8-8,5 mm; 50 µl emdirilmiş disklerde 7-11 mm; 100 µl emdirilmiş disklerde ise 8-13 mm aralığında zonlar, *B. subtilis* bakterisine karşı 20 µl emdirilmiş disklerde 7 mm; 50 µl emdirilmiş disklerde 7-9 mm; 100 µl emdirilmiş disklerde ise 7-15 mm aralığında zonlar vererek antibakteriyel aktivite göstermiştir. Yine aynı şekilde ekstraktlar, *C. albicans* mantarına karşı 20 µl emdirilmiş disklerde 7-8,5 mm; 50 µl emdirilmiş disklerde 8-11 mm; 100 µl emdirilmiş disklerde ise 8-13 mm aralığında zonlar vererek antifungal aktivite göstermiştir. Karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktlar arasında organik çözücülerden elde edilen ekstraktların derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlara göre daha yüksek antibakteriyel ve antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum, antioksidan aktivite bakımından etkin olan organik çözücülerden elde edilen ekstraktların antibakteriyel ve antifungal aktivite bakımından da etkin olmaları arasındaki bağlantıyla ilişkilendirilmektedir. Özellikle antioksidan aktivite bakımından genellikle yüksek IC_{50} değerleri veren aseton, metanol, etanol ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktlar antibakteriyel ve antifungal aktivite bakımından da birçok ekstraktda yüksek zonlar oluşturmuştur. Antibakteriyel ve antifungal aktivitelerinin araştırılması için kullanılan mantar ve bakteriler içerisinde *C. albicans* mantarına karşı daha çok ekstrakt antifungal aktivite göstermiştir.

P. aeruginosa bakterisine karşı tüm ekstraktların antibakteriyel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek antibakteriyel aktiviteyi; 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiş antibiyotik disklerden sırasıyla 7 mm; 9 mm ve 12 mm zonlarını veren metanol çözücüsünden elde edilen göknar ekstraktında olduğu belirlenmiştir (Fotoğraf 5.1). Antioksidan aktivite bakımından etkin olan metanol çözücüsünden elde edilen ekstraktların, fenolik bileşenlerce zengin olduğu ve serbest radikalleri inhibe edici etkisinin yanı sıra mikroorganizmaları baskılayıcı ya da öldürücü etkisinin de bulunması sebebiyle antibakteriyel aktivite bakımından da etkin oldukları gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında göknar ağacından elde edilen ekstraktların 100 µl emdirilmiş disklerinde 7,5-12 mm aralığında vermiş olduğu zon ölçümlerini, Benouchenne vd. (2021); yapmış oldukları çalışmada göknar ağacından elde ettikleri ekstraktların antibakteriyel aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri disk difüzyon testinde, *P. aeruginosa*'ya karşı 16,0 mm zon elde etmeleri sonucu ile etkin antibakteriyel aktivitede olduğu bulguları desteklemektedir. En düşük antibakteriyel aktiviteyi ise; 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiş antibiyotik disklerden sırasıyla 6,5 mm ve 8,5 mm zonlarını veren döç-3 çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktında olduğu belirlenmiştir. Antioksidan aktivite bakımından düşük değerler veren döç-3 çözücülerinden elde edilen ekstraktların antibakteriyel aktivite bakımından da etkinliklerinin zayıf olduğu görülmüştür. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi için Nisca vd. (2022); Ştefanescu vd. (2022); Tanase vd. (2022); Nisca vd. (2023) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda meşe ağacından elde edilen ekstraktların *P. aeruginosa* bakterisine karşı sırasıyla >5 mg/mL; 0,6-2,5 mg/mL; 2,5->5 mg/mL ve 0,6->5 mg/mL aralığında elde edilen MIC değerleri, bu tez çalışmasındaki meşe ağacından elde edilen ekstraktın *P. aeruginosa*'ya karşı baskılayıcı etkisini desteklediği düşünülmektedir.



Fotoğraf 5.1. Metanol+G numunesinin, *P. aeruginosa*'ya karşı disk difüzyon test sonucu

Tüm ekstraktların *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek antibakteriyel aktiviteyi; 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiş antibiyotik disklerden sırasıyla 8 mm; 10 mm ve 11 mm ile 8 mm; 9 mm ve 11 mm zonlarını veren etanol ve asetondan elde edilen karaçam ekstraktlarında olduğu belirlenmiştir (Fotoğraf 5.2). Antioksidan aktivite etkinliğinin mikroorganizmalara karşı baskılayıcı etkisi sebebiyle antioksidan aktivite bakımından etkin olan etanol ve aseton çözücülerinden elde edilen ekstraktların, antibakteriyel aktivite bakımından da etkin oldukları gözlemlenmiştir. En düşük antibakteriyel aktiviteyi ise; 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiş antibiyotik disklerden sırasıyla 7 mm ve 8 mm zonlarını veren döç-1 çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktında olduğu belirlenmiştir. Göknar ağacından elde edilen ekstraktların disk difüzyon yöntemi ile 7-11 mm aralığında vermiş olduğu zon ölçümlerini, Geana vd. (2023); yapmış oldukları çalışmada göknar ağacından elde ettikleri ekstraktların antibakteriyel aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri disk difüzyon testinde, *S. aureus*'a karşı 16,5 mm zon elde etmeleri sonucu ile etkin antibakteriyel aktivitede olduğu desteklenmektedir. Benzer şekilde, Benouchenne vd. (2021), göknar ağacından elde ettikleri ekstraktın antibakteriyel aktivitesini belirlemek için gerçekleştirilen disk difüzyon testine göre *S. aureus* suşuna karşı 14,33 mm zon oluşturduğunu tespit etmişlerdir.



Fotoğraf 5.2. Aseton+Kç numunesinin, *S. aureus*'a karşı disk difüzyon test sonucu

Tablo 5.13. Ekstraktların antibakteriyel ve antifungal aktivite sonuçları (mm)

	Antibakteriyel												Antifungal		
	P. aeruginosa			*S. aureus*			*E. coli*			*B. cereus*			*C. albicans*		
Numune	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**
Döç-1+M	-	-	-	-	7	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Döç-2+Kç	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	8	-	-	-
Döç-2+G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	7	8	10
Döç-2+K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,5	10	12,5
Döç-3+Kç	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8,5	11
Döç-3+M	-	6,5	8,5	-	-	-	-	-	9	-	-	-	8	11	13
Döç-3+G	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-
Döç-4+Kç	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	10
Döç-4+M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	8	10
Döç-4+G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	9	9
Döç-4+K	-	-	-	-	-	-	-	7	8	-	-	-	-	-	-
Aseton+Kç	-	8	10	8	9	11	-	-	-	7	8	10	8	9	9,5
Aseton+M	-	-	-	-	-	-	-	7	9,5	-	-	-	-	-	-
Aseton+G	7,5	8	12	7	8,5	10,5	8	11	13	-	7	10	7	8	9
Aseton+K	-	-	-	-	-	-	-	8,5	11,5	-	-	-	-	-	-
Hekzan+Kç	±	7	9	±	±	±	-	-	-	-	±	7	7	9	11
Hekzan+M	-	-	-	-	-	-	-	±	8,5	-	-	-	8	10	12
Hekzan+G	-	7	10	8	10	11	-	±	±	-	±	8	7	8	8
Hekzan+K	-	-	-	-	-	-	-	8	12	-	-	8,5	-	-	-
Metanol+Kç	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	7	10	8	10	12
Metanol+M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,5	-	-	-
Metanol+G	7	9	12	8	10	11	-	-	-	-	±	8	7	8	8
Metanol+K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	7,5	-	-	-

"-'': aktivite yok.

Tablo 5.13. Devamı…

	Antibakteriyel												Antifungal		
	P. aeruginosa			*S. aureus*			*E. coli*			*B. cereus*			*C. albicans*		
Numune	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**	**20 µL**	**50 µL**	**100 µL**
Etanol+Kç	7	8	10	8	10	11	-	-	±	7	8	10	-	-	-
Etanol+M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-
Etanol+G	-	-	-	-	-	-	-	-	±	7	9	15	-	-	-
Etanol+K	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	±	8	-	-	-
Saf su+M	-	-	-	-	-	-	8,5	11	13	-	-	-	-	-	-
Saf su+G	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-
Saf su+K	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-

"-'': aktivite yok.

Tablo 5.13'de *E. coli* bakterisine karşı ekstraktların antibakteriyel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek antibakteriyel aktiviteyi; 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiş antibiyotik disklerden sırasıyla 8 mm; 11 mm ve 13 mm ile 8,5 mm; 11 mm ve 13 mm zonlarını veren aseton çözücüsünden elde edilen göknar ile saf su çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktlarının gösterdiği belirlenmiştir (Fotoğraf 5.3). Antioksidan aktivite bakımından etkin olan aseton ve saf su çözücülerinden elde edilen ekstraktların *E. coli* bakterisine karşı antibakteriyel aktivite bakımından da etkin olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada meşe ağacından elde edilen ekstraktların disk difüzyon yöntemi ile 8,5-13 mm aralığında vermiş olduğu zon ölçümlerini, Sharba vd. (2020) ve Subhashini vd. (2016), yaptıkları çalışmalarında disk difüzyon yöntemi ile sırasıyla elde ettikleri 24,33 mm 12-15 mm aralığında zon ölçümleriyle yüksek antibakteriyel aktivitede olduğunu desteklemiştir. Ştefanescu vd. (2022), meşe ağacından elde ettikleri ekstraktların *E. coli* bakterisine karşı antibakteriyel aktivitesini belirlemek için MIC yöntemi ile >5 mg/mL ve MBC yöntemi ile >5 mg/mL değerlerini elde etmişlerdir. Sanchez-Gutierrez vd. (2022), tarafından meşenin öğütülmüş ve toz haline getirilmiş yapraklarından MEY kullanılarak elde edilen ekstraktların antibakteriyel aktivitesinin belirlenmesi için *E. coli* bakterisine karşı MIC yöntemi ile 2,5 mg/mL ve MBC yöntemi ile 2,5 mg/mL değerlerini elde etmişlerdir. Tanase vd. (2022), meşe ağacından MEY ve UEY yöntemlerini kullanarak elde ettikleri ekstraktların antibakteriyel aktivitesini incelemişler ve *E. coli* bakterisine karşı MIC yöntemi ile >5 mg/mL ve MBC yöntemi ile >5 mg/mL değerlerini elde etmişlerdir. Nisca vd. (2023), meşe ağacının yapraklarından MEY, UEY yöntemlerini kullanarak elde ettikleri ekstraktların antibakteriyel aktivitesini belirlemek için *E. coli* bakterisine karşı MIC değerini >5 mg/mL ve MBC değerini >5 mg/mL olarak elde etmişlerdir. Antibakteriyel aktivitenin belirlenmesi için gerçekleştirilen disk difüzyon testi sonucuna göre, göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden aseton çözücüsü kullanılarak elde edilen ekstraktın *E. coli* bakterisine karşı 13 mm zon oluşturduğu tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada Benouchenne vd. (2021), göknar ağacının iğne yapraklarından elde ettikleri ekstraktın antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için disk difüzyon testini uygulamışlar ve 10 µl ekstrakt derişimi emdirilmiş diskler *E. coli* suşuna karşı 16,5 mm zon oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Yine benzer bir çalışmada Geana vd. (2023), göknar ağacının kabuk ve iğne yapraklarından etanol ve metanol çözücülerini kullanarak elde ettikleri

ekstraktların antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için gerçekleştirdikleri disk difüzyon testinde, göknarın kabuklarından elde ettikleri ekstraktın *E. coli*'ye karşı 2,5 mm zon oluşturduğunu ölçmüşlerdir. En düşük antibakteriyel aktiviteyi ise; 100 µl miktarında emdirilmiş antibiyotik diskten 9 mm zon veren döç-3 çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktından olduğu belirlenmiştir. Yine aynı şekilde tez çalışmasında antioksidan aktivite analizlerinde döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktların düşük antioksidan aktivitede olmaları ile *E. coli* bakterisine karşı düşük antibakteriyel aktivitede olmasının ilişkili olduğu düşünülmektedir.



Fotoğraf 5.3. Aseton+G numunesinin, *E.coli*'ye karşı disk difüzyon test sonucu

Her bir ağaç örneklerinden elde edilen ekstraktların *B. cereus* bakterisine karşı antibakteriyel aktivite sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek antibakteriyel aktiviteyi; 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiş antibiyotik disklerden sırasıyla 7 mm; 8 mm ve 10 mm ile 7 mm; 8 mm ve 10 mm zonlarını veren etanol ve aseton çözücüsünden elde edilen karaçam ekstraktının Demirci vd. (2020), disk difüzyon testi sonucunda 12 mm zon elde etmeleri sonucunda antibakteriyel aktivite bakımından benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Fotoğraf 5.4). En düşük antibakteriyel aktiviteyi ise; 100 µl miktarında emdirilmiş antibiyotik diskten 7 mm zon veren hekzan çözücüsünden elde edilen karaçam ekstraktından olduğu belirlenmiştir. Aseton ve etanol çözücülerinden elde edilen ekstraktların yüksek antioksidan aktivitede olması, hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktların ise düşük antioksidan aktivitede olması ile paralel olarak antibakteriyel aktivite bakımından aseton ve etanol çözücünden elde edilen ekstraktların yüksek, hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktların ise düşük antibakteriyel aktivitede oldukları gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında 8-9,5 mm aralığında zon veren meşe ağacından elde edilen ekstraktların, Subhashini vd. (2016), yaptıkları çalışmada meşe ağacından elde ettikleri ekstraktların *B. cereus* bakterisine karşı 10-12 mm aralığında zon

belirlemiş olmaları ile antibakteriyel aktivite bakımından etkin olduğunu desteklediği düşünülmektedir. Mevcut çalışmada, göknar ağacından elde edilen ekstraktların *B. cereus*'a karşı 8-15 mm aralığında zon oluşumu gerçekleştirmiştir. Başka bir çalışmada Benouchenne vd. (2021), göknar ağacının iğne yapraklarından elde ettikleri ekstraktın antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için disk difüzyon testini uygulamışlar ve 10 µl ekstrakt derişimi emdirilmiş diskler *B. subtilis* suşuna karşı 14,33 mm zon oluşturduğunu tespit etmişlerdir.



Fotoğraf 5.4. Aseton+Kç numunesinin, *B.cereus*'a karşı disk difüzyon test sonucu

C. albicans mantarına karşı ekstraktların antifungal aktivite sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek antifungal aktiviteyi; 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiş antibiyotik disklerden sırasıyla 8 mm; 11 mm ve 13 mm zonlarını veren döç-3 çözücüsünden elde edilen meşe ekstraktından olduğu belirlenmiştir (Fotoğraf 5.5). Bu tez çalışmasında meşe ağacından elde edilen ekstraktların 100 µl miktarında emdirilmiş antibiyotik disklerden *C. albicans* mantarına karşı 10-13 mm aralığında vermiş olduğu zon ölçümlerini, Güllüce vd. (2020) yapmış oldukları çalışmada disk difüzyon yöntemi ile meşe ağacı ekstraktından 300 µl emdirilmiş antibiyotik disklerden 16-27 mm aralığında zon ölçümleriyle yüksek antifungal aktivitede olduğunu desteklemiştir. Sharba vd. (2020), meşe ağacından elde ettikleri etanolik ekstraktın antifungal aktivitesini belirlemek için gerçekleştirilen disk difüzyon testine göre *C. albicans* mantarına karşı 37,33 mm zon oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Tanen bileşenlerini içeren meşe ağacının antifungal aktivite bakımından etkin olduğunu dolayısıyla mevcut tez çalışması ile örtüştüğünü ortaya koymaktadır. Antimikrobiyal aktivite çalışmalarının disk difüzyon testinden sonraki aşamalarında uygulanan MIC, MBC ve MFC çalışmalarını gerçekleştiren Tanase vd. (2022); Nisca vd. (2023) meşe ağacından elde ettikleri ekstraktların *C.*

albicans mantarına karşı MIC değerlerini >5 mg/mL olarak tespit etmişler ve antifungal aktivitesini ortaya koymuşlardır. En düşük antifungal aktiviteyi ise; 20 µl, 50 µl ve 100 µl miktarlarında emdirilmiş antibiyotik disklerden sırasıyla 7 mm; 8 mm ve 8 mm zonlarını veren hekzan ve metanol çözücülerinden elde edilen göknar ekstraktlarından olduğu belirlenmiştir.



Fotoğraf 5.5. Döç-3+M numunesinin, *C.albicans*'a karşı disk difüzyon test sonucu

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kastamonu yöresinde yaygın olarak kullanılan endüstriyel ağaçlardan karaçam, meşe, göknar ve kayın türlerinin orman kesim artıkları niteliğindeki yapraklı yıllık sürgünleri dokuz farklı çözücü kullanılarak mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Buna ilaveten yine aynı dört farklı ağaç türünün yapraklı yıllık sürgünleri kullanılarak mikrodalga destekli damıtma yöntemi ile uçucu yağları elde edilmiştir. Ekstraksiyon işleminde kullanılan dokuz çözücüden dört tanesi çevre dostu çözücüler olarak nitelendirilen derin ötektik çözücüler; döç-1 (ChCl:1,4-bütanediol), döç-2 (ChCl:1.4-siklohekzandiol), döç-3 (ChCl:maltoz), döç-4 (ChCl:etilen glikol)'dür. Diğer çözücüler ise saf aseton, saf hekzan, saf etanol, saf metanol ve saf su'dur. Elde edilen ekstraktların hesaplanan verimleri karşılaştırıldığında derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktlar, organik çözücülerden elde edilen ekstraktlardan göre daha yüksek değerler vermiştir. Tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek verim, %72,57 ile döç-4 çözücüsünün kullanıldığı meşe ağacının yapraklı yıllık sürgününden elde edilmiştir. Elde edilen uçucu yağların verimleri karşılaştırıldığında en yüksek verimi, %0,32 ile karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen uçucu yağ vermiştir.

Karaçam, meşe göknar ve kayın ağaçlarının yapraklı yıllık sürgünlerinde, SPME yöntemi ile uçucu bileşenleri belirlenmiştir. Tüm bitki örneklerinden elde edilen uçucu bileşenlerden yüksek değerleri veren %25,80 ile 1R-α-pinene; %14,18 ile (-)-β-pinene; %8,45 ile D-limonene ve %15,31 ile caryophyllene bileşenleri olmuştur.

Ekstraktların HPLC analizi ile bazı şeker ve organik asit içerikleri araştırılmış ve sonucunda derin ötektik çözücülerden elde edilen ekstraktların yüksek değerler verdiği gözlemlenmiştir. Şeker analizinde araştırılan yedi şeker içerisinden glikoz, fruktoz, sükroz ve ksiloz şekerleri hemen hemen tüm ekstraktlarda belirlenmiştir. Şeker analizi sonuçlarına göre en yüksek içeriğin 8,725-82,393 g/L aralığında maltoz ve 19,759-195,948 g/L aralığında turanoz şekerlerinden elde edildiği gözlenmiştir. Organik asit analizinde içeriği çalışılan altı organik asitten laktik asit ve propiyonik asit hemen hemen tüm ekstraktlarda tespit edilmiştir. Elde edilen ekstraktların fenolik bileşen

içeriği LC-MS/MS analizi ile gerçekleştirilmiş ve 44 bileşen içerisinden 23 fenolik bileşenin varlığı belirlenmiştir. LC-MS/MS sonuçlarına göre, en yüksek içeriği 263,203 µg/L ile şikimik asit vermiştir.

Bitki örneklerinin ekstraksiyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri incelendiğinde herbir çözücünün ekstraksiyon sırasında bitki örneği yüzeyinde oluşturduğu tahribat görülmüş ve özellikle derin ötektik çözücülerin kullanıldığı işlemlerde bitki yüzeyindeki deformasyon ve aşınma açıkça gözlemlenmiştir.

Toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarları kullanılan çözücülere bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Elde edilen sonuçlarda antioksidan aktiviler ile toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarları arasında bazı bitki ve çözücü türlerinde bir paralellik gözlenmişken bazılarında görülmemiştir. Tüm numuneler içerisinde en yüksek toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde miktarı sırasıyla 242,436 mg/L; 222,114 mg/L; 0,674 mg/L değerlerini veren etanol çözücüsü kullanılarak karaçamın yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktda gözlenmiştir.

Antioksidan aktiviteyi belirlemek için gerçekleştirilen DPPH, ABTS ve CUPRAC analiz sonuçları ekstraksiyonda kullanılan çözücüye göre farklılıklar gösterdiği gözlenmiştir. Sonuçlara göre, aseton, metanol ve etanol çözücülerinden elde edilen ekstraktlar diğer çözücülere göre yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. DPPH analizine göre tüm numuneler içerisinde 5,18 mg/L ile en düşük IC_{50} değerini vererek en yüksek antioksidan aktivite gösteren aseton çözücüsü ile elde edilen kayın ekstraktı olmuştur. ABTS analizine göre ise en yüksek antioksidan aktiviteyi, IC_{50} değeri 1,79 mg/L olan döç-1 çözücüsü kullanılarak elde edilen kayın ekstraktı göstermiştir. CUPRAC analizinde ise en yüksek antioksidan aktiviteyi, 130 mg/100 mL derişimdeki ortalama trolox değeri 116,077 mg/L olan etanol çözücüsünden elde edilen kayın ekstraktı olmuştur. LC-MS/MS ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında aseton, metanol ve etanol çözücülerinden elde edilen ekstraktlarda fenolik bileşen içeriğinin yoğun olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 6.1; Tablo 6.2; Tablo 6.3 ve Tablo 6.4'de bitki türleri ve çözücü faktörlerinin ekstrakt verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde miktarları üzerine

olan etkileri açısından en uygun parametreyi tespit etmek için parametrelerin etkilerine göre büyükten küçüğe doğru puanlama yapılmıştır. En yüksek puan ekstrakt verimi için en yüksek verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde miktarı bakımından ise en yüksek içeriği ifade etmektedir. En küçük sayı ise ekstrakt verimi bakımından en düşük verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde miktarı bakımından ise en düşük içeriği ifade etmektedir.

Tablo 6.1'de karaçam ağacının yapraklı sürgünlerinden elde edilen ekstraktların kullanılan çözücülere göre verimi, toplam fenol, flavonoid ve antosiyanin madde miktarları kıyaslanarak sıralanmıştır. En yüksek ekstrakt verimi döç-3 çözücüsünden, en düşük ekstrakt verimi ise hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktda görülmektedir. Toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde miktarına göre en fazla içerik etanol çözücüsünden elde edilen ekstraktda görülürken, en az içerik ise sırasıyla hekzan, döç-3 ve döç-2 çözücülerinden elde edilen ekstraktlarda tespit edilmiştir. Karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların verim, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin sonuçlarına göre çözeltilerin toplam puanına göre en iyi çözücü etanol en başarısız çözücü ise hekzan olarak belirlenmiştir.

Tablo 6.1. Karaçam ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların; verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı sonuçlarına göre karşılaştırılması

	Ekstrakt verimi	Toplam fenolik madde	Toplam flavonoid madde	Toplam antosiyanin madde	Toplam
Döç-1	7	6	2	7	22
Döç-2	6	4	6	4	20
Döç-3	9	2	1	5	17
Döç-4	8	5	4	6	23
Aseton	4	7	7	-	18
Hekzan	1	1	3	-	5
Metanol	5	8	8	-	21
Etanol	3	9	9	9	30
Saf su	2	3	5	8	18

Tablo 6.2'de meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların verimi en yüksek döç-4, en düşük ise hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktda elde edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarına göre en fazla içerik metanol, en az içerik ise hekzan çözücüsü kullanılarak elde edilen ekstraktda tespit edilmiştir. Toplam flavonoid madde miktarına göre en çok içerik etanol, en az içerik ise döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktda tespit edilmiştir. Toplam antosiyanin madde

miktarına göre en yüksek içerik aseton, en düşük içerik ise saf su çözücüsü kullanılarak elde edilen ekstraktda tespit edilmiştir. Tüm puanlamaların toplamı hesaplandığında, en yüksek sonucu metanol en düşük sonucu ise hekzan çözücüsü kullanılarak meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlar göstermiştir.

Tablo 6.2. Meşe ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların; verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı sonuçlarına göre karşılaştırılması

	Ekstrakt verimi	Toplam fenolik madde	Toplam flavonoid madde	Toplam antosiyanin madde	Toplam
Döç-1	7	6	5	6	24
Döç-2	6	5	3	7	21
Döç-3	8	2	1	5	16
Döç-4	9	7	4	3	23
Aseton	4	4	7	9	24
Hekzan	1	1	2	-	4
Metanol	5	9	8	8	30
Etanol	3	8	9	4	24
Saf su	2	3	6	2	13

Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların verim, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde miktarları arasındaki ilişkiye göre sıralanışları Tablo 6.3'de verilmiştir. En yüksek ekstraktrakt verimi döç-4, en düşük ekstrakt verimi ise hekzan çözücüsünden elde edilen ekstraktlarda tespit edilmiştir. Toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı bakımından en fazla içerik metanol, en az içerik ise döç-3 çözücüsünden elde edilen ekstraktlarda belirlenmiştir. Toplam antosiyanin madde miktarı açısından ise en yüksek içerik döç-2, en düşük içerik ise etanol çözücüsünden elde edilen ekstraktda görülmektedir. Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden dokuz farklı çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktların verimi, toplam fenolik, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin madde içeriklerinin sonuçlarına göre yapılan puanlamanın sonucunda döç-2 ve metanol çözücülerinden elde edilen ekstraktlar en yüksek, hekzan çözücüsünden elde edilen ekstrakt ise en düşük sayıyı vermiştir.

Tablo 6.3. Göknar ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların; verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı sonuçlarına göre karşılaştırılması

	Ekstrakt verimi	Toplam fenolik madde	Toplam flavonoid madde	Toplam antosiyanin madde	Toplam
Döç-1	6	4	3	7	20
Döç-2	7	6	2	9	24
Döç-3	8	1	1	6	16
Döç-4	9	7	4	-	20
Aseton	4	3	7	-	14
Hekzan	1	2	5	-	8
Metanol	5	9	9	-	23
Etanol	3	8	8	5	24
Saf su	2	5	6	8	21

Tablo 6.4'de, kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktlarının çözücü farklılığına göre verim, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin madde miktarları bakımından karşılaştırılarak oluşturulan puanlaması verilmektedir. Elde edilen ekstraktların verimi açısından en yüksek verimde döç-4, en düşük verimde ise hekzan çözücülerinden elde edilen ekstraktlar olmuştur. Toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı bakımından an fazla etanol, en az ise sırasıyla döç-3 ve döç-2 çözücülerinden elde edilen ekstraktlarda görülmektedir. Tablo 6.4'deki her bir çözücü için gerçekleştirilen puanlamanın sonucuna göre etanol çözücüsü kullanılarak kayın ağacının yapraklı sürgünlerinden elde edilen ekstrakt en yüksek aseton ise en düşük sonucu vermiştir.

Tablo 6.4. Kayın ağacının yapraklı yıllık sürgünlerinden elde edilen ekstraktların; verimi, toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarı sonuçlarına göre karşılaştırılması

	Ekstrakt verimi	Toplam fenolik madde	Toplam flavonoid madde	Toplam antosiyanin madde	Toplam
Döç-1	7	6	4	9	26
Döç-2	6	7	1	6	20
Döç-3	8	1	2	7	18
Döç-4	9	8	3	-	20
Aseton	4	2	5	-	11
Hekzan	1	5	8	-	14
Metanol	5	3	7	-	15
Etanol	3	9	9	5	26
Saf su	2	4	6	8	20

Antibakteriyel ve antifungal aktivitenin araştırıldığı disk difüzyon testi sonuçlarına göre yoğunluklu olarak *C. albicans*, *E. coli* ve *B. cereus* suşlarına karşı öldürücü ya da baskılayıcı etkinin olduğu görülmüştür. Bu çalışmada antibakteriyel ve antifungal aktivitelerin belirlenmesi açısından kullanılan bitki örneklerinden elde edilen

ekstraktlar üzerindeki çözücülerin etkisi değerlendirildiğinde tüm bitkiler için ideal olan bir çözücüden bahsetmek güçtür.

Günümüzde insanların devamlı toksik aktiviteye sahip maddelere maruz kalması, beslenmeye bağlı kalp ve damar rahatsızlıkları, kanser gibi hastalıkların artması, yeterli ve kaliteli gıdaya ulaşamaması kaliteli beslenmenin önemini daha da arttırmaktadır. Besin değeri yüksek ve raf ömrü uzun gıdalar üretme çabası; üretilen gıdalar ve kullanılan içeriklerinin kalitesi üzerindeki önemi de artırmıştır. Sentetik antioksidan ve antimikrobiyellerin vücutta oluşturdukları tahribattan dolayı sentetik maddelerin yerini alabilecek doğal koruyucu arayışları hızla sürmektedir. Bu tip çalışmalarla yüksek antioksidan ve antimikrobiyel aktiviteye sahip bitki ekstraktları belirlenerek, bunların gıda sistemlerindeki koruyucu etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığının sağlanması amaçlanmaktadır.

Sentetik ilaçlar ve gıdalar yüzünden gittikçe artış gösteren sağlık problemleri karşısında doğal ürünlere yönelme ve araştırma konularında merak söz konusu olmuştur. Bu çalışmada kullanılan odun kesim artıkları olarak değerlendirilen endüstriyel karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçları örnekleri geri dönüşüm olarak değerlendirilebileceği ve orman yangınları açısından tehlike oluşturabilecek yangın üçgenindeki önemli etmenlerden biri olan yanıcı maddenin de ortamdan uzaklaştırılması ile yangınların oluşma riskini en aza indirme konusunda olumlu etkide olabileceği gösterilmiştir. Ekstraksiyon işleminde çevre dostu çözücüler olarak derin ötektik çözücülerin seçimi, enerji sarfiyatını düşürecek, daha etkin kısa süre ve az miktarda çözücünün kullanıldığı mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstrakt ve uçucu yağların pek çok gıda, kimya, ilaç vb. alanda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bütüncül olarak değerlendirildiğinde, yapılan çalışma sonucunda;

- Elde edilen ekstrakt ve uçucu yağların karakterizasyonu için yapılan analizlerin sonucunda fenolik bileşenlerce zengin olan numunelerin antioksidan aktivite, antibakteriyel ve antifungal aktivite bakımından verdikleri anlamlı sonuçlar, doğal

ürünlerden elde edilebilecek yüksek katma değerli ürünlerin üretiminde daha fazla kullanılması önerilmektedir,

- Kastamonu Orman Bölge Müdürlüğünce üretimi fazla olan ve endüstride kullanımı yaygın olan karaçam, meşe, göknar ve kayın ağaçlarının orman kesim artıklarından elde edilen kimyasal ekstraktların, ilaç, gıda, temizlik, kozmetik vb. sektörlerinde kendisine yer bulacağı düşünülmektedir,
- Değerlendirilecek orman kesim artıklarının yerel halkın işlendirilmesiyle toplatılması ve ekstraksiyon işlemine tabi tutulması hem yeni istihdam alanlarının açılması hem katma değerli ürünlerin üretilmesi hem de bu sektörle ilgili makine teçhizat sanayisinin gelişimine öncülük edecektir,
- Kesimden sonra arazide atıl durumda bırakılan orman kesim artıklarının, ormandan çıkartılarak orman yangın risklerinin azaltılması sağlanacaktır,
- Üretimde kullanılacak çevre dostu DÖÇ'ler ve enerji sarfiyatı ve işlem süresi düşük MEY gibi modern yöntemler sayesinde çevre kirliliğinin sebep olduğu küresel ısınma, karbon ayak izi ve iklim değişikliği sorunlarına önemli oranda çözümler getirilmiş olacaktır,
- Bu tez çalışmasında yapılan antioksidan, antibakteriyel ve antifungal analizler sonucunda doğal ilaç, gıda, temizlik vb. ürünlerde takviye kimyasal bileşenlerin üretiminde endüstriyel orman kesim atıkları, kullanılabilir,
- Genellikle doğal ortamlarında bırakılan ve ekonomik değeri olmayan orman kesim artıklarının, ülke ekonomisine kazandırılarak, katma değeri yüksek ürünlerin üretiminde kullanılması, önemli bir potansiyel kaynak olarak değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun*, 1, 70–71.

Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. K. (2004a). Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J Am Chem Soc*, 126(29), 9142–9147.

Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. K. (2004b). Ionic liquid analogues formed from hydrated metal salts. *Chem Eur J*, 10(15), 3769–3774.

Abbott, A. P., Barron, J. C., Ryder, K. S., & Wilson, D. (2007). Eutectic-based ionic liquids with metal-containing anions and cations. *Chem Eur J*, 13(22), 6495–6501.

Abbott, A. P., Harris, R. C., Ryder, K. S., D'Agostino, C., Gladden, L. F., & Mantle, M. D. (2011). Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chem*, 13(1), 82–90.

Abd Aziz, N. A., Hasham, R., Sarmidi, M. R., Suhaimi, S. H., & Idris, M. K. H. (2021). A review on extraction techniques and therapeutic value of polar bioactives from Asian medicinal herbs: Case study on Orthosiphon aristatus, Eurycoma longifolia and Andrographis paniculata. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(2), 143-165.

Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10.

Achkar, T. E., Greige-Ggerges, H., & Fourmentin, S. (2021). Basics and Properties of deep eutectic solvents: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 3397-3408.

Adamczak, A., Ozarowski, M., & Karpinski, T. M. (2020). Antibacterial Activity of Some Flavonoids and Organic Acids Widely Distributed in Plants. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), 109-125.

Ahmadi, R., Bahram, H., Safavi, A., Shojaeifard, Z., Mohabbati, M., & Firuzi, O. (2018). Assessment of cytotoxicity of choline chloride-based natural deep eutactic solvents against human HEK-293 cells: A QSAR analysis. *Chemosphere*, 209, 831-838.

Ahmed, S. I., Hayat, M. Q., Tahir, M., Mansoor, Q., Ismail, M., Keck, K., & Bates, R. B. (2016). Pharmacologically active flavonoids from the anticancer, antioxidant and antimicrobial extracts of Cassia angustifolia Vahl. *BMC complementary and alternative medicine*, 16(1), 460-469.

Ahonen-Jonnarth, U., Van Hees, P. A. W., Lundström, U. S., & Fınlay, R. D. (2000). Organic acids produced by mycorrhizal Pinus sylvestris exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytologist Foundation*, 146(3), 557-567.

Akdağ, A., & Öztürk, E. (2019). Distillation Methods of Essential Oils. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi,* 45(1), 22-31.

Akter, M., Sikder, T., Rahman, M., Ullah, A., Binte Hossain, K. F., Banik, S., Hosokawa, T., Saito, T., & Kurasaki, M. (2018). A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical propertis and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 9, 1-16.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I., & Azhari, N. H. (2018). Vernonia cinerea leaves as the source of phenolic compounds, antioxidants, and anti-diabetic activity using microwave-assisted Extraction technique. *Industrial Crops & Products*, 122, 533-544.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I., & Kabbashi, N. A. (2019). Extraction and characterization of bioactive compounds in Vernonia amygdalina leaf ethanolic extract comparing Soxhlet and microwave-assisted Extraction techniques. *Journal of Taibah University for Science*, 13(1), 414-422.

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.

Albayrak, S., Sağdıç, O., & Aksoy, A. (2010). Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology*, 26(4), 401-409.

Alonso, D. A., Baeza, A., Chinchilla, R., Guillena, G., Pastor, I. M., Ramon, D. J. (2016). Deep eutectic solvents: the organic reaction medium of the century. *European Journal of Organic Chemistry*, 4, 612-632.

Alma, M. H., & Çetin, N. S. (2002). Orman Foliagesi Üzerinde Etkili Olan Faktörler ve Foliagenin Kullanım Yerleri. *II. Ulusal karadeniz Ormancılık Kongresi*, 1049-1056, Artvin.

Altuner E. M., Ceter, T., & Islek, C. (2010a). Investigation of antifungal activity of Ononis spinosa L. ash used for the therapy of skin infections as folk remedies. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 44(4), 633-639.

Altuner, E. M., & Akata, I. (2010b). Antimicrobial activity of some macrofungi extracts. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 14(1), 45-49.

Altuner, E. M., Canlı, K., & Akata, I. (2014). Antimicrobial screening of Calliergonella cuspidata, Dicranum polysetum and Hypnum cupressiforme. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 8(1), 539-545.

Altunay, N., Elik, A., & Gürkan, R. (2019). Natural deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted-microextraction for extraction, pre-concentration and

analysis of methylmercury and total mercury in fish and environmental waters by spectrophotometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(7), 1079-1097.

Alvarez, A., Poejo, J., Matias, A. A., Duarte, C. M. M., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2017). Microwave pretreatment to improve Extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on Antioxidant bioactivity. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 162-170.

Alvarez-Vasco, C., Ma, R., Quintero, M., Guo, M., Geleynse, S., Ramasamy, K. K., Wolcott, M., & Zhang, X. (2016). Uniquue low-molecular-weight lignin with high purity extracted from wood by deep eutectic solvents (DES): a source of lignin for valorization. *Green Chemistry*, 18, 5133-5141.

Alwazeer, D., Elnasanelkasım, M. A., Çiçek, S., Engin, T., Çiğdem, A., & Karaoğul, E. (2023). Comparative study of phytochemical Extraction using hydrogen-rich water and supercritical fluid Extraction methods. *Process Biochemistry,* 128, 218-226.

Antosz, K., Machado, J., Mazurkiewicz, D., Antonelli, D., & Soares, F. (2022). Systems Engineering: Availability and reliability. *Applied sciences,* 12(5), 2504-2513.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *J. Agric. Food. Chem,* 52(26), 7970-7981.

Aslam, S. N., Stevenson, P. C., Kokubun, T., & Hall, D. R. (2009). Antibacterial and antifungal activity of cicerfuran and related 2-arylbenzofurans and stilbenes. *Microbiological Research,* 164(2), 191-195.

Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ümmahan, Yıldız, M., Öztürk, A, Çetin, M., Savran, E. Ş., & Yılmaz, B. (2019). Oksidatif Stres Durumunda Antioksidan Enzimlerin Rolü – Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutatyon Peroksidaz (GPx). *SDÜ Tıp Fak. Derg.,* 6(3), 362-369.

Ateş, S., Akyıldız, M. H., Vurdu, H., & Akgül, M. (2007). Türkiye'de Orman Kesim Artıkları ve Değerlendirilmesi. *Kastamonu Orman Fakültesi Dergisi*, 7(1), 93-103.

Avşar, G., Topallar, S., Özdemir, S., & Külekçi, B. (2014). *Uçucu Bileşen İçeren Bitkilerden Süperkritik Ekstraksiyon Yöntemi ile Özütleme*. 4. Kozmetik Kimyası Üretimi Standardizasyonu Kongresi, Kimyagerler Derneği, 14-16 Şubat, Antalya.

Aydın, E., Türkez, H., & Geyikoğlu, F. (2013). Antioxidative, anticancer and genotoxic Properties of α-pinene on N2a neuroblastoma cells. *Biologia,* 68(5), 1004-1009.

Azam, S., Hadi, N., Khan, N. U., & Hadi, S. M. (2004). Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: Implications for anticancer properties. *Toxicology in vitro*, 18(5), 555-561.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436.

Baki, S., Tufan, A. N., Altun, M., Özgökçe, F., Güçlü, K., & Özyürek, M. (2018). Microwave assisted extraction of polyphenolics from some selected medicinal herbs grown in Turkey. *Rec Nat Prod*, 12(1), 29-39.

Baldemir, A., Köngül, E., Ildız, N., & İlgün, S. (2015). Investigations on Capsicum annuum L. samples purchased from Kayseri province of Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 1-15.

Baran, S., V. Reuss, S. H., Könlg, W. A., & Kalemba, D. (2007). Composition of the Essential Oil of *Abies koreana* Wils.. *Flavour and Fragrance Jurnal*, 22(1), 78-83.

Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A.S., & Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, 49, 96-109.

Başer, K. H. C. (2010). Tıbbi ve Aromatik Bitkisel Ürünlerin Üretimi ve Kalite Kontrolü. *Eskişehir, Anadolu Üniversitesi Yayınları*.

Başyiğit, B., Sağlam, H., Köroğlu, K., & Karaaslan, m. (2020). Compositional analysis, biological activity, and food protecting ability of ethanolic extract of *Quercus infectoria* gall. *Journal Food Process Preserv.*, 44(9), e14692.

Baydar, H. (2019). Tıbbi ve aromatik bitkiler bilimi ve teknolojisi. *Nobel Akademik Yayıncılık.*

Bayram, S., Kutlu, N., Gerçek, Y. C., Çelik, S., & Bayram, N. E. (2022). Bioactive compounds of deep eutectic solvents extracts of Hypericum perforatum L.: Polyphenolic- organic acid profile by LC-MS/MS and pharmaceutical activity. *Food Bioscience*, 49(3), 101926.

Belokurov, S. S., Narkevich, I. A., Flisyuk, E. V., Kaukhova, I. E., & Aroyan, M. V. (2019). Modern extraction methods for medicinal plant raw material (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal,* 53(6), 48-53.

Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., P. Devkota, H., E. Orhan, I., K. Patra, J., Das, G., Anandharamakrishnan, C., Gomez-Gomez, L., F. Nabavi, S., M. Nabavi, S., & Atanasov, A. G. (2018). A Critical Analysis of Extraction Techniques Used for Botanicals: Trends, Priorities, Industrial Uses and Optimization Strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82-102.

Benjamin, S., Pradeep, S., Josh, M. S., Kumar, S., & Masai, E. (2015). A monograph on the remediation of hazardous phthalates. *Journal of Hazardous Materials*, 298, 58-72.

Benouadah, N., Aliouche, D., Pranovich, A., & Willför, S. (2019). Chemical characterization of *Pinus halepensis* sapwood and heartwood. *Wood Material Science and Engineering*, 14(3), 157-164.

Benouchenne, D., Bellil, I., Akkal, S., & Khelifi, D. (2021). Investigation of Phytochemical and Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Activities from Abies Extract. *The Scientific Journal of King Faisal University*, 22(2), 26-32.

Beyaz, M. (2014). Esansiyel Yağlar. Antimikrobiyal, Antioksidan ve Antimutajenik Aktiviteleri. *Akademik Gıda*, 12(3), 845-853.

Bhaskaran, S., & Mehta, S. (2007). Stabilized Anthocyanin Extract Ffrom Garcinia Indica. US7261769 B2.

Björklund, E., Bowadt, S., Nilsson, T., & Mathiasson, L. (1999). Pressurized fluid extraction of polychlorinated biphenyls in solid environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 836(2), 285-293.

Björklund, E., Nilsson, T., & Bowadt, S. (2000). Pressurised liquid extraction of persistent organic pollutants in environmental analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 19(7), 434-445.

Bondia-Pons, I., Aura, A. M., Vuorela, S., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., & Poutanen, K. (2009). Rye phenolics in nutrition and health. *Journal Cereal Science*, 49(3), 323-336.

Borneo, R., Leon, A. E., Aguirre, A., Ribotta, P., & Cntero, J. J. (2009). Antioxidant capacity of Medicinal plants from the Province of Cordoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry*, 112(3), 664-670.

Bouddah, P., Lahlah, J., Porqueres, F., & Bouafif, H. (2015). Composition, antimicrobial and antioxidant activities of seven Essential oils from the North American boreal forest. *World J. Microbiol Biotechnol*, 31, 907-919.

Boukhatem, M. N. (2020). Scientific findings: The amazing use of essential oils and their related terpenes as natural preservatives to ımprove shelf-life of food. *Food Sciance &Nutrition Technology*, 5(2), 2574-2701.

Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., & Chemat, F. (2015). Bio-refinery of peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free Extraction processes using ultrasound and microwave techniqus to obtain Essential oil, Polyphenols and pectin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 72-79.

Bouras, M., Chadni, M., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., & Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols fromQuercus bark. *Industrial Crops and Products*, 77, 593-601.

Burchi, F., Fanzo, J., & Frison, E. (2011). The Role of Food and Nutrition System Approaches in Tackling Hidden Hunger.

Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 209-242.

Cadahia, E., De Simon, B. F., Aranda, I., Sanz, M., Sanchez-Gomez, D., & Pinto, E. (2014). Non-targeted Metabolomic Profile of *Fagus sylvatica* L. Leaves Using Liquid Chromatography with Mass Spectrometry and Gas Chromatography with Mass Spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 26(2), 171-182.

Calinescu, I., Vinatoru, M., Ghimpeteanu, D., Lavric, V., & Mason, T. J. (2021). A new reactor for process intensification involving the simultaneous application of adjustable ultrasound and microwave radiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 77, 105701.

Calvo-Flores, F. G., & Mingorance-Sanchez, C. (2021). Deep Eutectic Solvents and Multicomponent Reactions: Two Convergent Items to Green Chemistry Strategies. *Chemistry Europe*, 10(8), 815-829.

Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent Extraction of environmental samples. *Trends in analytical Chemistry*, 19(4), 229-248.

Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193.

Campbell, K. A., Vaca-Medina, G., Glatz, C. E., & Pontalier, P. Y. (2016). Parameters affecting enzyme-assisted aqueous extraction of extruded sunflower meal. *Food Chem*, 208(5), 245-251.

Canales, M., Hernandez, T., Caballero, J., De Vivar, A. R., Avila, G., Duran, A., & Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 429-439.

Canlı, K., Yetgin, A., Akata, I., & Altuner, E. M. (2016). In vitro antimicrobial activity screening of Rheum rhabarbarum roots. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Invention*, 5(2), 1-4.

Cao, J., Yang, M., Cao, F., Wang, J., & Su, E. (2017). Well-Designed Hydrophobic Deep Eutectic Solvents As Green and Efficient Media for the Extraction of Artemisinin from Artemisia annua Leaves. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(4), 3270-3278.

Cao, Q., Li, J., Xia, Y., Li, W., Luo, S., Ma, C., & Liu, S. (2019). Green Extraction of Six Phenolic Compounds from Rattan (*Calamoideae faberii*) with Deep Eutectic Solvent by Homogenate-Assisted Vacuum-Cavitation Method. *Molecules*, 24(1), 113-127.

Cellat, K. (2011). Bazı endemik bitkilerin uçucu yağ bileşenlerinin Ekstrakte edilmesi ve içeriklerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, 73, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. Adana.

Ceylan, Ş., Yardımcı, Ş. S., Camadan, Y., Saral, Ö., & Ö. Batur, Ö. (2021). Chemical Composition of Essential Oil by SPME and Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant Activities of *Quercus inectoria* GALL. *Acta Sci. Hortorum Cultus*, 20(6), 93-103.

Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., & Basak, T. (2013). Microwave food processing—A review. *Food Res. Int.*, 52(1), 243-261.

Chaturvedi, A. K. (2018). Extraction of Neutraceuticals from Plants by Microwave Assisted Extraction. *Sys Rev Pharm.*, 9(1), 31-35.

Chemat, F., Huma, Z., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in Food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano Tixier, A. S., & Abert Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonocchemistry*, 34, 540-560.

Chen, J. H., & Ho, C. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2374-2378.

Chen, Z., & Wan, C. (2018). Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresource Technology*, 250(1), 532-537.

Chen, H., Zhou, X., & Zhang, J. (2014). Optimization of enzyme assisted extraction of polysaccharides from Astragalus membranaceus. *Carbohydrate Polymers*, 111(C), 567-575.

Choi, Y. H., van Spronsen, J., Dai, Y., Verberne, M., Hollmann, F., Arends, I. W. C. E., Witkamp, G. J., & Verpoorte, R. (2011). Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol*, 156(4), 1701–1705.

Chua, L. S., Latiff, N. A., & Mohamad, M. (2016). Reflux extraction and cleanup process by column chromatography for high yield of andrographolide anriched extract. *Journal of Applied Research onMedicinal and Aromatic Plants*, 3(2), 64-70.

Chupin, L., Maunu, S. L., Reynaud, S., Pizzi, A., Charrier, B., & Charrier-El Bouhtoury, F. (2015). Microwave assisted Extraction of maritime pine (Pinus pinaster) bark: Impact of particle and characterization. *Industrial Crops and Products*, 65, 142-149.

Coutinho, J. A. P., & Pinho, S. P. (2017). Special Issue on deep eutectic solvents: A foreword. *Fluid Phase Equilibria*, 448, 1.

Cuchet, E., Roux, P., & Spinelli, R.. (2004). Performance of Logging Residue Bundler in The Temperature Forests of France. *Biomas and Bioenergy*, 27(1), 31-39.

Cui, Q., Liu, J., Wang, L., Kang, Y., Meng, Y., Jiao, J., & Fu, Y. (2018). Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production*, 184, 826-835.

Cui, Q., Peng, X., Yao, X., Wei, Z., Luo, M., Wang, W., Zhao, C., Fu, Y., & Zu, Y. (2015). Deep eutectic solvent-based microwave-assisted Extraction of genistin, genistein and apigenin from pigeon pea roots. *Separation and Purification Technology*, 150, 63-72.

Cui, Y., Li, C., Yin, J., Li, S., Jia, Y., & Bao, M. (2017). Design, synthesis and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride. *J Mol Liq*, 236(C), 338–343.

Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. *Trends in Analytical Chemistry*, 105(5), 225-239.

Curcio, M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O. I., Cirillo, G., Spizzirri, U. G., & Picci, N. (2009). Covalent insertion of Antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5933-5938.

Çağlar, H. O., Süslüer, S. Y., Kavaklı, Ş., Gündüz, C., Ertürk, B., Özkınay. F., & Haydaroğlu, A. (2017). Meme kanseri kök hücrelerinde elajik asit ile indüklenmiş mRNA'ların ifadesi ve elajik asidin apoptoz üzerine etkisi. *Ege Tıp Dergisi*. 56(4), 183-192.

Çağlar, M. Y., & Demirci, M. (2017). Üzümsü Meyvelerde Bbulunan Ffenolik Bileşikler ve Beslenmedeki Önemi. *European Journal of Science and Technology*, 7(11), 18-26.

D. Çalhan, S., & Ülger, M. (2018). Kolinklorür içeren bazı alçak ötektik çözücülerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilim Dergisi*, 11(2), 184-195.

Çam, M., & Hışıl, Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, 123(3), 878-885.

Çam, M., Hışıl, Y., & Durmaz, G. (2009). Classification of eight pomegranate juices based on Antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112(3), 721-726.

Çelik, A., Nur Herken, E., Arslan, İ., Zafer Özel, M., & Mercan, N. (2010). Screening of the constituents, antimicrobial and antioxidant activity of endemic Origanum

hypericifolium O. Schwartz ve P.H. Davis. *Natural Product Research*, 24(16), 1568-1577.

Çopuroğlu, Ö. (2013). Niğde Yöresindeki Bazı Endemik Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktiviteleri. Yüksek lisans tezi, 67, *Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Niğde.

D'Agostino, C., Gladden, L. F., Mantle, M. D., Abbott, A. P., Ahmed, E. I., Al-Murshedi, A. Y. M., & Harris, R. C. (2015). Molecular and ionic Diffusion in aqueous–deep eutectic solvent mixtures: probing intermolecular interactions using PFG NMR. *Phys. Chem. Chem. Phy.*, 17(23), 15297-15304.

Dağcı, E. K., İzmirli, M., & Dığrak, M. (2002). Kahramanmaraş İlinde Yetişen Bazı Ağaç Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 5(1), 38-46.

Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Myrtus communis L. leaves. *Food Chem*, 166(1), 585-595.

Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2015). Tailoring Properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem*, 187, 14–19.

Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta,* 766, 61–68.

Daud, N. M., Putra, N. R., Jamaludin, R., Norodin, N. S. Md., Sarkawi, N. S., Hamzah, M. H. S., Nasir, H. M., Zaidel, D. N. A., Yunus, M. A. C., & Salleh, L. Md. (2022). Valorisation of plant seed as natural bioactive compounds by various Extraction methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 119(4), 201-214.

Davis, S. J. (2015). Deep eutectic solvents derived from inorganic salts. Ph.D. Thesis, *University of Leicester*. United Kingdom.

De Azevedo, A. B. A., Kieckbush, T. G., Tashima, A. K., Mohamed, R. S., Mazzafera, P., & de Melo, S. A. B. V. (2008). Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 44(2), 186-192.

De Castro, M. D. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369(1-2), 1-10.

De Castro, M. D. L., & Priego-Capote, F. (2010). Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.

Dedebaş, T., Dursun Çapar, T., Ekici, L., & Yalçın, H. (2021). Yağlı tohumlarda ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ve avantajları. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 21, 313-322.

Demir, T., Akpınar, Ö., Kara, H., & Güngör, H. (2019). Nar kabuğundan antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu. *Gıda*, 44(2), 369-382.

Demir, T., Demir, H., Görler, O., Özden, S., Doğan, D. Ö., Tuğut, F., Saygın, A. G., Ülgey, M., & Muslu, Z. (2017). The effects of some drinks on saliva pH. *Journal of Interdisciplinary Medicine and Dental Science*, 5(4), 1-4.

Demirci, A. N., Çömlekcioğlu, N., & Aygan, A. (2020). Determination of the Chemical Composition, Antimicrobial Activity and Flavonoid Content of the Essential Oils of Cedrus libani and Pinus nigra subsp. pallasiana. *Turkish Journal of Agriculture – Food Sciance and Technology*, 8(8), 1747-1754.

Diagne, R. G., Foster, G. D., & Khan, S. U. (2002). Comparison of Soxhlet and microwave assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3204-3207.

Diestra, K. V., Vandenberghe, L. P. S., & Soccol, C. R. (2020). Oilseed Enzymatic Preatreatment for Efficient Oil Recovery in Biodiesel Production Industry: a Review. *BioEnergy Research*, 13(4), 1016-1030.

Diken, M. E. (2009). Bazı şifalı bitkilerin antioksidan içerikleri, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*. Balıkesir.

Doğan, B., K. Abuaf, Ö., & Karabacak, E. (2012). Tamamlayıcı/Alternatif Tıp ve Dermatoloji. *Türkderm*, 46(2), 62-66.

Dönmez, İ. E., Hemming, J., & Willför, S. (2016). Bark Extractives and Suberin Monomers from Arbutus Andrachne and Platanus Orientalis, *BioRes*., 11(1), 2809-2819.

Dönmez, İ. E., & Salman, H. (2021). Söğüt (Salix alba L.) odun ve kabuğunun kimyasal yapısı. *Turkish Journal of Forestry*, 22(1), 38-42.

Drozdz, P., & Pyrzynska, K. (2018). Assessment of polyphenol content and Antioxidant activity of oak bark extracts. *European Journal of Wood and Wood Products*, 76(2), 793-795.

Duarte, A. R. C., Ferreira, A. S. D., Barreiros, S., Cabrita, E., Reis, R. L., & Paiva, A. (2017). A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: solubility and permeability studies. *Eur J Pharm Biopharm*, 114, 296–304.

Du, C., Zhao, B., Chen, X. B., Birbilis, N., Yang, H. (2016). Effect of water presence on choline chloride-2urea ionic liquid and coating platings from the hydrated ionic liquid. *Sci. Reports*, 6(1), 29225.

Eisenmenger, M., & Dunford, N. T. (2008). Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(1), 55-61.

Elguea-Culebras, G. O. de Bravo, E. M., & Sanchez-Vioque, R. (2022). Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mmediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market. *Industrial Crops & Products,* 175, 114261.

El Maaiden, E., Bouzroud, S., Nasser, B., Moustaid, K., Mouttaqi, A. E., Ibourki, M., Boukcim, H., Hirich, A., Kouisni, L., & El Kharrassi, Y. (2022). A comparative study between conventional and advanced extraction techniques: pharmaceutical and cosmetic properties of plant extracts. *Molecules,* 27, 2074.

Ercan, S. Ş., & Soysal, Ç. (2011). Ultrasonun Gıdalarda ve Enzimlerin İnaktivasyonunda Kullanılması. *Gıda/The Journal of Food*, 36(4), 225-231.

Ergen, N., Coşkun, S. H., Orhan, D. D., Aslan, M., Sezik, E., & Atalay, A. (2018). Evaluation of the lifespan extension effects of several Turkish medicinal plants in Caenorhabditis elegans. *Turkish Journal of Biology,* 42(2), 163–173.

Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.

Esmaeili, S., Dayani, L., Taheri, A., & Zolfaghari, B. (2021). Phytochemical standardization, formulation and evaluation of oral hard gelatin capsules from *Pinus eldarica* bark extract. *Avicenna Journal Phytomedicine*, 11(2), 168-179.

Espin, J. C., Garcia-Conesa, M. T., & Tomas-Barberan, F. A. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986-3008.

Falandysz, J., Wyrzykowska, B., Warzocha, J., Barska, I., Garbacik-Wesolowska, A., & Szefer, P. (2004). Organochlorine pesticides and PCBs in perch Perca fluviatilis from the Odra/ Oder river estuary. *Baltic Sea. Food Chemistry*, 87(1), 17-23.

Faydaoğlu, E., & Sürücüoğlu, M. (2013). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanaklar. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2), 233-265.

Feng, S., Cheng, S., Yuan, Z., Leitch, M., & Xu, C. C. (2013). Valorization of bark for chemicals and materials: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 26(3), 560-578.

Fernandes, C., Melro, E., Magalhaes, S., Alves, L., Craveiro, R., Filipe, A., Valente, A. J. M., Martins, G., Antunes, F. E., Romano, A., & Medronho, B. (2021). New deep eutectic solvent assisted Extraction of highly pure lignin from maritime pine sawdust (Pinus pinaster Ait.). *International Journal of Biological Macromolecules*, 177, 294-305.

Ferreira-Santos, P., Ggenisheva, Z., Pereira, R. N., & Teixeira, J. A. (2019). Moderate Electric Fields as a Potential Tool for Sustainable Recovery of Phenolic Compounds from *Pinus pinaster* Bark. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering,* 7(9), 8816-8826.

Ferrera, Z. S., Sanz, C. P., Santana, C. M., & Rodriguez, J. J. S. (2004). The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23(7), 469-479.

Fidan, A. F., & Dündar, Y. (2007). Yucca schidigera ve içerdiği saponinler ile fenolik bileşiklerinin, hipokolesterolemik ve antioksidan etkileri. *Lalahan Hay. Araşt. Enstitü Dergisi*, 47(2), 31-39.

Fkiri, S., Mezni, F., Rigane, G., Salem, R. B., Ghazghazi, H., Khouja, M. L., Nasr, Z., & Khaldi, A. (2021). Chemotaxonomic Study of Four Subspecies of Pinus nigra Arn. Grown in Common Garden Based on Essential Oil Composition. *Hindawi Journal of Food Quality*, 5533531.

Florindo, C., Branco, L. C., & Marrucho, I. M. (2019). Quest for green-solvent design: from hydrophilic to hydrophobic (deep) eutectic solvents. *Chemsuschem*, 12(8), 1549–1559.

Florindo, C., Oliveira, F. S., Rebelo, L. P. N., Fernandes, A. M., & Marrucho, I. M. (2014). Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sust. Chem. Eng.*, 2(10), 2416–2425.

Fu, X., Wang, D., Belwal, T., Xie J., Xu, Y., Li, L., Zou, L., Zhang, L., & Luo, Z. (2021). Natural deep eutectic solvent enhanced pulse-ultrasonication assisted Extraction as a multi-stability protective and efficient green strategy to extract anthocyanin from blueberry pomace. *LWT – Food Science and Technology*, 144(3), 111220.

Garcia, G., Aparicio, S., Ullah, R., & Atilhan. M. (2015). Deep eutectic solvents: physicochemical properties and gas separation applications. *Energy Fuels*, 29(4), 2616–2644.

Garcia-Villalba, R., Espin, J. C., Thomas-Barberan, F. A., & Rocha-Guzman, N. E. (2017). Comprehensive characterization by LC-DAD-MS/MS of phenolic composition of seven *Quercus* leaf teas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 38-46.

Gavahian, M., & Farahnaky, A. (2018). Ohmic-assisted hydrodistillation technology: A review. *Trends in Food Science &Technology*, 72, 153-161.

Geana, E. I., Ciucure, C. T., Tamaian, R., Marinas, I. C., Gaboreanu, D. M., Stan, M., & Chitescu, C. L. (2023). Antioxidant and Wound Healing Bioactive Potential of Extracts Obtained from Bark and Needles of Softwood Species. *Antioxidants*, 12(7), 1383-1420.

George, M. J., Sichilongo, K. F., Ramabulana, T., Madala, N. E., & Dubery, I. A. (2019). Comparison of soxhlet and reflux techniques for extraction and characterisation of potential endocrine-disrupting compounds from solid waste dumpsite soil. *Environ. Monit Assess*, 191(3), 149-160.

Geramitcioski, T., Mitrevski, V., & Mijakovski, V. (2018). Design of a small press for extracting essential oil according VDI 2221. *IOP Conference Sseries: Materials Science and Engineering*, 393(1), 012131.

Ghosh, D., & Konishi, T. (2007). Anthocyanins and anthocyanin-rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pacific Journal Clinic Nutrition*, 16(2), 200-208.

Gilmore, M., Swadzba-Kwasny, M., & Holbrey, J. D. (2019). Thermal Properties of Chloride/Urea System Sstudied under Moisture-Free Atmosphere. *Journal of chemical & engineering data*, 64(12), 5248-5255.

Giusti, M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of antocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, Inc*., Hoboken, F1.2.1.-F1.2.13.

Gonzalez-Rivera, J., Pelosi, C., Pulidori, E., Duce, C., Tine, M. R., Ciancaleoni, G., & Bernazzani, L. (2022). Guidelines for a correct evaluation of Deep Eutectic Solvents thermal stability. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 100333.

Gönültaş, O., & B. Uçar, M. (2017). Doğu ladini (*Picea orientalis*) ve meşe (*Quercus* spp.) kabuklarının kimyasal bileşimi. *Turkish Journal of Forestry*, 18(4), 321-327.

Guntero, V. A., Mancini, P. M., & Kneeteman, M. N. (2017). Introducing Organic Chemistry Students to the Extraction of Natural Products Found in Vegetal Species. *World Journal of Chemical Education*, 5(4), 142-147.

Guo, Z., Ling, Z., Wang, C., Zhang, X., & Xu, F. (2018). Integration of facile deep eutectic solvents pretreatment for enhanced enzymatic hydrolysis and lignin valorization from industrial xylose residue. *Bioresource Technology*, 265(10), 334-339.

Gupta, D., Bhardwaj, R., & Gupta, R. K. (2011). In Vitro Antioxidant Activity of Extracts from The Leaves of *Abies pindrow* Royle. *Afr. J. Tradit Complement Altern Med.*, 8(4), 391-397.

Gülçin, İ. (2006). Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology*, 217(2-3), 213-220.

Güllüce, M., Adıgüzel, A., Öğütçü, H., Şengül, M., Karaman, İ., & Şahin, F. (2004). Antimicrobial Effects of Quercus ilex L. Extract. *Phytotherapy Research*, 18(3), 208-211.

Güzel, M., & Akpınar, Ö. (2019). Meyve ve Sebze Kabuklarının Fitokimyasal ve Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(4), 768-780.

Hafızoğlu, H. (1983). Ormandaki Kesim Artıklarından Yararlanma Olanakları, KTÜ Orman Fakültesi Ders Notları.

Hagerman, A. E. (2012). Fifty years of polyphenol-protein complexes. *Recent Advances in Polyphenol Research*, 3, 71-97.

Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health. *Cardiovascular Research*, 73(2), 341-347.

Hamad, A. M. A., Ateş, S., Olgun, Ç., & Gür, M. (2019). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Some Industrial Tree Bark Extracts. *Bioresources* 14(3), 5657-5671.

Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. International Centre for Science and High Technology, Trieste.

Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., & Doherty, B. W. (2021). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem. Rev.*, 121(3), 1232–1285.

Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., & Hamdi, M. (2007). The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian Quercus coccifera L. and Juniperus phoenicea L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105(3), 1126-1134.

H. Johari, S. N., F. Rahiman, M. H., Adnan, R., & Tajjudin, M. (2020). Real-time IMC-PID control and monitoring of Essential oil Extraction process using loT. *In Proceedings of the 2020 IEEE International Conference on Automatic Control and Intelligent Systems (12CASIS)*, 51-56, Malaysia.

Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Jounal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.

Heemken, O. P., Theobald, N., & Wenclawiak, B. W. (1997). Comparison of ASE and SFE with Soxhlet, sonication, and methanolic saponification extractions for the determination of organic micropollutants in marine particulate matter. *Analytical Chemistry*, 69(11), 2171-2180.

Hiranvarachat, B., & Devahastin, S. (2014). Enhancement of microwave-assisted Extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*, 126, 17-26.

Ho, K. Y., Tsai, C. C., Huang, J. S., Chen, C. P., Lin, T. C., & Lin, C. C. (2001). Antimicrobial activity of tannin components from Vaccinium vitis-idaea L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(2), 187-191.

Hofmann, T., Nebehaj, E., Stefanovits-Banyai, E., & Albert, L. (2015). Antioxidant capacity and total phenol of beech (Fagus sylvatica L.) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 77, 375-381.

Horozic, E., Zukic, A., Kolarevic, L., Bjelosevic, D., Ademovic, Z., Saric-Kundalic, B., Husejnagic, D., Kudumovic, A., & Hamzic, S. (2019). Evaluation of

antibacterial and Antioxidant activity of methanol needle extracts of Larix Decidua Mill., Picea Abies (L) H. Karst. and Pinus Nigra J. F. Arnold. *Technics Technologies Education Management*, 14(1), 14-19.

Hosseinimehr, S. J., Pourmorad, F., Shahabimajd, N., Shahrbandy, K., & Hosseinzadeh, R. (2007). In vitro Antioxidant Activity of Polygonium hyrcanicum, Centaurea depressa, Sambucus ebulus, Mentha spicata and Phytolacca americana. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(4), 637-640.

Hussain, M. K., Saquib, M., & Khan, M. F. (2019). Techniques for extraction, isolation, and standardization of bio-active compounds from medicinal plants. *In Natural Bio-active compounds* (pp. 179-200). Singapore: Springer.

Hyeusoo, K., Lee, B., & Yun, K. W. (2013). Comparison of chemical composition and Antimicrobial activity of Essential oils from three Pinus species. *Industrial Crops and Products*, 44, 323-329.

Ingle, K. P., Deshmukh, A. G., Padole, D. A., Dudhare, M. S., Moharil, M. P., & Khelurkar, V. C. (2017). Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(1), 32-36.

Ioannidis, K., Melliou, E., Alizoti, P., & Magiatis, P. (2016). Identification of black pine (Pinus nigra Arn.) heartwood as a rich source of bioactive stilbenes by qNMR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6), 1708-1716.

Itoh, A., Isoda, K., Kondoh, M., Kawase, M., Watari, A., Kobayashi, M., Tamesada, M., & Yagi, K. (2010). Hepatoprotective effect of syringic acid and vanilic acid on CCl4-induced liver injury. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(6), 983-987.

İbrahim, R. K., Hayyan, M., AlSaadi, M. A., İbrahim, S., Hayyan, A., & Hashim, M. A. (2019). Physical properties of ethylene glycol-based deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 794–800.

İkinci, A., Dursun, E., &Karaoğul, E. (2021). Şanlıurfa'da yetiştirilen bazı nar (Punica granatum L.) çeşitlerinin fenolik bileşenleri ve antioksidan aktiviteleinin belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 31(3), 699-709.

İlhan, S., Savaroğlu, F., Çolak, F., Iscen, C. F., & Erdemgil, F. Z. (2006). Antimicrobial activity of Palustriella commutata (Hedw.) Ochyra extracts (Bryophyta). *Turk. J. Biol*, 30(3), 149-152.

İmer, Y., & Taşan, M. (2018). Çeşitli soğuk pres yağların bazı mikro ve makro element içeriklerinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi,* 15(1), 14-25.

İnce, A. E., Sahin, S., & Sumnu, G. (2014). Comparison of microwave and ultrasound-assisted extraction techniques for leaching of phenolic compounds from nettle. *J. Food Sci. Tech.*, 51(10), 2776-2782.

İskefiyeli, Z. (2014). Damlatma ile Yeni DPPH ve Frap Antioksidan Tayin Yontemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulanması. Doktora Tezi, *Karadeniz Teknik Universitesi*. Trabzon.

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Lcke, E., & Vivanco, J. M. (2003). Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Acimum Accessions. *Food Chem.*, 83(4), 547-550.

Jha, A. K., & Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science &Technology*, 119(8), 579-591.

Jimenez, M., Domínguez, J. A., Pascual-Pineda, L. A., Azuara, E., & Beristain, C. I. (2018). Elaboration and characterization of O/W cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) and black pepper (Piper nigrum) emulsions. *Food Hydrocolloids*, 77(1), 902-910.

Joubert, E., & Gelderblom, W. (2016). Value of antioxidant capacity as relevant assessment tool for "health benefits" of fruit-understated or inflated. *South African Journal of Clinical Nutrition*, 29(4), 4-6.

Kain, G., Barbu, M. C., Richter, K., Plank, B., Tondi, G., & Petutschnigg, A. (2015). Use of tree bark as insulation material. *Forest Products Journal*, 65(3-4), 16-25.

Kant, R., & Kumar, A. (2022). Review on Essential oil Extraction from aromatic and medicinal plants: Techniques, performance and economic analysis. *Sustainable Chemistry and Ppharmacy*, 30, 100829.

Karabaş, H. (2013). Soğuk pres ve solvent ekstraksiyon teknikleri ile üretilen aspir yağı ve aspir biyodizellerinin yağ ve yakıt özelliklerinin incelenmesi. *28. Ulusal Tarımsal Mekanizasyon Kongresi*, 30-36, Konya.

Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.

Karpinska, M., Borowski, J., & Danowska-Oziewicz, M. (2001). The use of natural antioxidants in ready-to-serve Food. *Food Chemistry*, 72(1), 5-9.

Kartal, M. (2007). Intellectual Property Protection in the Natural Product Drug Discovery, Traditional Herbal Mmedicine and Herbal Medicinal Products. *Pphytoyherapy Research*, 21(2), 113-119.

Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwaveassisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical analysis*, 13, 105–113.

Kaya, D., & Ergönül, P. G. (2015). Obtaining methods of volatile oils. *GIDA-Journal of Food*, 40(5), 303-310.

Kayano, S. I., Kikuzaki, H., Hashimoto, S., Kasamatsu, K., Ikami, T., & Nakatani, N. (2014). Glucosyl terpenates from the dried fruits of Prunus domestica *L*. *Phytochemistry Letters*, 8, 132-136.

Kellner, R. M. M., Otto, M., Valcarcel, M., & Widmer, H. M. (2004). Sample Preparation, in Analytical Chemistry: Modern Approach to Analytical Science. *Wiley* (pp. 506-508). Weinheim.

Khan, M. K., & Dangles, O. (2014). A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85-104.

Kılıç, A., & Ceylan, E. (2019). Applıcation of des (deep eutectic solvents) to wood extractives. *Wood Industry and Engineering*, 1(2), 52-56.

Kıvrak, İ., Kıvrak, Ş., Hharmandar, M., & Ççetindaş, Y. (2013). Phenolic Compounds of *Pinus brutia* Ten.: Chemical Investigation and Quantitative Analysis Using an Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry with Electrospray Ionization Source. *ACG publications*, 7(4), 313-319.

Kim, J. J., Ghimire, B. K., Shin, H. C., Lee, K. J., Song, K. S., Chung, Y. S., Yoon, T. S., Lee, Y., Kim, E., & Chung, III. (2012). Comparison of phenolic compounds content in indeciduous *Quercus* species. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(39), 5228-5239.

Kong, F. L., Zhang, M. W., Kuang, R. B., Yu, S. J., Chi, J. W., & Wei, Z. C. (2010). Antioxidant activities of different fractions of polysaccharide purified from pulp tissue of litchi (Litchi chinensis Sonn.). Carbohydrate Polymers, 81(3), 612-616.

Konovalova, O., Omelkovets, T., Sydora, N., Hurtovenko, I., Kalista, M., & Shcherbakova, O. (2023). Investigation of the Polyphenol Composition of Red Oak (Quercus rubra L.) Raw Materials. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 2(42), 75-81.

Kulkarni, S. G., & Vijayanand, P. (2010). Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (Passiflora edulis f. flavicarpa L.). *Food Science and Technology*, 43(7), 1026-1031.

Kumar, P., Yadav, D., Kumar, P., Panesar, P.S., Bunkar, D.S., Mishra, D., & Chopra, H.K. (2016). Comparative study on conventional, ultrasonication and microwave assisted extraction of γ-oryzanol from rice bran. *Journal of Food Science Technology*, 53(4), 2047-2053.

Kumar, A., Nirmal, P., Kumar, M., Jose, A., Tomer, V., Oz, E., Proestos, C., Zeng, M., Elobeid, T., & Oz, F. (2023). Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. *Molecules*, 28(2), 887-927.

Kutlu, N., Yılmaz, M. S., İşçi, A., & Şakıyan, Ö. (2021). Gıdalardan biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda derin ötektik çözücülerin kullanımı. *Niğde Ömer Halisdemir University Journal of Engineering Sciences*, 10(2), 591-597.

Küçüköner, E. (2006). Yeni ürün geliştirmede gıda katkı maddelerinin fonksiyonları ve önemi. *Gıda*, 31(3), 175-181.

Kürşat, M., & Erecevit, P. (2009). The antimicrobial activities of methanolic extracts of some lamiaceae members collected from Turkey. *Turkish Journal of Science and Technology*, 4(1), 81-85.

Kwon, G., Bandi, R., Yang, B., Park, C., Han, S., Park, J., Lee, E., Kim, N., & Lee, S. (2021). Choline chloride based deep eutectic solvents for the lignocellulose nanofibril production from Mongolian oak (Quercus mongolica). *Cellulose*, 28(14), 9169-9185.

Kwon, G., Yang, B., Park, C., Bandi, R., Lee, E., Park, J., Han, S., Kim, N., & Lee, S. (2020). Treatment Effects of Choline Chloride-based Deep Eutectic Solvent on the Chemical Composition of Red Pine (Pinus densiflora). *BioResources*, 15(3), 6457-6470.

Lapena, D., Lomba, L., Artal, M., Lafuente, C., & Giner, B. (2019). The NADES glyceline as a potential green solvent: a comprehensive study of its thermophysical properties and effect of water inclusion. *J Chem Thermodyn*, 128, 164–172.

Larçin, Ö., Körpe, D. A., İşeri, Ö. D., & Şahin, F. İ. (2015). Phenolic composition and antibacterial activity of crude methanolic Calendula officinalis flower extract against plant pathogenic bacteria. *IUFS Journal of Biology*, 74(1), 25-33.

Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds. *In Natural Products* (pp. 1543-1580). Berlin.

Lawrence, R., & Lawrence, K. (2011). Antioxidant activity of garlic Essential oil (Allium Sativum) grown in North Indian plains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), 51-54.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2013). Microwave-assisted extraction of antioxidants and food colors. *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds* (pp. 103-125). Boston, Springer.

Li, A. L., Hou, X. D., Lin, K. P., Zhang, X., & Fu, M. H. (2018). Rice straw pretreatment using deep eutectic solvents with different constituents molar ratios: Biomass fractionation , polysaccharides enzymatic digestion and solvent reuse. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 126(2), 139-272.

Li, T., Lyu, G., Liu, Y., Lou, R., Lucia, L. A., Yang, G., Chen, J., & Saeed, H. A. M. (2017). Deep Eutectic Solvents (DESs) for the Isolation of Willow Lignin (*Salix matsudana* cv. Zhuliu). *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2266-2276.

Li, G., Wang, X., Xu, Y., Zhang, B., & Xia, X. (2014). Antimicrobial effect and mode of action of chlorogenic acid on Staphylococcus aureus. *European Food Research and Technology*, 238(4), 589-596.

Li, C., & Xie, B. (2000). Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12), 6362-6366.

Liang, Q., Chen, H., Zhou, X., Deng, Q., Hu, E., Zhao, C., & Gong, X. (2017). Optimized microwave-assistant Extraction combined ultrasonic pretreatment of flavonoids from Periploca forrestii Schltr. and evaluation of its anti-allergic activity. *Electrophoresis*, 38(8), 1113-1121.

Liazid, A., Guerrero, R. F., Cantos, E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chem.*, 124(3), 1238-1243.

Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C. B., Plotsky, P. M., & Monteggia, L. M. (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *European Journal of Neuroscience*, 25(10), 3091-3098.

Liu, X., & Li, F. (2023). Microwave-assisted Extraction of bioactive components from Angelica dahurica using the tailor-made natural deep eutectic solvents. *Biomedical Chromatography, WILEY*, 37(8), e5639.

Liu, T., Sui, X., Li, L., Zhang, J., Liang, X., Li, W., & Zhang, H. (2016). Application of ionic liquids based enzyme-assisted extraction of chlorogenic acid from Eucommia ulmoides leaves. *Analytica Chimica Acta*, 903, 91-99.

Loizzo, M. R., Tundis, R., Chandrika, U. G., Abeysekera, A. M., Menichini, F., & Frega, N. G. (2010). Antioxidant and Antibacterial Activities on Foodborne Pathogens of Artocarpus heterophyllus Lam. (Mmoreceae) Leaves Extracts. *Journal of Food Science*, 75(5), 291-295.

Loow, Y. L., Wu, T. Y., Yang, G. H., Ang, L.Y., New, E. K., Siow, L. F., Jahim, J. M., Mohammad, A. W., & Teoh, W. H. (2018). Deep eutectic solvent and inorganic salt pretreatment of lignocellulosic biomass for improving xylose recovery. *Bioresource Technology*, 249, 818-825.

Lopez-Alarcon, C., & Denicola, A. (2013). Evaluating the Antioxidant capacity of natural Products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.

Lopez-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M. F., Ramirez-Rodriguez, V., & Herrera-Estrella, L. (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant science*, 160(1), 1-13.

Lundstedt, S., Van Bavel, B., Haglund, P., Tysklind, M., & Oberg, L. (2000). Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, 883(1-2), 151-162.

Luo, X., Wang, R., Wang, J., Li, Y., Luo, H., Chen, S., Zeng, X., & Han, Z. (2022). Acylation of Anthocyanins and Their Applications in the Food Industry: Mechanisms and Recent Research Advances. *Foods*, 11(14), 2166-2184.

Luque-Garcia, J. L., & De Castro, M. D. L. (2004). Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. *Talanta*, 64(3), 571-577.

Luthria, D. L., Biswas, R., & Natarajan, S. (2007). Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean. *Food Chemistry*, 105(1), 325-333.

Lv, P. C., Li, H. Q., Xue, J. Y., Shi, L., & Zhu, H. L. (2009). Synthesis and biological evaluation of novel luteolin derivatives as antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(2), 908-914.

Lynam, J. G., Kumar, N., & Wong, M. J. (2017). Deep eutectic solvents ability to solubilize lignin, cellulose, and hemicellulose; thermal stability; and density. *Bioresource Technology*, 238, 684-689.

Ma, X., & Yu, J. (2004). Formamide as the plasticizer for thermoplastic starch. *J. Appl. Polym. Sci.*, 93(4), 1769-1773.

Macchioni, F., Cioni, P. L., Flamini, G., Morelli, I., Maccioni, S., & Ansaldi, M. (2003). Chemical composition of Essential oils from needles, branches and cones of Pinus pinea, P. halepensis, P. pinaster and Pi nigra from central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(2), 139-143.

Machado, C. A., Oliveira, F. O., De Andrade, M. A., Saraiva Hodel, K. V., Lepikson, H., & Souza Machado, B. A. (2022). Steam distillation for essential oil extraction: An evaluation of technological advances based on ana analysis of patent documents. *Sustainability*, 14(12), 7119-7133.

Macovei, I., Luca, S. V., Skalicka-Wozniak, K., Horhogea, C. E., Rimbu, C. M., Sacarescu, L., Vochita, G., Gherghel, D., Ivanescu, B. L., Panainte, A. D., Nechita, C., Corciova, A., & Miron, A. (2023). Silver Nanoparticles Synthesized from Abies alba and Pinus sylvestris Bark Extracts: Characterization, Antioxidant, Cytotoxic and Antibacterial Effects. *Antioxidants*, 12(4), 797-821.

Maier, T., Schieber, A., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Residues of grape (Vitis vinifera L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem*, 112(3), 551-559.

Majekodunmi, S. O. (2015). Review of extraction of medicinal plants for pharmaceutical research. *Merit research journal of medicine and medical sciences*, 3(11), 521-527.

Mamashli, F., Badraghi, J., Delavari, B., Sabbaghian, M., Hosseini, M., & Saboury, A. A. (2019). Evaluation of Versatile Peroxidase's Activity and Conformation in the Presence of a Hydrated Urea Based Deep Eutectic Solvent. *Journal of Solution Chemistry*, 48(3-4), 689-701.

Mamilla, J. L. K., Novak, U., Grilc, M., & Likozar, B. (2019). Natural deep eutectic solvents (DES) for fractionation of waste lignocellulosic biomass and its cascade conversion to value-added bio-based chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 120(21), 417-425.

Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2008). Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. *J Pharm Biomed Anal.*, 46(2), 322–327

Maran, J. P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., & Sridhar, R. (2014). Microwave assisted extraction of pectin from waste Citrullus lanatus fruit rinds. *Carbohyd Polym*, 101, 786-791.

Martins, M. A. R., Pinho, S. P., & Coutinho, J. A. P. (2019). Insights into the nature of eutectic and deep eutectic mixtures. *J. Solution Chem.*, 48(7), 962-982.

Ming-Zhu, G., Qi, C., Li-Tao, W., Yao, M., Lian, Y., Yan-Yan, L., & Yu-Jie, F. (2020). A green and integrated strategy for enhanced phenolic compounds Extraction from mulberry (Morus alba L.) leaves by deep eutectic solvent. *Microchemical Journal*, 154, 104598.

Miranda, I., Gominho Mirra, I., & Pereira, H. (2012). Chemical characterization of barks from Picea abies and Pinus sylvestris after fractioning into different particle sizes. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 395-400.

Mockel, H. J., Welter, G., & Melzer, H. (1987). Correlation between Reversed-Phase Retention and Solute Molecular-Surface Type and Area .1. Theoretical Outlines and Retention of Various Hydrocarbon Classes. *Journal of Chromatography*, 388(2), 255-266.

Moein, S., Farzami, B., Khaghani, S., Moein, M. R., & Larijani, B. (2007). Antioxidant properties and prevention of cell cytotoxicity of Phlomis persica Boiss. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 83-88.

Mohammed, F. S., Karakaş, M., Akgül, H., & Sevindik, M. (2019). Medicinal Properties of Allium calocephalum Collected from Gara Mountain (Iraq). *Fresen. Environ. Bull.*, 28(10), 7419-7426.

Mohan, K., Ganesan, A. R., Ezhilarasi, P. N., Kondamareddy, K. K., Rajan, D. K., Sathishkumar, P., Rajarajeswaran, J., & Conterno, L. (2022). Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review. *Arbohydrate Polymers*, 287, 119349.

Mokaddem-Daroui, H., B. Mostefa, M., A. Öztürk, F., Erol, E., Öztürk, M., Ertaş, A., E. Duru, M., Kabouche, A., & Kabouche, Z. (2021). Antioxidant, anticholinesterase Activities and polyphenolic constituents of cones of algerian fir (*Abies numidica*) by LC-ESI-MS/MS with chemometric approach. *Journal of Research in Pharmacy* 25(3), 1-8.

Montalban, M. G., Bolivar, C. L., Guillermo Diaz Banos, F., & Villora, G. (2015). Effect of Temperature, Anion, and Alkyl Chain Length on the Density and Refractive Index of 1-Alkyl-3-methylimidazolium-Bbased Ionic Liquids. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 60(7), 1986-1996.

Moreno, E., Reza, J., & Trejo, A. (2007). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using water under subcritical conditions. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 27(4), 239-260.

Morgan, C. M. (2014). Investigating eutectic mixtures for poorly soluble compounds. KU ScholarWorks. Master Thesis, *Kansas University*. ABD.

Moyler, D. A. (1993). Extraction Of Essential Oils With Carbon Dioxide. *Flavour and Fragrance J.*, 8, 235- 247.

Mustafa, A., & Turner, C. (2011). Pressurized liquid extraction as a green approach in Food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta*, 703(1), 8-18.

Naczk, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1523-1542.

Nafchi, A. M., Moradpour, M., Saeidi, M., & Alias, A. K. (2013). Thermoplastic starches: Properties, challenges, and prospects. *Starch Staerke*, 65(1-2), 61–72.

Nagai, T., Myoda, T., & Nagashima, T. (2005). Antioxidative Activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) Equisetum arvense. *Food Chemistry*, 91(3), 389-394.

Niciforovic, N., & Abramovic, H. (2014). Sinapic acid and its derivatives: natural sources and bioactivity. Comprehensive Reviews. *Food Science and Food Safety*, 13(1), 34-51.

Nisca, A., Ştefanescu, R., Mocan, A., Babota, M., Nicolescu, A., Mare, A. D., Ciurea, C. N., Man, A., & Tanase, C. (2023). A Comparative Analysis of Polyphenol Content and Biological Potential of Quercus petraea Matt. And Q. pubescens Willd. Bark Extracts. *Forest*, 14(1), 116-129.

Nisca, A., Ştefanescu, R.,Moldovan, C., Mocan, A., Mare, A. D., Ciurea, C. N., Man, A., Muntean, D. L., & Tanase, C. (2022). Optimization of Microwave Assisted Extraction Conditions to Improve Phenolic Content and Iın Vitro Antioxidant and Anti-Microbial Activity in Quercus cerris Bark Extracts. *Plants*, 11(3), 240-251.

Nizamlıoğlu, M. N., & Nas, S. (2010). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1), 20-35.

Nunes, R. J., Saramago, B., & Marrucho, I. M. (2019). Surface tension of dl-menthol:octanoic acid eutectic mixtures. *J Chem Eng Data*, 64(11),4915-4923.

Olaiya, N. G., Oyekanmi, A. A., Hanafiah, M. M., Olugbade, T. O., Adeyeri, M. K., & Olaiya, F. G. (2022). Enzyme-assisted extraction of nanocellulose from textile waste: A review on production technique and applications. *Bioresource Technology Reports*, 19(8), 101183.

Olaru, O. T., Nitulescu, G. M., Ortan, A., & Dinu-Pirvu, C. E. (2015). Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of Anthriscus sylvestris as an alternative source for anticancer lignans. *Molecules*, 20(8), 15003-15022.

Oluwaseun, R. A., Nour, H. A., & Chinonso, I. U. (2018). Soxhlet extraction of phenolic compounds from Vernonia cinerea leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11, 12-17.

Omar, K. A., & Sadeghi, R. (2020). Novel benzilic acid-based deep-eutectic-solvents: Ppreparation and physicochemical Properties determination. *Fluid Phase Equilibria*, 522, 112752.

O'Neil, N. J., Scott, S., Relph, R., & Ponnusamy, E. (2021). Approaches to Incorporating Green Chemistry and Safety into Laboratory Culture. *Journal of Chemical Education*, 98(1), 84-91.

Oprescu, E. E., Enascuta, C. E., Radu, E., Ciltea-Udrescu, M., & Lavric, V. (2022). Does the ultrasonic field improve the Extraction productivity compared to classical methods – Maceration and reflux distillation? *Chemical Engineering and Processing – Process Intensification*, 179(6), 109082.

Osepchuk, J. M. (1984). AHistory of Microwave heating Applications. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 32(9), 1200-1224.

Ouyang, H., Hou, K., Wang, L., & Peng, W. (2017). Optimization Protocol for the Microwave-Assisted Extraction of Antioxidant Components from *Pinus elliottii* Needles Using Response Surface Methodology. *BioResources*, 12(1), 478-494.

Owczarek, K., Szczepanska, N., Płotka-Wasylka, J., Rutkowska, M., Shyshchak, O., Bratychak, M., & Namiesnik, J. (2016). Natural Deep Eutectic Solvents in Extraction Process. *Chemistry & Chemical Technology*, 10(4), 601-606.

Özbek, H. (2005). Cinsel ve Jinekolojik Sorunların Tedavisinde Bitkilerin Kullanımı. *Van Tıp Dergisi*, 12(2), 170-174.

Özdemir, H. (2010). Bark tannins from commercially important Turkish conifer trees and their use as adhesive in fiberboard. Ph.D. Thesis, 154 p., *Istanbul University*. İstanbul.

Öztürk, Y. E., A. Dömbekçi, H., & Ünal, S. N. (2020). Geleneksel Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Kullanımı. *Journal of Integrative and Anatolian Medicine*, 1(3), 23-35.

Parhiz, H., Roohbakhsh, A., Soltani, F., Rezaee, R., & Iranshahi, M. (2015). Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy Research*, 29(3), 323-331.

Park, C., Han, S., Park, J., Lee, E., Bandi, R., Dadigala, R., Kim, J., Kwon, G., Kim, N., & Lee, S. (2022). Deep Eutectic-like Solvent-Assisted Isolation of Llignin from Pinus densiflora and its Characteristics. *BioResources*, 17(4), 5600-5611.

Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2000). Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5331-5337.

Pasztory, Z., Mohacsine, I. R., Gorbacheva, G., & Börcsök, Z. (2016). The utilization of tree bark. *BioResources*, 11(3), 7859-7888.

Pawliszyn, J. (2003). Sample preparation: Quo Vadis? *Analytical Chemistry*, 75(11), 2543-2558.

Pawlowski, S. P., Sweeney, J. D., & Hilier, N. K. (2020). Electrophysiological Responses of the Beech Leaf-Mining Weevil, Orchestes fagi, to Seasonally-Variant Volatile Organic Compounds Emitted by American Beech, Fagus grandifolia. *Journal of Chemical Ecology*, 46(10), 935-946.

Pehlivan, M., & Sevindik, M. (2018). Antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia multicaulis*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 6(5), 628-631.

Perez-Jimenez, J., & Saura-Calixto, F. (2006). Effect of solvent and certain Food constituents on different antiioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39(7), 791-800.

Pfeifhofer, H. W. (1998). Composition of the Volatiles Obtained by Steam Distillation of Quercus Ilex L. Leaves. *Forest Genetics*, 5(2), 97-101.

Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004). Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 88(2), 201-207.

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97(31), 55-74.

Plotka-Wasylka, J., De la Guardia, M., Andruch, V., & Vilkova, M. (2020). Deep eutectic solvents vs ionic liquids: Similarities and differences. *Microchem. J.*, 159(29), 105539.

Poaty, B., Lahlah, J., Porqueres, F., & Bouafif, H. (2015). Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of seven Essential oils from the North American boreal forest. *World J. Microbiol Biotechnol*, 31(6), 907-919.

Polat, Ö., & Ötles, S. (1997). Esansiyel Yağların Ekstraksiyon Yöntemleri. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi B*, 15(1-2), 155-161.

Poljsak, B., Jamnik, P., Raspor, P., & Pesti, M. (2011). Oxidation-antioxidation-reduction processes in the cell: impacts of environmental pollution, in: N. Jerome (Ed.). *Encyclopedia of Environmental Health, Elsevier*, 300-306.

Poljsak, B., Suput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic Antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 1, 956792.

Procentese, A., Johnson, E., Orr, V., Garruta Campanile A., Wood, J. A., Marzocchella, A., & Rehmann, L. (2015). Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob. *Bioresource Technology*, 192, 31-36.

Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M. E., Rehmann, L., & Marzocchella, A. (2017). Low-energy biomass pretreatment with deep eutectic solvents for bio-butanol production. *Bioresource Technology*, 243, 464-473.

Procentese, A., Raganati, F., Olivieri, G., Russo, M. E., Rehmann, L., & Marzocchella, A. (2018). Deep Eutectic Solvents pretreatment of agro-industrial Food waste. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 37-48.

Pulatoğlu, A. Ö., Güney, K., Çeter, T., & Yılmaz, E. S. (2023). Chemical Composition of Essential Oils Obtained from Abies taxa in Türkiye and Investigation of Antimicrobial Activities. *Kastamonu Univ. Journal of Forestry Faculty*, 23(1), 31-46.

Qi, C., Ju-Zhao, L., Li-Tao, W., Yu-Fei, K., Yao, M., Jiao, J., & Yu-Jie, F. (2018). Sustainable deep eutectic solvents preparation and their efficiency in extraction and enrichment of main bioactive flavonoids from sea buckthorn leaves. *Journal of Cleaner Production*, 184, 826-835.

Radosevic, K., Bubalo, M. C., Srcek, V. G., Grgas, D., Dragicevic, T. L., & Redovnikavic, I. R. (2015). Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 46-53.

Radwan, M. N., Morad, M. M., Ali, M. M., & Wasfy, K. I. (2020). Extraction of peppermint volatile oil using a simple constructed steam distillation system. *Plant Archives*, 20(2), 1487-1491.

Ranic, M., Nikolic, M., Pavlovic, M., Buntic, A., Siler-Marinkovic, S., & Dimitrijevic-Brankovic, S. (2014). Optimization of microwave-assisted extraction of natural antioxidants from spent espresso coffee grounds by response surface methodology. *J Clean Prod*, 80(5), 69-79.

Rasul, M. G. (2018). Extraction, Isolation and Characterization of Natural Products from medicinal Plants. *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing (ijbsac)*, 2(6).

Raza, M. (2006). A role for physicians in ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(3), 297-301.

Razborsek, M. I., Ivanovic, M., Krajnc, P., & Kolar, M. (2020). Choline Chloride Based Natural Deep Eutectic Solvents as Extraction Media for Extracting Phenolic Compounds from Chokeberry (Aronia melanocarpa). *Molecules*, 25(7), 1619-1632.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Evans, C. R. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Reichardt, C. (1994). Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chem Rev.*, 94(8), 2319-2358.

Rempe, C. S., Burris, K. P., Lenaghan, S. C., & Stewart Jr, C. N. (2017). The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics. *Frontiers in Microbiology*, 8, 422-429.

Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A. Z., & Marrucho, I. M. (2015). Menthol-based eutectic mixtures: hydrophobic low viscosity solvents. *ACS Sust.Chem.Eng.*, 3(10), 2469-2477.

Richter, B. E., & Covino, L. (2000). New environmental applications of accelerated solvent extraction. *Lc Gc North America*, 18(10), 1068-1069

Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., & Pohl, C. (1996). Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.

Rodrigues, L. G. G., Mazzutti, S., Siddique, I., da Silva, M., Vitali, L., & Ferreira, S. R. S. (2020). Subcritical water extraction and microwave-assisted extraction applied for the recovery of bioactive components from Chaya (Cnidoscolus aconitifolius Mill.) *The Journal of Supercritical Fluids*, 165, 104976.

Romero-Rodriguez, M. C., Archidona-Yuste, A., Abril, N., Gil-Serrano, A. M., Meijon, M., & Jorrin-Novo, J. V. (2018). Germination and Early Seedling Development in *Quercus ilex* Rrecalcitrant and Non-dormant Seeds: Targeted Transcriptional, Hormonal, and Sugar Alaysis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1508-1521.

Rosarine, D., Narawangsa, D. R., Chandra, N. S. R., Sari, E., & Hermansyah, H. (2022). Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) Method Using Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) to Increase Curcuminoid Yield from Curcuma longa L., Curcuma xanthorrhiza, and Curcuma manga Val. *Molecules*, 27(18), 6080-6091.

Rostagno, M. A., Villares, A., Guillamon, E., Garcia-Lafuente, A., & Martinez, J. A. (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216(1), 2-29.

Routray, W., & Orsat, V. (2012). Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food Bioprocess Tech.*, 5(2), 409-424.

Sadeghi, M., Zolfaghari, B., Jahanian-Najafabadi, A., & Abtahi, S. R. (2016). Anti-pseudomonas activity of Essential oil, total extract, and proanthocyanidins of *Pinus eldarica* Medw. bark. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(1), 58-64.

Sağlam, A. (2021). Phytolacca americana L. Bitkisinin Farklı Habitatlardaki Bazı Ekolojik ve Kimyasal Parametrelerinin Karşılaştırılması Yüksek lisans tezi, 112, *Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.* Ordu.

Samaram, S., Mirhosseini, H., Tan, C. P., & Ghazali, H. M. (2014). Ultrasound-assisted extraction and solvent extraction of papaya seed oil: Crystallization and thermal behavior, saturation degree, color and oxidative stability. *Ind Crops Prod*, 52, 702-708.

Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Food*, 3(4), 229-254.

Samy, P. R., & Gopalakrishnakone, P. (2010). Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine*, 7(3), 283-294.

Sanchez-Gutierrez, M., Gomez-Garcia, R., Carrasco, E., Bascon-Villegas, I., Rodriguez, A., & Pintado, M. (2022). *Quercus ilex* leaf as a functional ingredient: Polyhenolic profile and Antioxidant activity throughout simulated gastrointestinal digestion and Antimicrobial activity. *Journal of Functional Foods*, 91(12), 105025.

Santos-Buelga, C., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compoundnature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1094-1117.

Schijndel, J. V., Canalle, L. A., Smid, J., & Meuldijk, J. (2016). Conversion of syringaldehyde to sinapinic acid through knoevenagel-doebner condensation. *Scientific Research Publishing*, 6(4), 101-108.

Sekharan, T. R., Chandira, R. M., Tamilvanan, S., Rajesh, S. C., & Venkateswarlu, B. S. (2022). Deep eutectic solvents as an alternate to other harmful solvents. Biointerface Research in Applied Chemistry, 12(1), 847-860.

Seo, D. J., Jeon, S. B., Oh, H., Lee, B. H., Lee, S. Y., Oh, S. H., & Choi, C. (2016). Comparison of the antiviral activity of flavonoids against murine norovirus and feline calicivirus. *Food Control*, 60, 25-30.

Sepahpour, S., Selamat, J., Manap, M. Y. A., Khatib, A., & Razis, A. F. A. (2018). Comparative Analysis of Chemical Composition, Antioxidant Activity and Quantitative Characterization of Some Phenolic Compounds in Selected Herbs and Spices in Different Solvent Extraction Systems. *Molecules*, 23(2), 402-418.

Sert, M., Arslanoğlu, A., & Ballica, L. (2018). Conversion of sunflower stalk based cellulose to the valuable products using cholne chloride based deep eutectic solvents. *Renewable Energy*, 118, 993-1000.

Sevindik, M., Akgul, H., Pehlivan, M., & Selamoglu, Z. (2017). Determination of therapeutic potential of Mentha longifolia ssp. longifolia. *Fresen Environ Bull*, 26(7), 4757-4763.

Sevindik, M. (2018). Pharmacological Properties of Mentha Species. *J. Tradit. Med. & Clin. Natur*., 7(1), 259-263.

Sezik, E., Üstün, O., Demirci, B., & Başer, K. H. C. (2010). Composition of the Essential oils of *Pinus nigra* Arnold from Turkey. *Turk J. Chem.*, 34(2), 313-325.

Shaaban, B., Seeburger, V., Schroeder, A., & Lohaus, G. (2020). Sugar, amino acid and inorganic ion profiling of the honeydew from different hemipteran species feding on *Abies alba* and *Picea abies*. *Plos One*, 15(1), e0228171.

Shahbaz, K., Baroutian, S., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., & AlNashef, I. M. (2012). Densities of ammonium and phosphonium based deep eutectic solvents: prediction using artificial intelligence and group contribution techniques. *Thermochim Acta*, 527, 59-66.

Shang, X., Tan, J., Du, Y., Liu, X., & Zhang, Z. (2018). Environmentally-Friendly Extraction of Flavonoids from *Ccyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja Leaves with Deep Eutactic Solvents and Evaluation of Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 23(9), 2110-2122.

Sharba, Z. A., Hasoon, B. A., Maeah, R. K., & Hussein, N. N. (2020). Cytotoxicity, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Extract of Quercus Infectoria Plant. *Plant Archives*, 20(1), 227-230.

Sharma, K., Ko, E. Y., Assefa, A. D., Ha, S., Nile, S. H., Lee, E. T., & Park, S.W. (2015). Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. *Journal of food and drug analysis*, 23(2), 243-252.

Sharma, K., Mahato, N., & Cho, M. H. (2017). Converting citrus wastes into value-added Products: Economic and environmently friendly approaches. *Nutrition*, 34, 29-46.

Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., & Yehoshua, Y. (2013). Natural antioxidants: Function and sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4(6), 643-649.

Silva, B. A., Ferreres, F., Malva, J. O., & Dias, A. C. (2005). Phytochemical and antioxidant characteristics of Hypericum perforatum alcoholic extracts. *Food Chemistry*, 90(1-2), 157-167.

Simic, V. M., Rajkovic, K. M., Stojicevic, S. S., Velickovic, D. T., Nikolic, N. C., Lazic, M. L., & Karabegovic, I. T. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. *Sep. Purif. Technol.*, 160(2), 89-97.

Simoes, R., Miranda, I., & Pereira, H. (2022). The Influence of Solvent and Extraction Time on Yield and Chemical Selectivity of Cuticular Waxes from Quercus suber Leaves. *Processes*, 10(11), 2270-2281.

Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (Punicagranatum) Peel and Seed Extracts Using in Vitro Models. *J. Agric. Food Chem*, 50(1), 81-86.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-153.

Siongco, K. R., Leron, R. B., Caparanga, A. R., & Li, M. (2013). Molar heat capacities and electrical conductivities of two ammonium-based deep eutectic solvents and their aqueous solutions. *Thermochimica Acta*, 566, 50-56.

Sivam, A. S., Sun-Waterhouse, D., Quek, S., & Perera, C. O. (2010). Properties of bread dough with added fiber polysaccharides and phenolic antioxidants: a review. *Journal of Food Science*, 75(8), 163-174.

Skowyra, M., Falguera, V., Gallego, G., Peiro, S., & Almajano, M. P. (2014). Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (Caesalpinia spinosa) pods in vitro and in model food emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), 911-918.

Skrypnik, L., Grigorev, N., Michailov, D., Antipina, M., Danilova, M., & Pungin, A. (2019). Comparative study on radical scavenging activity and phenolic compounds content in water bark extracts of alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.), oak (*Quercus robur* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.). *european Journal of Wood and Wood Products*, 77(11), 879-890.

Skulcova, A., Hascicova, Z., Hrdlicka, I., Sima, J., & Jablonsky, M. (2018). Green Solvents Based on Choline Chloride for the Extraction of Spruce Bark (Picea abies). *CellUlose Chemistry and Technology*, 52(3-4), 171-179.

Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014) Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chem Rev.,* 114(21),11060-11082.

Song, Y., Han, A., Park, S., Cho, C., Rhee, Y., & Hong, H. (2020). Effect of enzyme-assisted extraction on the physicochemical properties and bioactive potential of lotus leaf polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 169-179.

Spigno, G., & De Faveri, D. M. (2009). Microwave-assisted Extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 210-217.

Standish, F. T. (1988). Impacts of Forest Harvesting on Physical Properties of soils with Reference to Increased Biomass Recovery a Review, Canadian Forestry Service, BCX-301, P:24.

Strati, I. F., Gogou, E., & Oreopoulou, V. (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 668-674.

Strlic, M., Radovic, T., Kolar, J., & Pihlar, B. (2002). Anti- and prooxidative properties of gallic acid in Fenton-type systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6313-6317.

Subhashini, S., Maleeka Begum, S. F., & Rajesh, G. (2016). Antimicrobial characterisation combining spectrophotometric analysis of different oak species. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(2), 32-35.

Sütçü, S. (2018). Sosyolojik Açıdan Alternatif Tıp Geleneği ve Uygulamaları: Isparta Örneği. Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Sosyoloji Anabilim Dalı*. Isparta.

Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting Properties of berry fruits: a review. *Plant Foods Hum Nutr.*, 63(4), 147-156.

Şahin, S. (2017). Geleneksel, tamamlayıcı, alternatif tıp uygulamalarına genel bir bakış. *Türk Aile Hek. Derg.*, 21(4), 159-162.

Şen, A., Miranda, I., Santos, S., Graça, J., & Pereira, H. (2010). The chemical composition of cork and phloem in the rhytidome of *Quercus cerris* bark. *Industrial Crops and Products*, 31(2), 417-422.

Şengezer, E., & Güngör, T. (2008). Esansiyel Yağlar ve Hayvanlar Üzerindeki Etkileri (Derleme). *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.*, 48(2), 101-110.

Şöhretoğlu, D., Ekizoğlu, M., Kılıç, E., & Sakar, M. K. (2009). Antibacterial and Antifungal Activities of Some *Quercus* Species Ggrowing in Turkey. *FABAD J. Pharm. Sci.*, 32(3), 127-130.

Ştefanescu, R., Ciurea, C. N., Mare, A. D., Man, A., Nisca, A., Nicolescu, A., Mocan, A., Babota, M., Coman, N. A., & Tanase, C. (2022). Quercus robur Older Bark - A Source of Polyphenolic Extracts with Biological Activities. *Applied sciences*, 12(22), 11738-11750.

Tadeo, J. L., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., & Garcia-Valcarcel, A. I. (2010). Application of ultrasound- assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2415-2440.

Taherzadeh, M., Haghbakhsh, R., Duarte, A. R. C., & Raeissi, S. (2020). Estimation of the heat capacities of deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, 307, 112940.

Tan, Y. T., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2019). Effect of functional groups in acid constituent of deep eutectic solvent for extraction of reactive lignin. *Bioresource Technology*, 281, 359-366.

Tanase, C., Berta, L., Coman, N. A., Roşca, I., Man, A., Toma, F., Mocan, A., Jakab-Farkas, L., Biro, D., & Mare, A. (2019). Investigation of In Vitro Antioxidant and Antibacterial Potential of Silver Nanoparticles Obtained by Biosynthesis Using Beech Bark Extract. *Antioxidants*, 8(10), 459-473.

Tanase, C., Mocan, A., Coşarca, S., Gavan, A., Nicolescu, A., Gheldiu, A., Vodnar, D., Muntean, D., & Ccrişan, O. (2019). Biological and Chemical Insights of Beech (*Fagus sylvatica* L.) Bark: A Source of Bioactive Compounds with Functional Properties. *Antioxidants*, 8(9), 417-430.

Tanase, C., Nicolescu, A., Nisca, A., Ştefanescu, R., Babota, M., Mare, A. D., Ciurea, C. N., & Man, A. (2022). Biological Activity of Bark Extracts from Northern Red Oak (Quercus rubra L.): An Antioxidant, Antimicrobial and Enzymatic Inhibitory Evaluation. *Plants*, 11(18), 2357-2370.

Tang, B., & Row, K. H. (2013). Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatsh Chem*, 144(10), 1427-1454.

Tang, B., Zhang, H., & Row, K. H. (2015). Application of deep eutectic solvents in the Extraction and separation of target compounds from various samples. *Journal of Separation Science*, 38(6), 1053-1064.

Tekçi, A. (2017). Araştırma Görevlisi Hekimlerin Geleneksel, Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp Uygulamları ile İlgili Bilgi ve Tutumları. Tıpta Uzmanlık Tezi, *Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı*. Diyarbakır.

Teo, C. C., Chong, W. P. K., & Ho, Y. S. (2013). Development and application of microwave assisted extraction technique in biological sample preparation for small molecule analysis. *Metabolomics*, 9(5), 1109-1128.

Thi Quynh Doan, N., & Brogger Christensen, S. (2015). Thapsigargin, origin, chemistry, structure-activity relationships and prodrug development. *Current Pharmaceutical Design*, 21(38), 5501-5517.

Thirugnanasambandham, K., Sivakumar, V., & Maran, J. P. (2014). Process optimization and analysis of microwave assisted extraction of pectin from dragon fruit peel. *Carbohyd Polym.*, 112, 622-626.

Thomas, M. J. (2000). The Role of Free Radicals and Antioxidants. *Nutrition*, 16(7/8), 716-718.

Tiring, G., Satar, S., & Özkaya, O. (2021). Sekonder Metabolitler. *Journal of Agricultural Faculty of Bursa Uludağ University*, 35(1), 203-215.

Tokaç, M. (2019). Geleneksel Tıbba Etik ve Hukuk Yönü ile Bakış. *Journal of BSHR*, 3, 155-160.

Tsubaki, S., Onda, A., Hiraoka, M., Fujii, S., Azuma, J. I., & Wada, Y. (2018). Microwave-Assisted Water Extraction of Carbohydrates From Unutilized Biomass. *Water Extraction of Bioactive Compounds* (pp. 199-219). Elsevier.

Tsubaki, S., Oono, K., Onda, A., Yanagisawa, K., & Azuma, J. I. (2013). Comparative decomposition kinetics of neutral monosaccharides by microwave and induction heating treatments. *Carbohyd Res.*, 375, 1-4.

Uçar, M. B., Uçar, G., & Özdemir, H. (2011). Chemical Characterization of Volatile Needle Oils from Anatolian Fir Species: Abies nordmanniana (Stev.) Mattf., A. bornmülleriana Mattf., A. equitrojani Aschers et Sint. and A. cilicica Carr.. *Journal of Essential Oil Research*, 22(6), 548-554.

Uğurlu, M., Üstü, Y., & Dağcıoğlu, B. F. (2016). Fitoterapide Soğan (*Bulbus Allii* Cepae) ve Sarımsak (*Bulbus Allii* Sativa) Kullanımı. *Ankara Med. J.*, 16(1), 119-122.

Usal, G. (2014). Buğday Tarlası Atıklarından Alkali Hidroliz ile Fenolik Maddelerin Üretimi ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. *Gazisosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Tokat.

Uslu, M. K., & Certel, M. (2006). Dielektrik ısıtma ve gıda işlemede kullanımı. *Teknolojik Araştırmalar GTED*, 3(1), 61-69.

Ünal, S., Bilgili, E., & Küçük, Ö. (2004). Karaçam Artıklarında Yangın Davranışı, G.Ü. B.A.P Projesi, 32/2003/05, Kastamonu.

Valvi, A., Dutta, J., & Tiwari, S. (2017). Temperature-dependent empirical parameters for polarity in choline chloride based deep eutectic solvents. *J. Phys. Chem. B.*, 121(50), 11356-11366.

Valencia-Aviles, E., Ggarcia-Perez, M. E., Garnica-Romo, Ma G., Figueroa-Cardenas, J. D., Melendez-Herrera, E., Salgado-Garciglia, R., & Martinez-Flores, H. E. (2018). Antioxidant Properties of Polyphenolic Extracts from *Quercus laurina*, *Quercus crassifolia* and *Quercus scytophylla* Bark. *Antioxidants*, 7(7), 81-91.

Varfalvyova, A., Kalyniukova, A., Tomaskova, I., Peskova, V., Pastierovic, F., Jirosova, A., Resnerova, K., Popelkova, D., & Andruch, V. (2023). Sugar-based natural deep eutectic solvent ultrasound-assisted Extraction for the determination of polyphenolic compounds from various botanical sources. *Microchemical Journal*, 194(6), 109249.

Velasquez, P., Bustos, D., Montenegro, G., & Giordano, A. (2021). Ultrasound-Assisted Extraction of Anthocyanins Using Natural Deep Eutectic Solvents and Their Incorporation in Edible Films. *Molecules*, 26(4), 984-998.

Verma, B., Hucl, P., & Chibbar, R. N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, 116(4), 947-954.

Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, I. C. F. R., & Ferreira, O. (2018). Enhanced extraction of phenolic compounds using choline chloride based deep eutectic solvents from Juglans regia L.. *Industrial Crops & Products*, 115, 261-271.

Villanueva, M., De Lamo, B., Harasym, J., & Ronda, F. (2018). Microwave radiation and protein addition modulate hydration, pasting and gel rheological characteristics of rice and potato straches. *Carbohydrate Polymers*, 201, 374-381.

Vincenzi, S., Tomasi, D., Gaiotti, F., Lovat, L., Giacosa, S., Torchio, F., Segade, S. R., & Rolle, L. (2016). Comparative study of the resveratrol content of twenty-one Italian red grape varieties. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34(1), 30-35.

Visioli, F., Galli, C., Plasmati, E., Viappiani, S., Hernandez, A., Colombo, C., & Sala, A. (2000). Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation*, 102(18), 2169-2171.

Vital, P. G., Lasco, J. R. N., Demigillo, J. M., & Rivera, W. L. (2010). Antimicrobial activity, cytotoxicity and phytochemical screening of Ficus septica Burm and Sterculia foetida L. leaf extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(1), 58-63.

Vurdu, H. (1983). Potential of Forest as an Animal Feed Supplement. *J. Forest Engineering*, 20, 23-28.

Vurdu, H. (1989). *Pinus nigra* Arnold Foliage, *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 2(2), 106-108.

Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505-515.

Wan, H. B., & Wong, M. K. (1996). Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 754(1-2), 43-47.

Wanasundara, U. N., & Shahidi, F. (1998). Antioxidant and prooxidant activity of green tea extracts in marine oils. *Food Chemistry*, 63(3), 335-342.

Wang, J. L., Cheng, F., & Zhu, P. X. (2014). Structure and properties of urea-plasticized starch films with different urea contents. *Carbohydr. Polym.*, 101, 1109-1115.

Wang, J. X., Xiao, X. H., & Li, G. K. (2008). Study of vacuum microwave-assisted Extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs. *Journal of Chromatography A.*, 1198-1199, 45-53.

Wang, S., Fan, C. Q., & Wang, P. (2015). Determination of ultra-trace organic acids in Masson pine (*Pinus massoniana* L.) by accelerated solvent Extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 981-982, 1-8.

Wang, W., Xiao, S., Li, L., & Gai, Q. (2023). Deep Eutectic Solvent-Based Microwave-Assisted Extraction for the Extraction of Seven Main Flavonoids from Ribes mandshuricum (Maxim.) Kom. Leaves. *Separations*, 10(3), 191-208.

Wang, Y., Xiao, X., & Li, G. (2008). Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs. *Journal of Chromatography A*, 1198-1199, 45–53.

Wang, Z., Caceres, L. A., Hossain, M. M., Abdallah, S. B., Ogbeide, O., Yao, Z., Renaud, J. B., & Scott, I. M. (2019). The Antioxidant and Enzyme Inhibitory Avtivity of Balsam Fir (Abies balsamea L. Mill.) Bark Solvent Extracts and Pyrolysis Oil. *Waste and Biomass Valorization*, 10(11), 3295-3306.

Wei, Z., Qi, X., Li, T., Luo, M., Wang, W., Zu, Y., & Fu, Y. (2015). Application of natural deep eutectic solvents for Extraction and determination of phenolics in Cajanus cajan leaves by ultra performance liquid chromatography. *Separation and Purification Technology*, 149, 237-244.

Weisburger, J. H. (2000). Eat to live, not live to eat. *Nutrition*, 16(9), 767-773.

Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., & Luo X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops. *Ultrasonics-Sonochemistry*, 48, 538-549.

Wu, Y., Liu, Z., Ma, L., Guo, Z., Yang, Q., Wang, X., & Hui, L. (2021). Structural characterization and evaluation of the Antioxidant activity of DES-Lignin isolation from Cunninghamla lanceolata. *Wood Science and Technology*, 55(4), 1041-1055.

Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X. (2013). Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8185-8190.

Yadav, P., & Malpathak, N. (2016). Estimation of Antioxidant Activity and Total Phenol, Flavonoid Content among Natural Populations of Caper (*Capparis moonii*, Wight) from Western Ghats Region. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 50(3), 495-501 .

Yao, X., Zhang, D., Duan, M., Cui, Q., Xu, W., Luo, M., Li, C., Zu, Y., & Fu, Yu. (2015). Preparation and determination of phenolic compounds from *Pyrola incarnata* Fisch. with a green polyols based-deep eutectic solvent. *Separation and Purification Technology*, 149, 116-123.

Yaşar, S., Beram, A., & Güler, G. (2017). Kermes Meşesi (*Quercus coccifera* L.) Odunu Fenolik Ekstraktifleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi Özel Sayı,* 1, 73-76.

Yeler, H. B. (2021). Kırmızı pancar ve üzüm kabuğundan farklı ekstraksiyon koşullarında boyar madde üretimi. Doktora Tezi. *Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı*, Denizli.

Yılmaz, F. M., Özer, P., & Görgüc, A. (2018). Mikrodalga teknolojisinin bitkisel dokulardan makro ve mikro bileşenlerin özütlenmesinde kullanımı. *Gıda/The Journal of Food*, 43(5), 765-775.

Yılmaz, F. (2019). Farklı Yörelerde Doğal Olarak Yetişen Kayın (Fagus orientalis L.) Ağacının Odun ve Kabuğunun Kimyasal Yapısı Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisan Tezi. *Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü*, Isparta.

Yi, J., Qu, H., Wu, Y., Wang, Z., & Wang, L. (2017). Study on antitumor, Antioxidant and immunoregulatory Activities of the purified Polyphenols from pinecone of *Pinus koraiensis* on tumor-bearing S180 mice in vivo. *International Journal of Biological Mmacromolecules*, 94, 735-744.

Yiğit, D., Yiğit, N., Aktaş, E., & Özgen, U. (2009). Ceviz (*Juglans regia* L.) Antimikrobiyal Aktivitesi. *Türk Mikrobiyal Cemiyeti Dergisi*, 39(1-2), 7-11.

Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186.

Yörük, N. G., & Danyer, E. (2016). Gıda Katkı Maddeleri Genel Bilgiler ve Tanımlar. *J. Food Hyg Technol Special Topics*, 2(2), 1-10.

Yue, Y., Huang, Q., Fu, Y., & Chang, J. A. (2020). Quick selection of natural deep eutectic solvents for the extraction of chlorogenic acid from herba artemisiae scopariae. *RSC Advances*, 10(39), 23403-23409.

Yusoff, I. M., Taher, Z. M., Rahmat, Z., & Chua, L. S. (2022). Areview of ultrasound-assisted Extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. *Food Research International*, 157(2), 111268.

Zadernowski, R., Czaplicki, S., & Naczk, M. (2009). Phenolic acid profiles of mangosteen fruits (*Garcinia mangostana*). *Food Chemistry*, 112(3), 685-689.

Zainal-Abidin, M. H., Hayyan, M., Hayyan, A., & Jayakumar, N. S. (2017). New horizons in the Extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Anal Chim Acta.*, 979, 1-23.

Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., & Jerome, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev*,. 41(21), 7108-7146.

Zhang, L., Gao, Y., Zhang, Y., Liu, J., & Yu, J. (2010). Changes in bioactive compounds and Antioxidant Activities in pomegranate leaves. *Scientia Horticulturae*, 123(4), 543-546.

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Mmedicine*, 13(1), 20-45.

Zhang, C. W., Xia, S. Q., & Ma, P. S. (2016). Facile pretreatment of lignocellulosic bio mass using deep eutectic solvents. *Bioresource Technology*, 219, 1-5.

Zhang, H., Zhao, H., Yao, L., Yang, X., Shen, S., Wang, J., Wang, Z., Regenstein, J. M., & Geng, L. (2017). Isolation, physicochemical properties, and in vitro Antioxidant activity of polysaccharides extracted from different parts of Pinus koraiensis. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 37(3), 225-240.

Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559.

Zou, P., Yang, X., Huang, W., Zhao, H., Wang, J., Xu, R., Hu, X., Shen, S., & Qin, D. (2013). Characterization and Bioactivity of Polysaccharides Obtained from Pine Cones of *Pinus koraiensis* by Graded Ethanol Precipitation. *Molecules*, 18(8), 9933-9948.

Zougagh, M., Valcarcel, M., & Rios, A. (2004). Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23(5), 399-405.

Zoyabed, S. M. A., Afreen, F., & Kozai, T. (2005). Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiol Biochem.*, 43(10-11), 977-984.

Xavier, V. B., Vargas, R. M. F., Cassel, E., Lucas, A. M., Santos, M. A., Mondin, C. A., Santarem, E. R., Astarita, L. V. & Sartor, T. (2011). Mathematical modeling for extraction of essential oil from Baccharis spp. by steam distillation. *Ind. Crop. Prod.*, 33(3), 599-604.

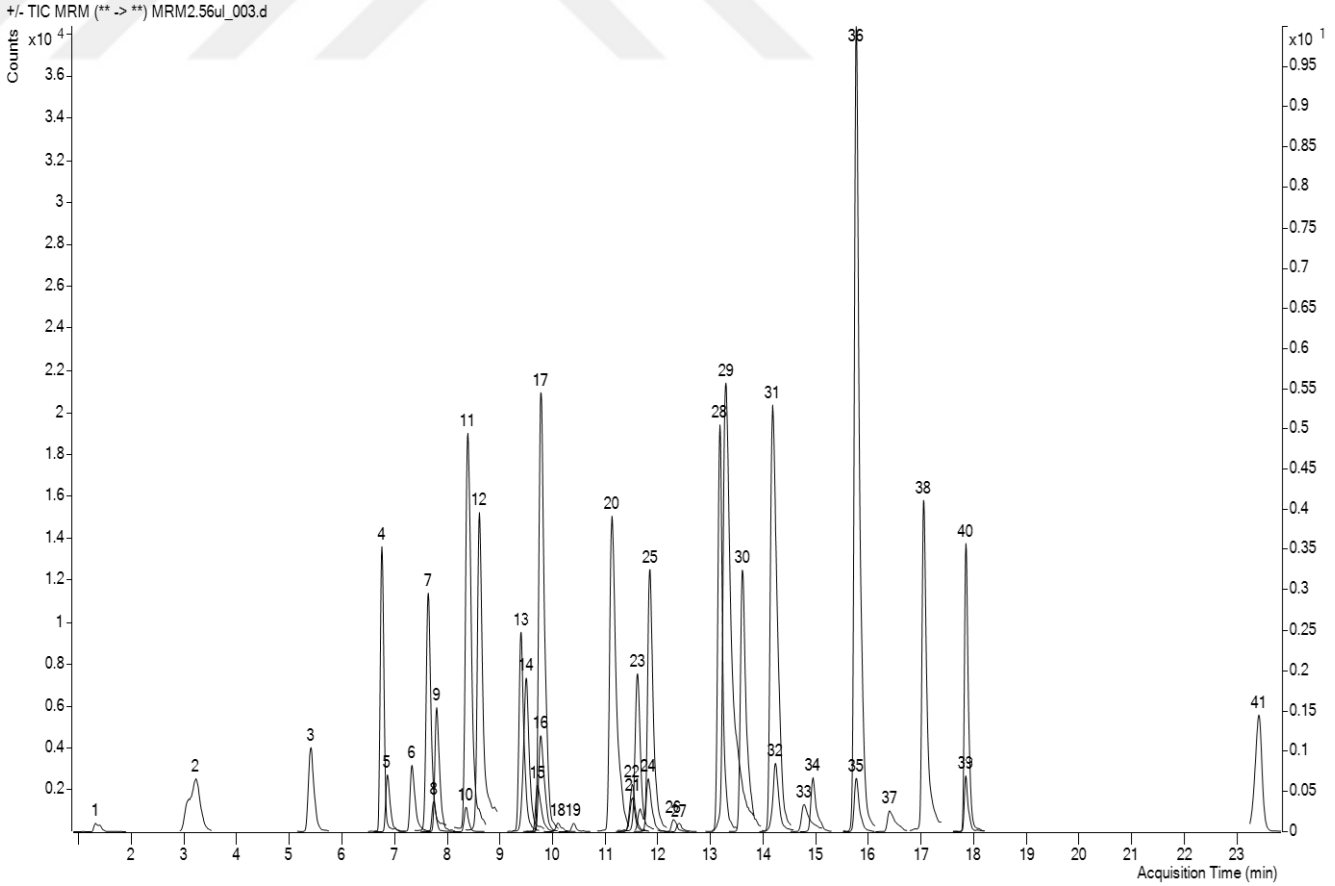
Xia, T., Zhang, C., Oyler, N. A., & Chen, X. (2013). Hydrogenated TiO2 nanocrystals: a novel microwave absorbing material. *Adv Mater*, 25(47), 6905-6910.

Xing, W., Xu, G., Dong, J., Han, R., & Ni, Y. (2018). Novel dihydrogen-bonding deep eutectic solvents: Pretreatment of rice straw for butanol fermentation featuring enzyme recycling and high solvent yield. *Chemical Engineering Journal*, 333, 712-720.

Xu, G. C., Ding, J. C., Han, R. Z. Dong, J. J., & Ni, Y. (2016). Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for bütanol fermentatio. *Bioresource technology*, 203, 364-369.

EKLER

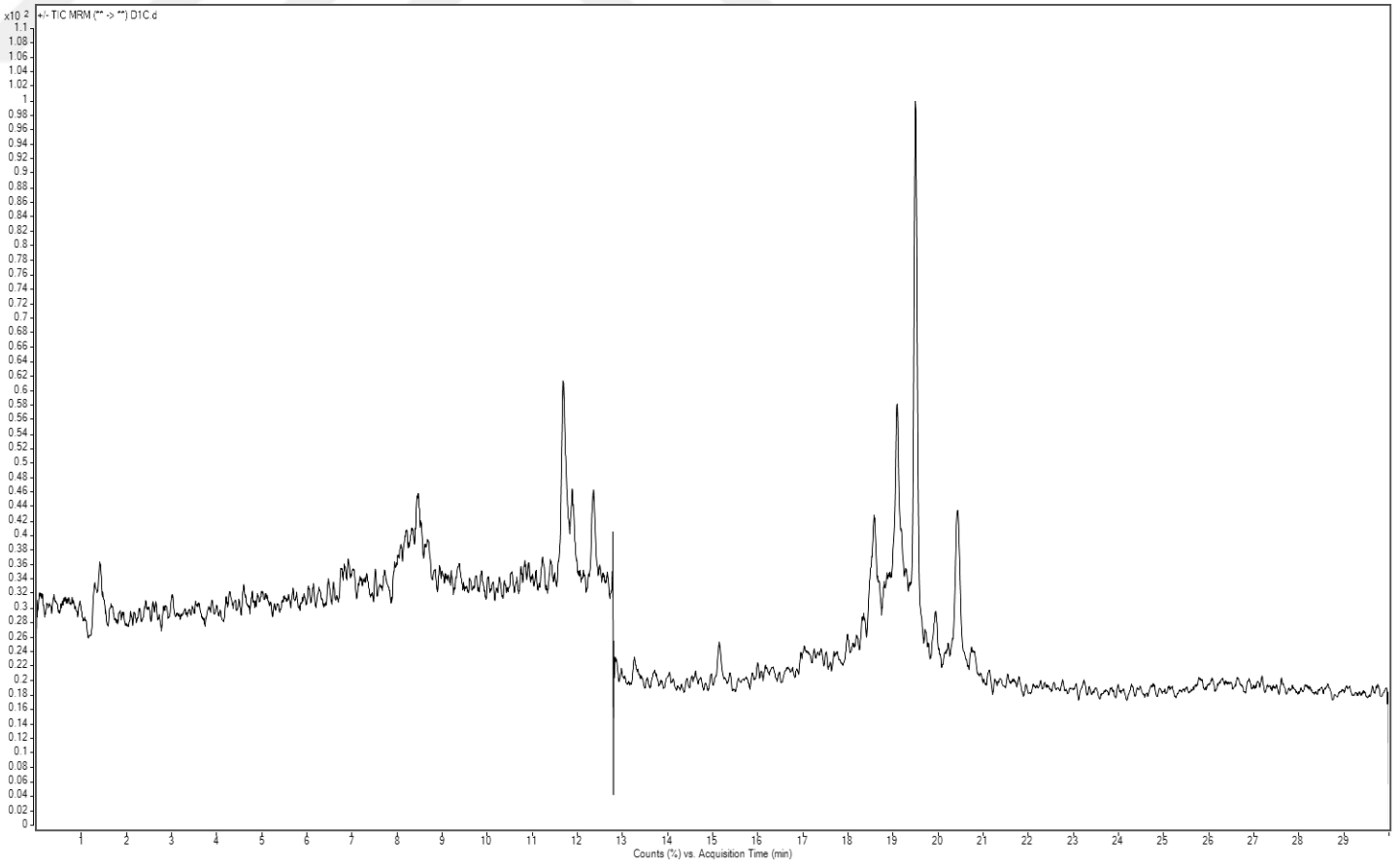
EK 1 Fenolik Bileşenler ve Kromatogram



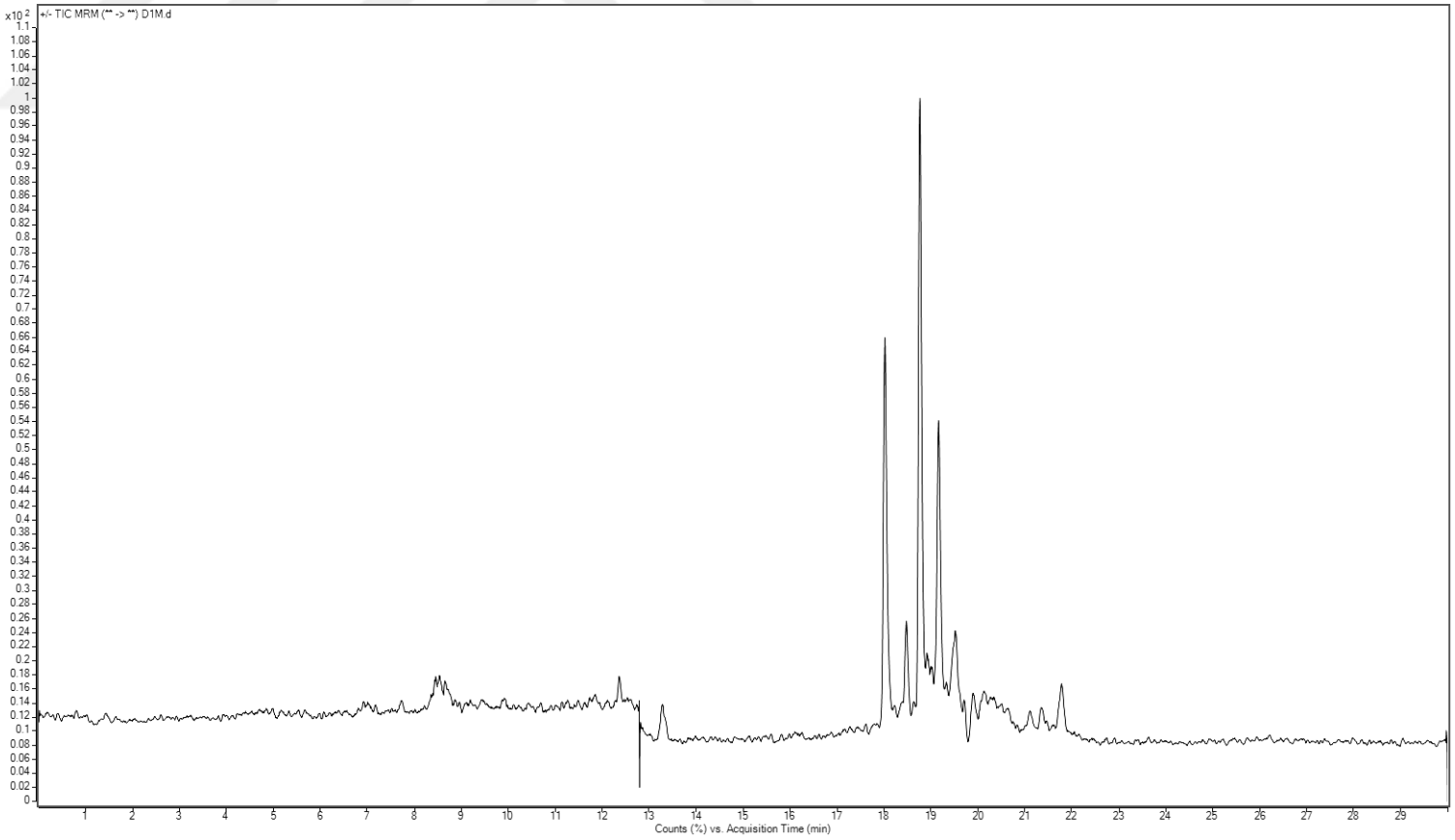
EK 1'in devamı Fenolik Bileşenler ve Kromatogram

	Bileşenler
1	Şikimik asit
2	Gallik asit
3	Protokatekuik asit
4	Epigallokateşin
5	Kateşin
6	Klorojenik asit
7	Hidroksibenzaldeid
8	Vanilik asit
9	Kafeik asit
10	Siringik asit
11	Kafein
12	Vanilin
13	o-kumarik asit
14	Salisilik asit
15	Taksifolin
16	Resveratrol
17	Polidatin
18	Trans-ferulik asit
19	Sinapik asit
20	Skutellarin
21	p-kumarik asit
22	Kumarin
23	Protokatehuik etil ester
24	Hesperidin
25	İzokersitrin
26	Rutin
27	Kuarsetin-3-ksilosid
28	Kaempferol-3-glukozit
29	Fisetin
30	Baicalin
31	Krizin
32	Trans-sinnamik asit
33	Kuersetin
34	Naringenin
35	Hesperetin
36	Morin
37	Kaempferol
38	Baicalein
39	Luteolin
40	Biyokanin A
41	Diosgenin

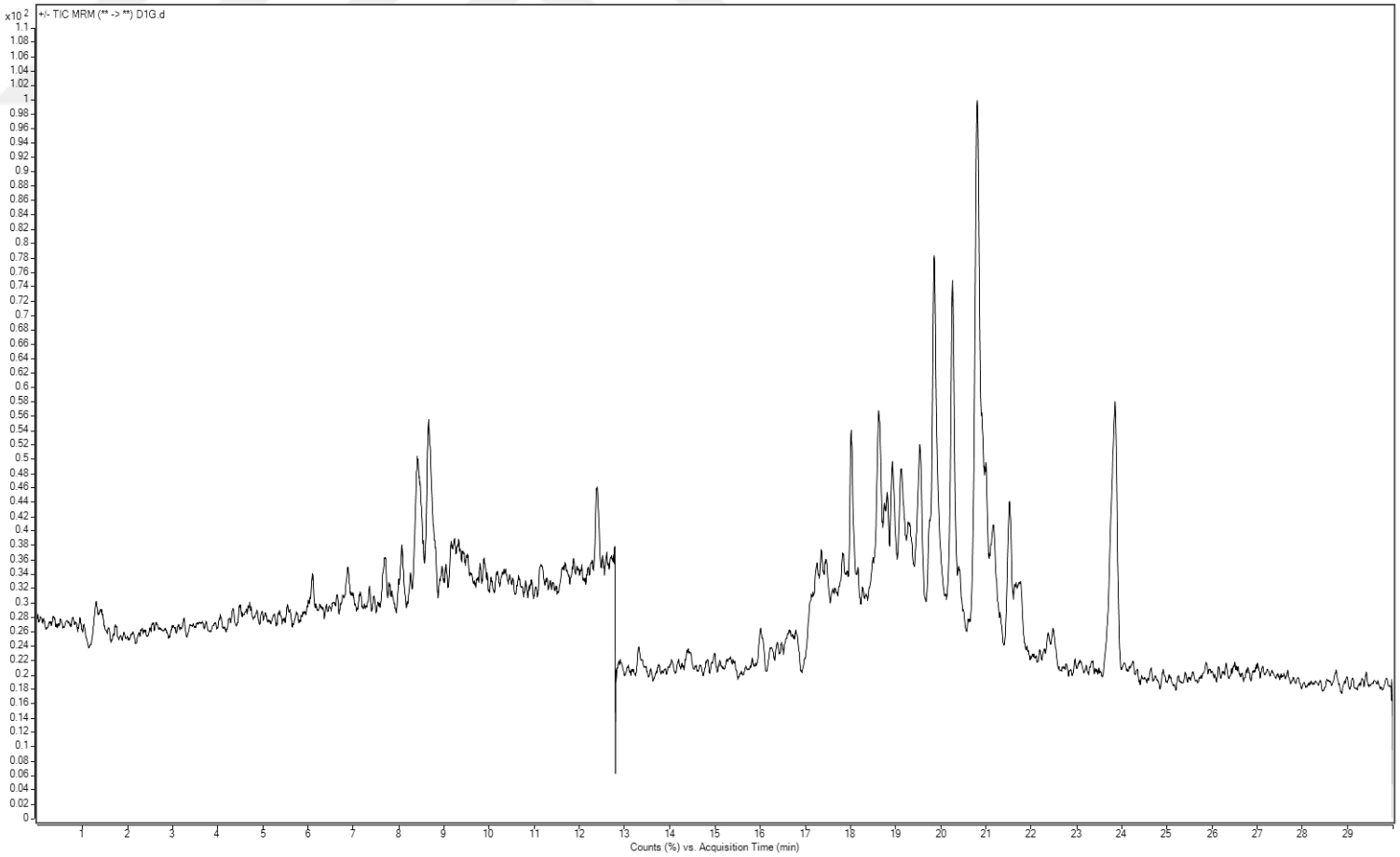
EK 2 Döç-1+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



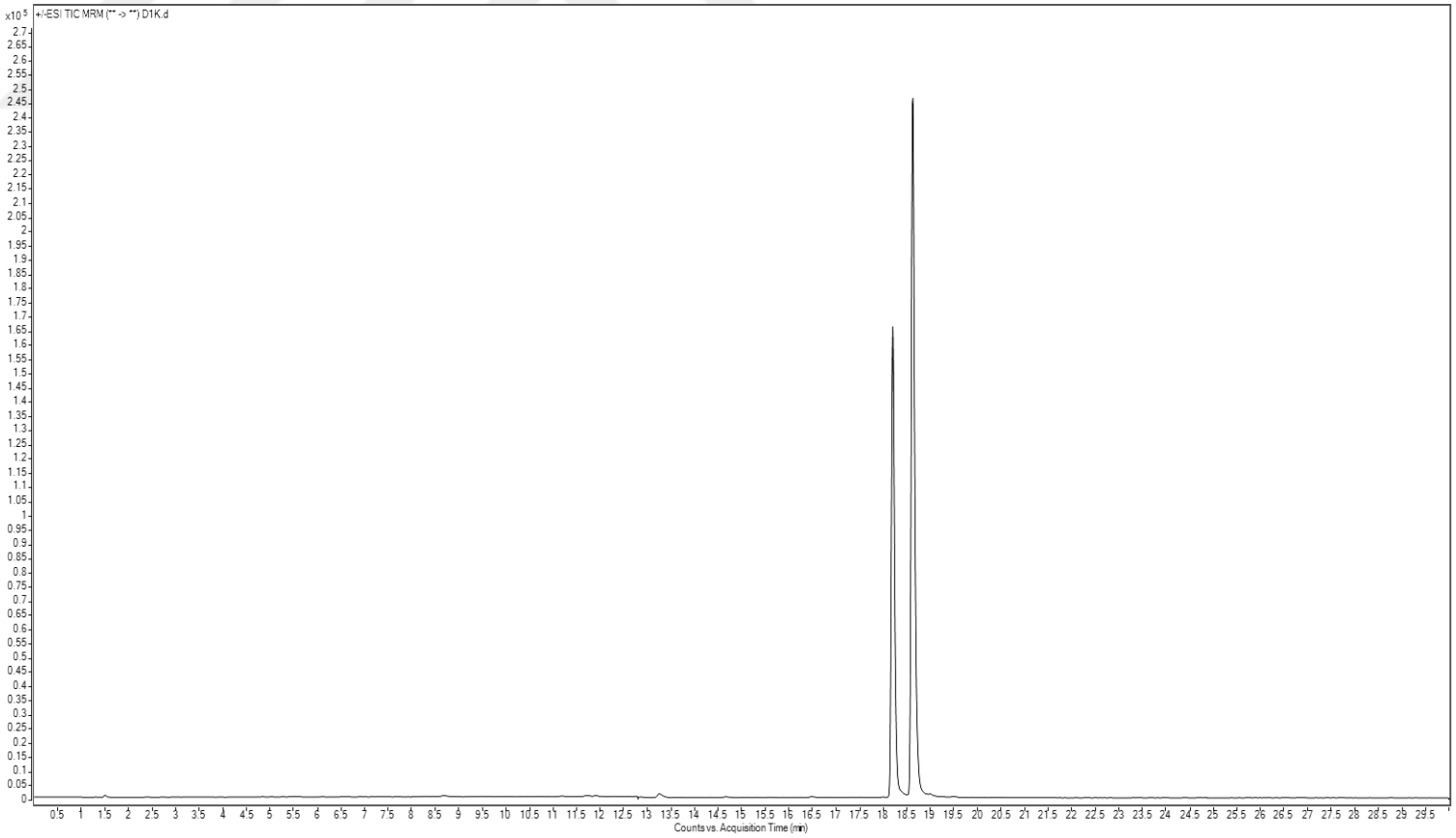
EK 3 Döç-1+M LC-MS/MS Kromatogramı



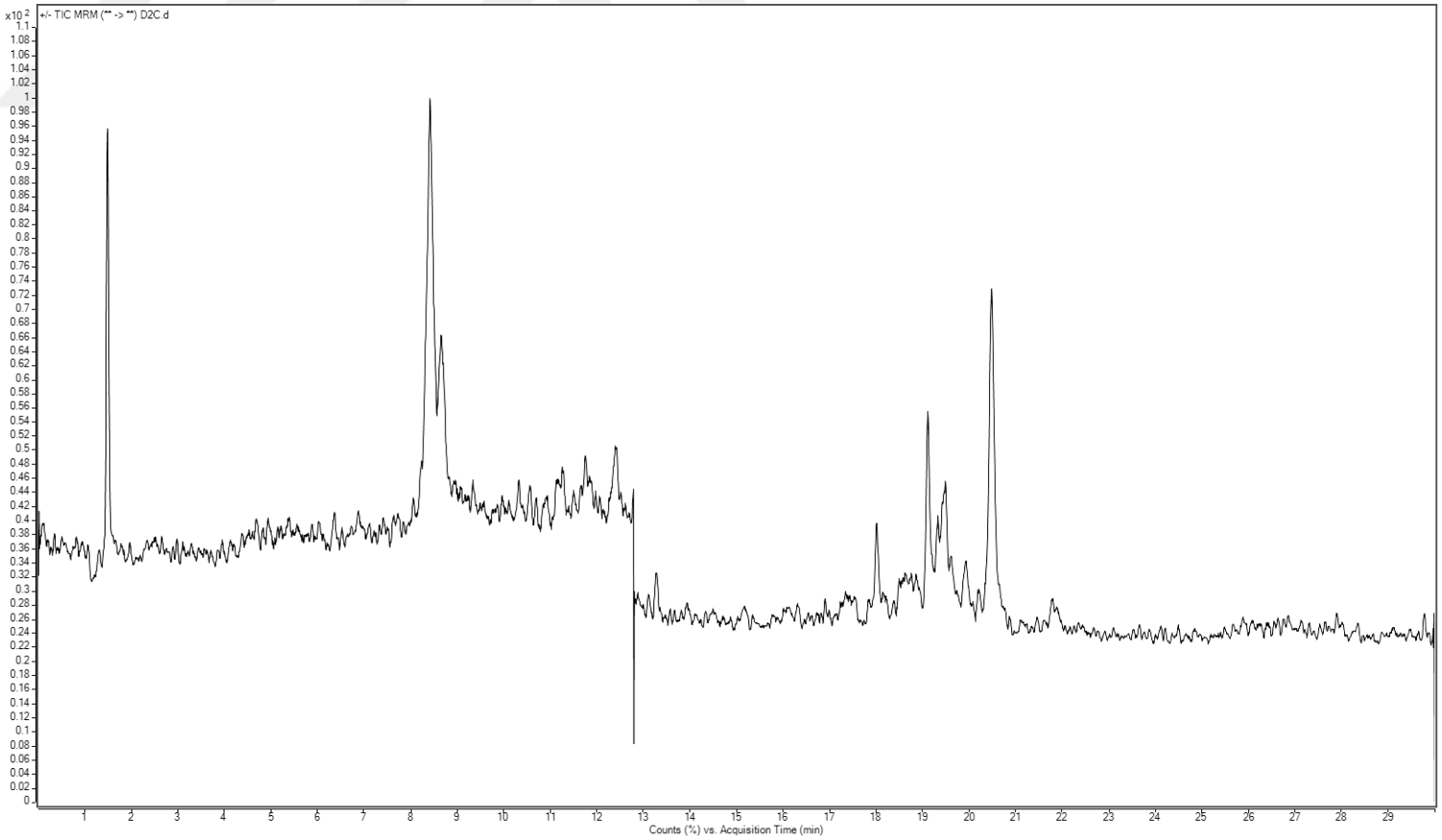
EK 4 Döç-1+G LC-MS/MS Kromatogramı



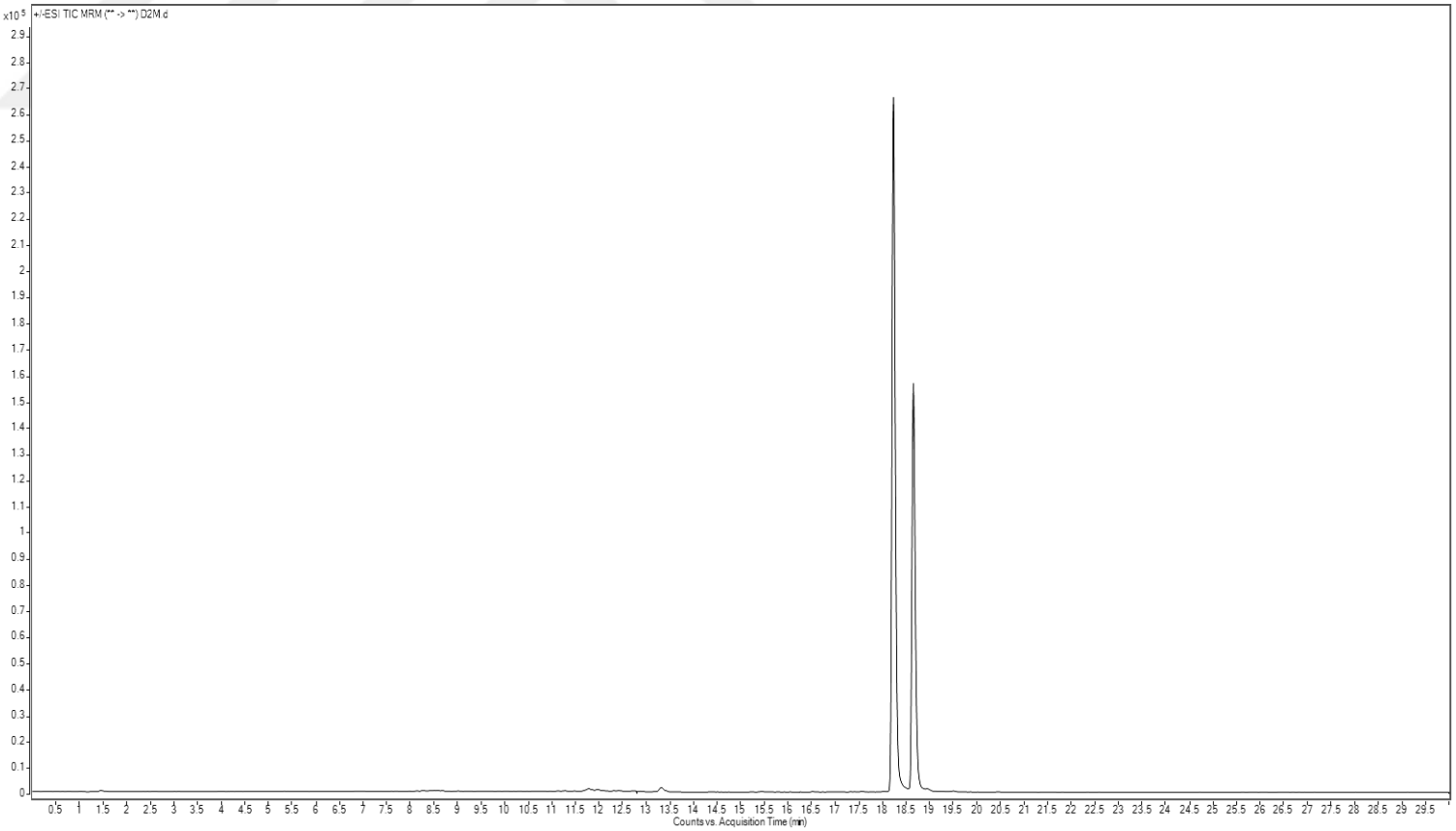
EK 5 Döç-1+K LC-MS/MS Kromatogramı



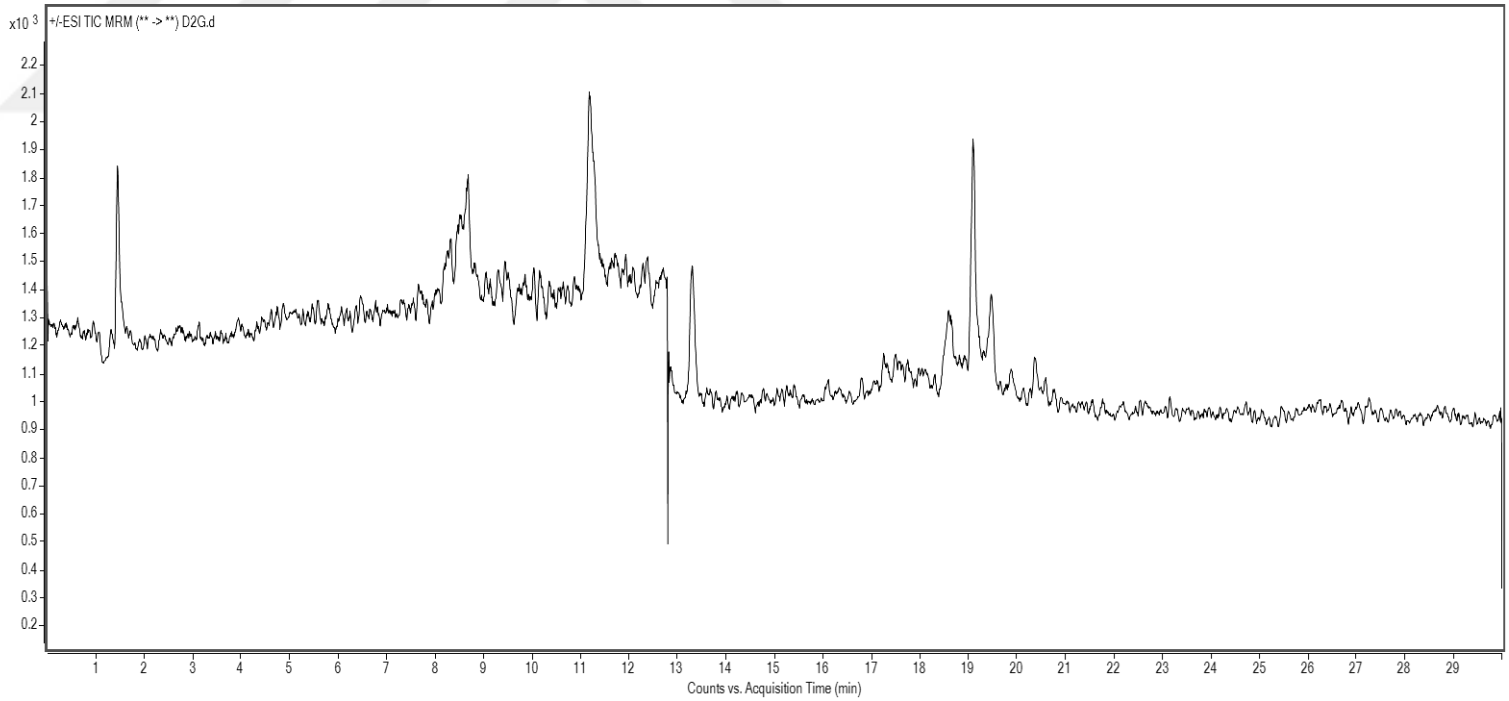
EK 6 Döç-2+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



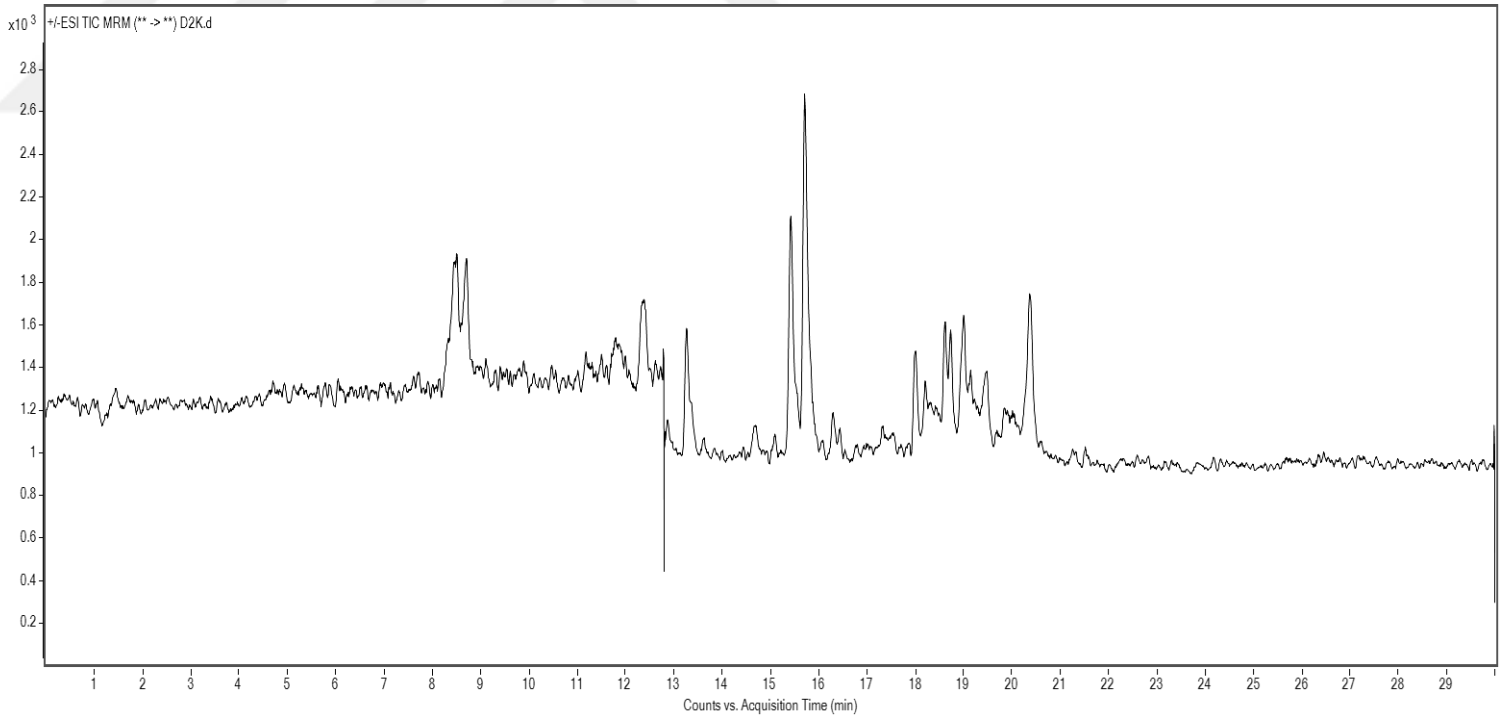
EK 7 Döç-2+M LC-MS/MS Kromatogramı



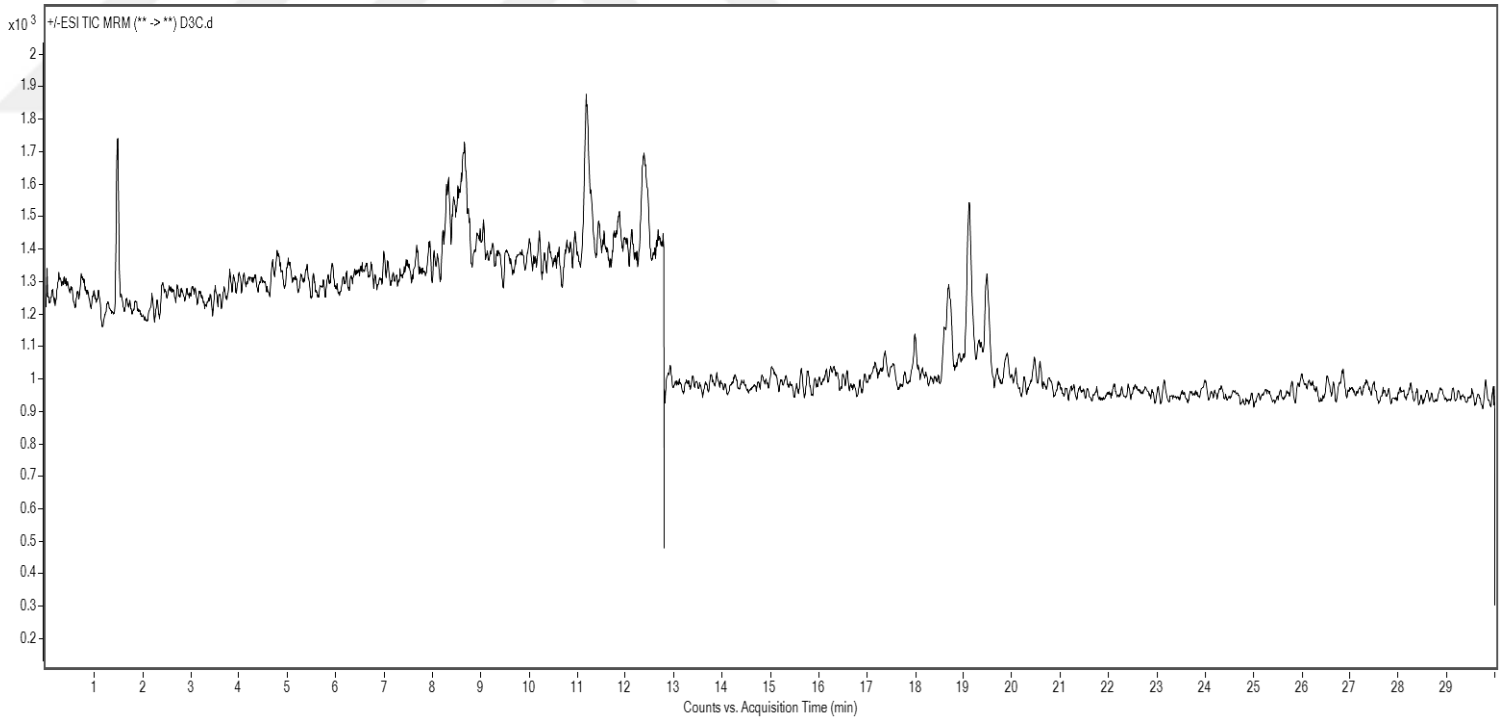
EK 8 Döç-2+G LC-MS/MS Kromatogramı



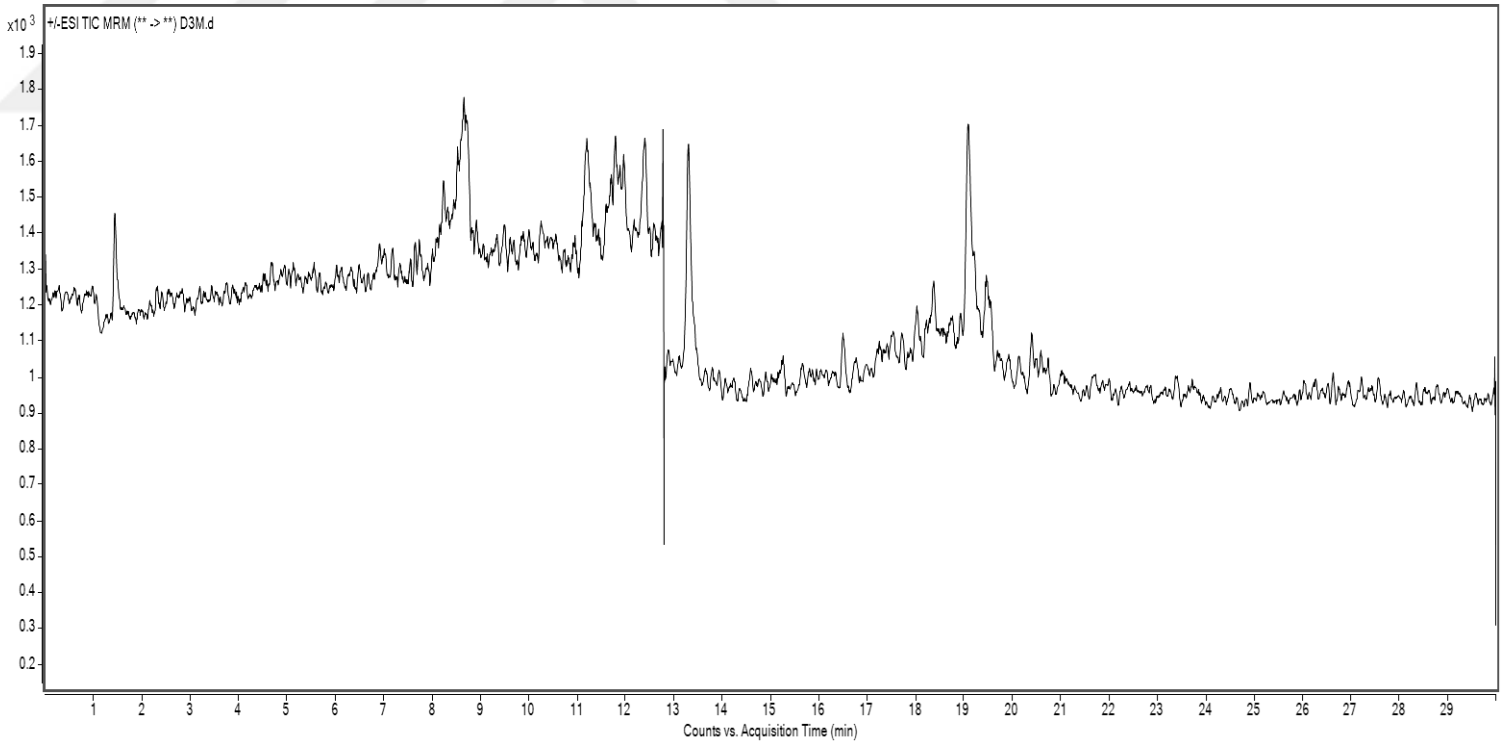
EK 9 Döç-2+K LC-MS/MS Kromatogramı



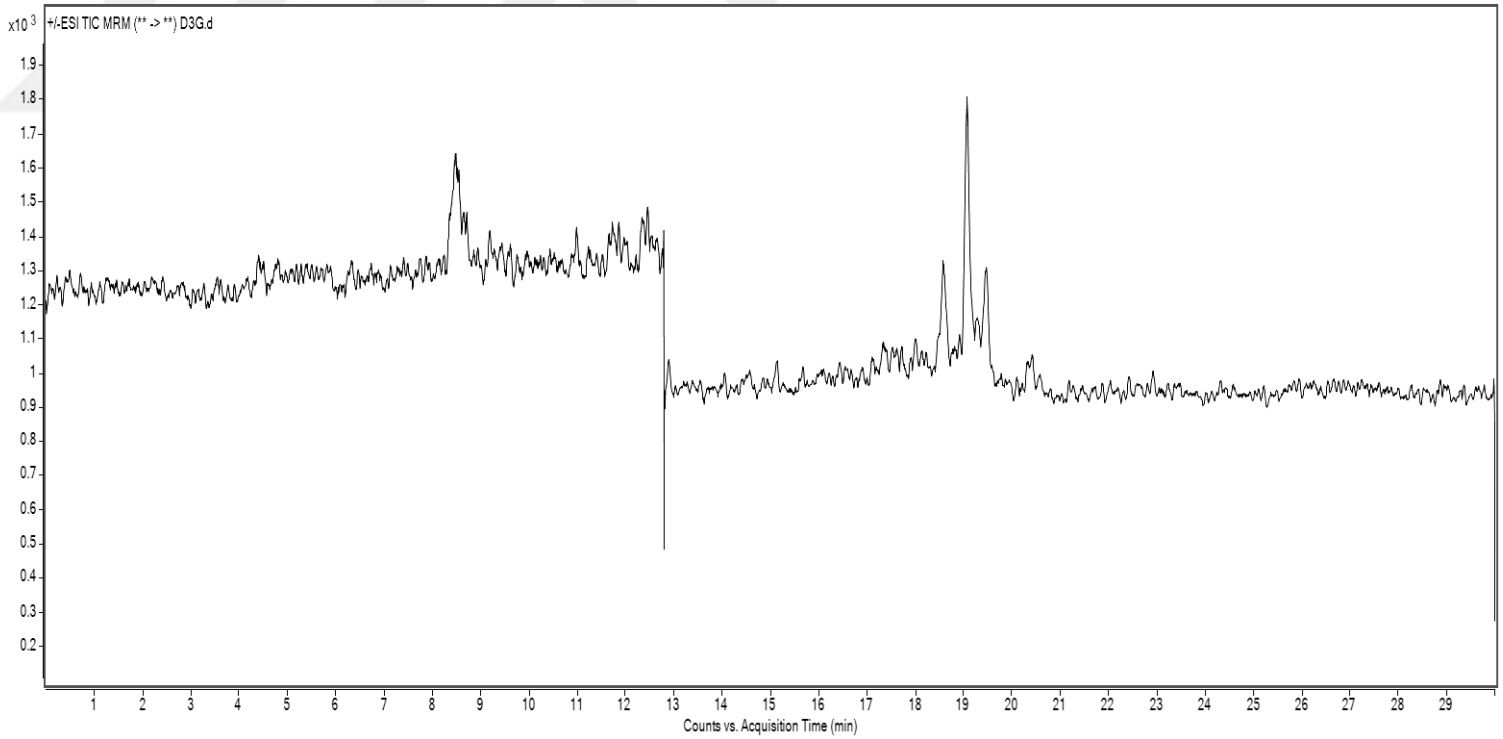
EK 10 Döç-3+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



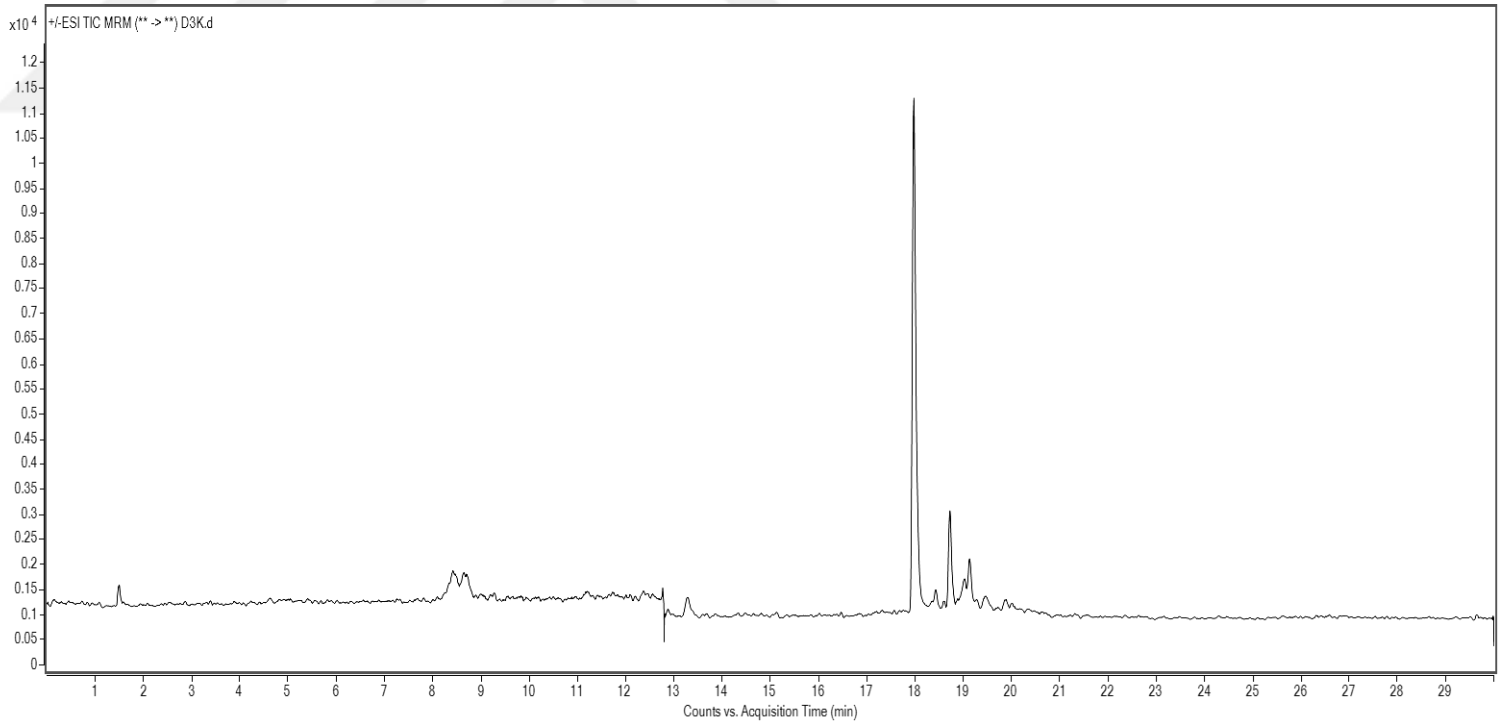
EK 11 Döç-3+M LC-MS/MS Kromatogramı



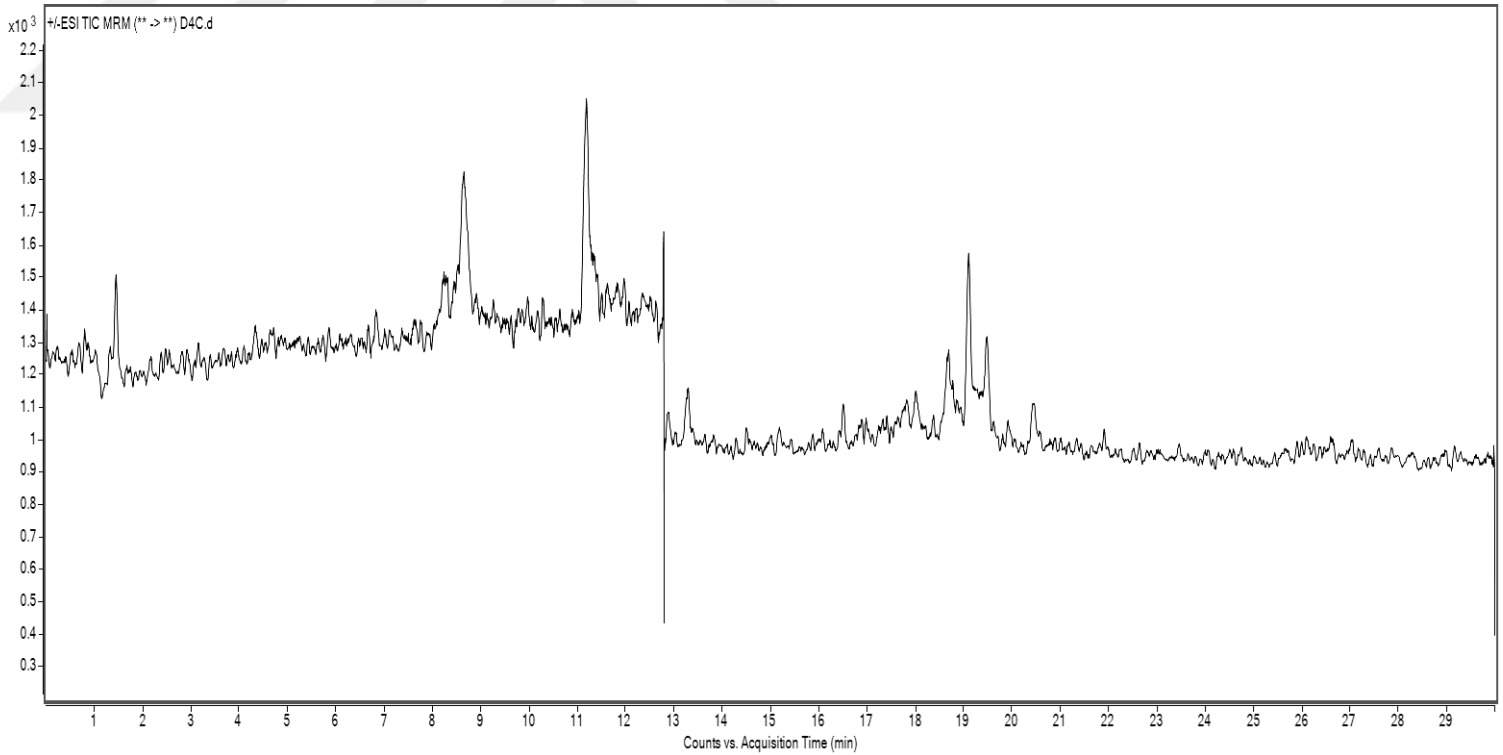
EK 12 Döç-3+G LC-MS/MS Kromatogramı



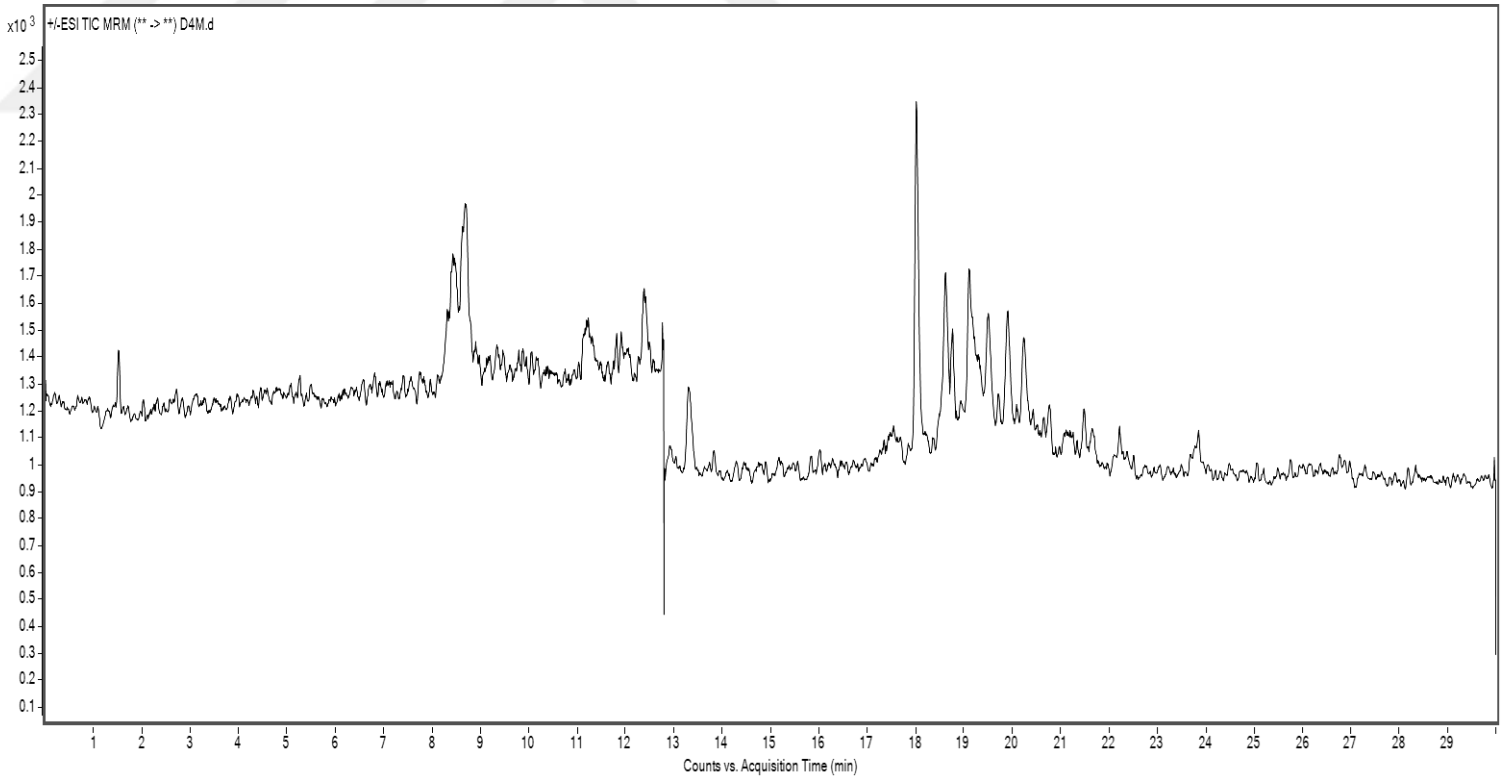
EK 13 Döç-3+K LC-MS/MS Kromatogramı



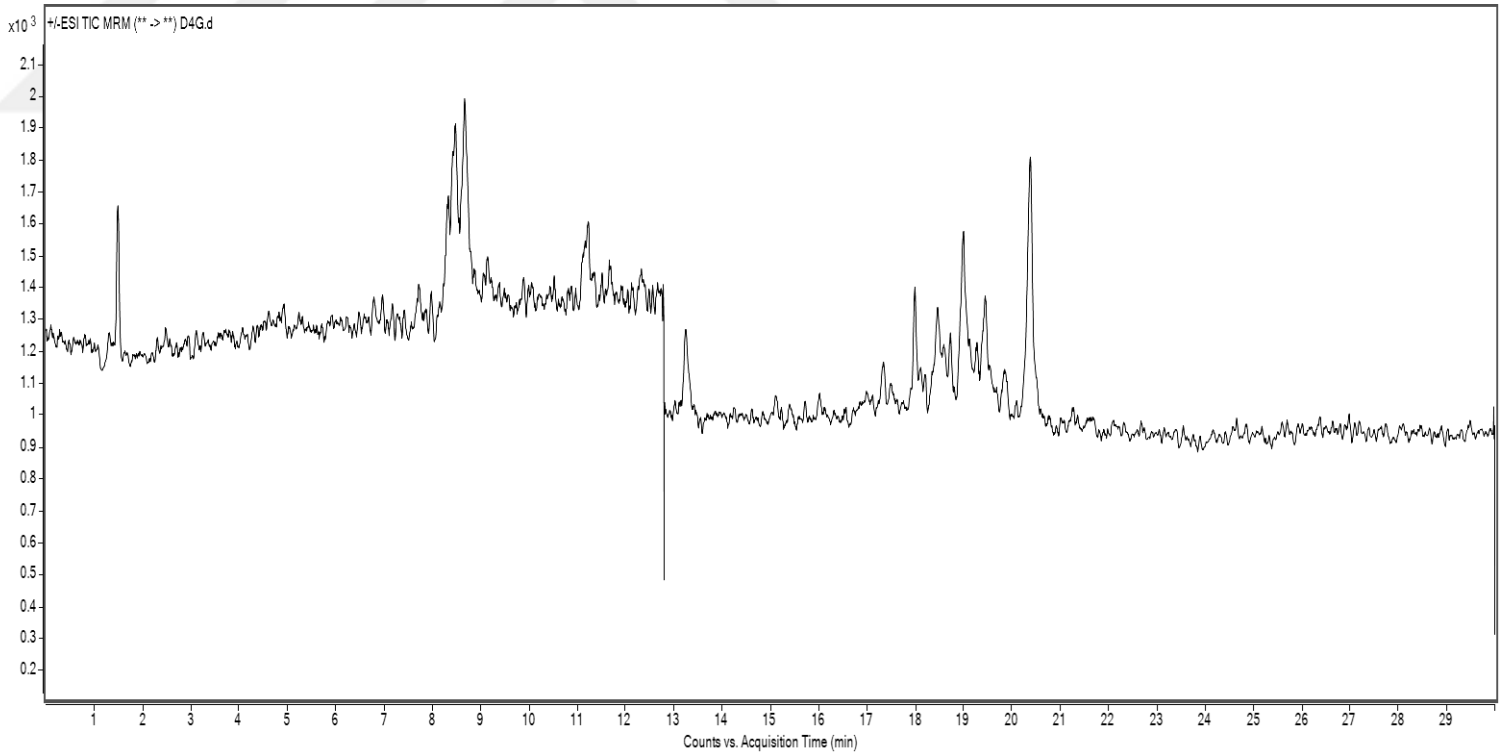
EK 14 Döç-4+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



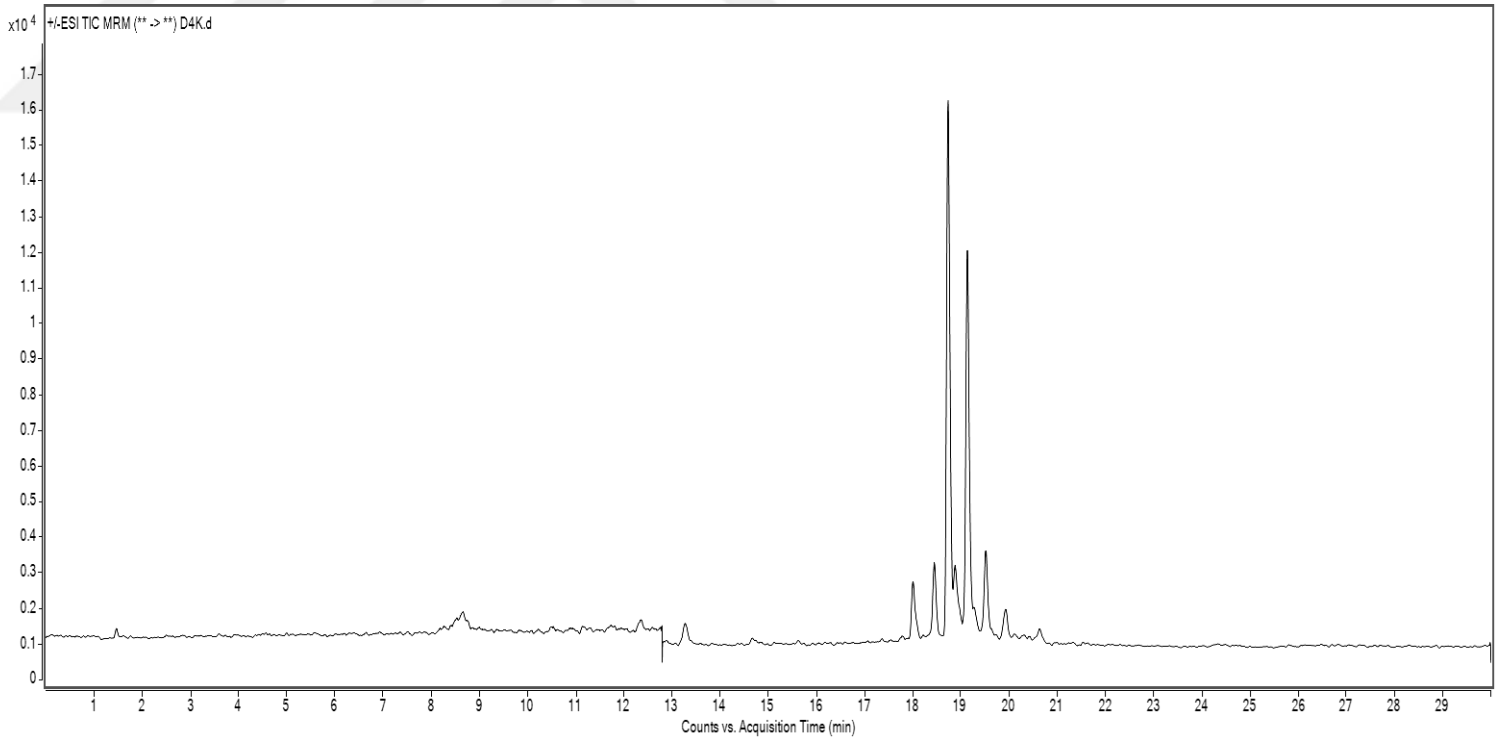
EK 15 Döç-4+M LC-MS/MS Kromatogramı



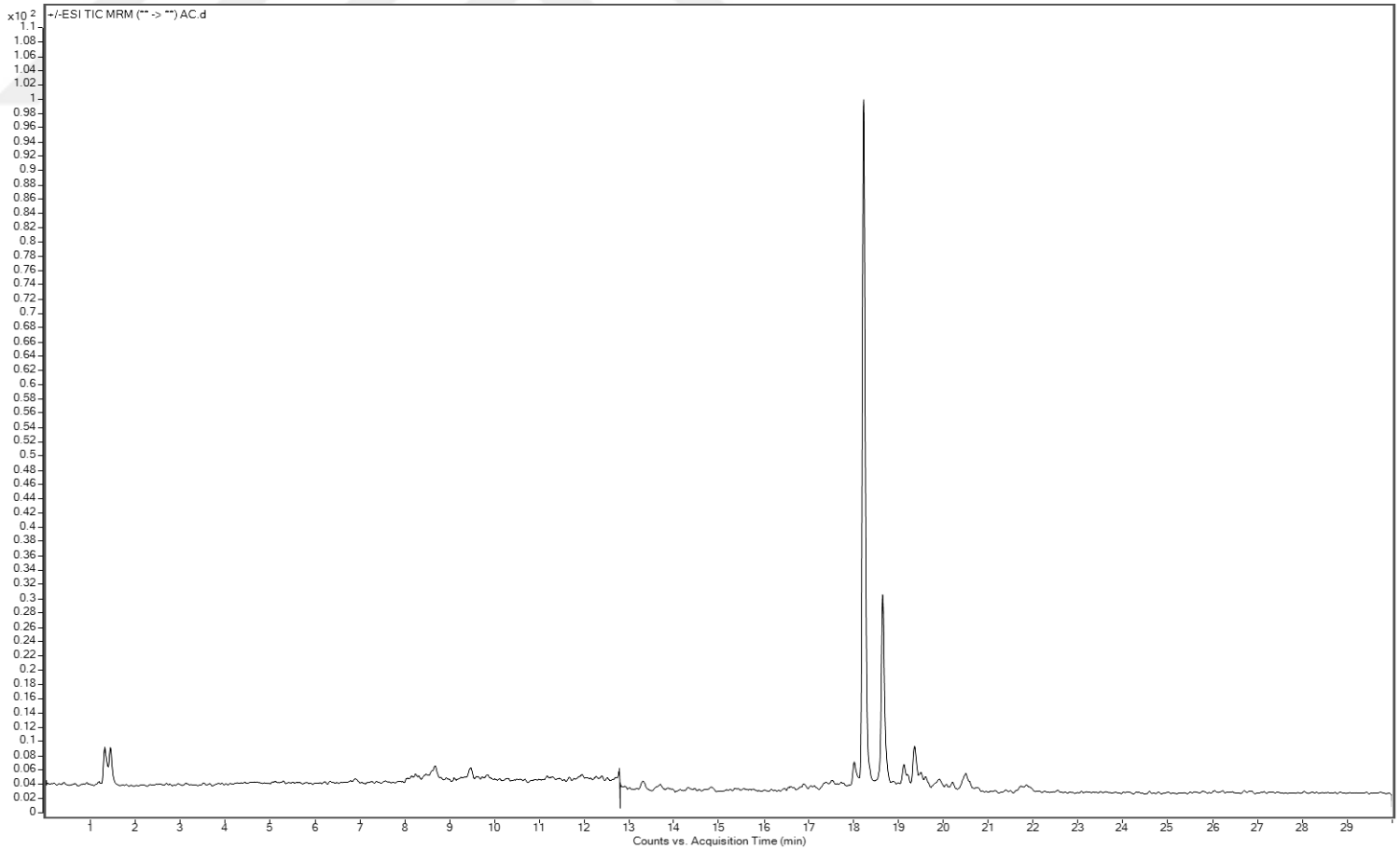
EK 16 Döç-4+G LC-MS/MS Kromatogramı



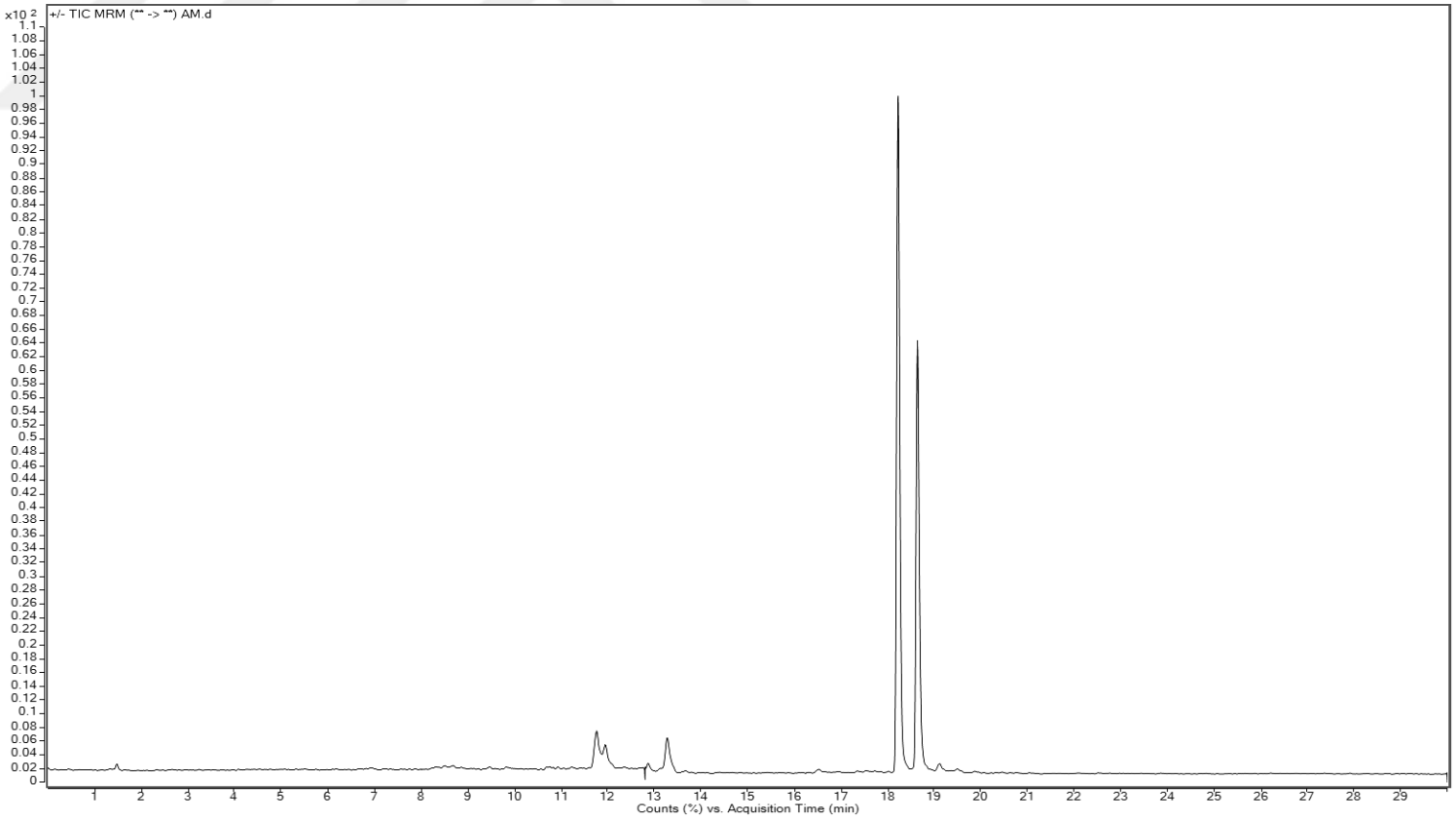
EK 17 Döç-4+K LC-MS/MS Kromatogramı



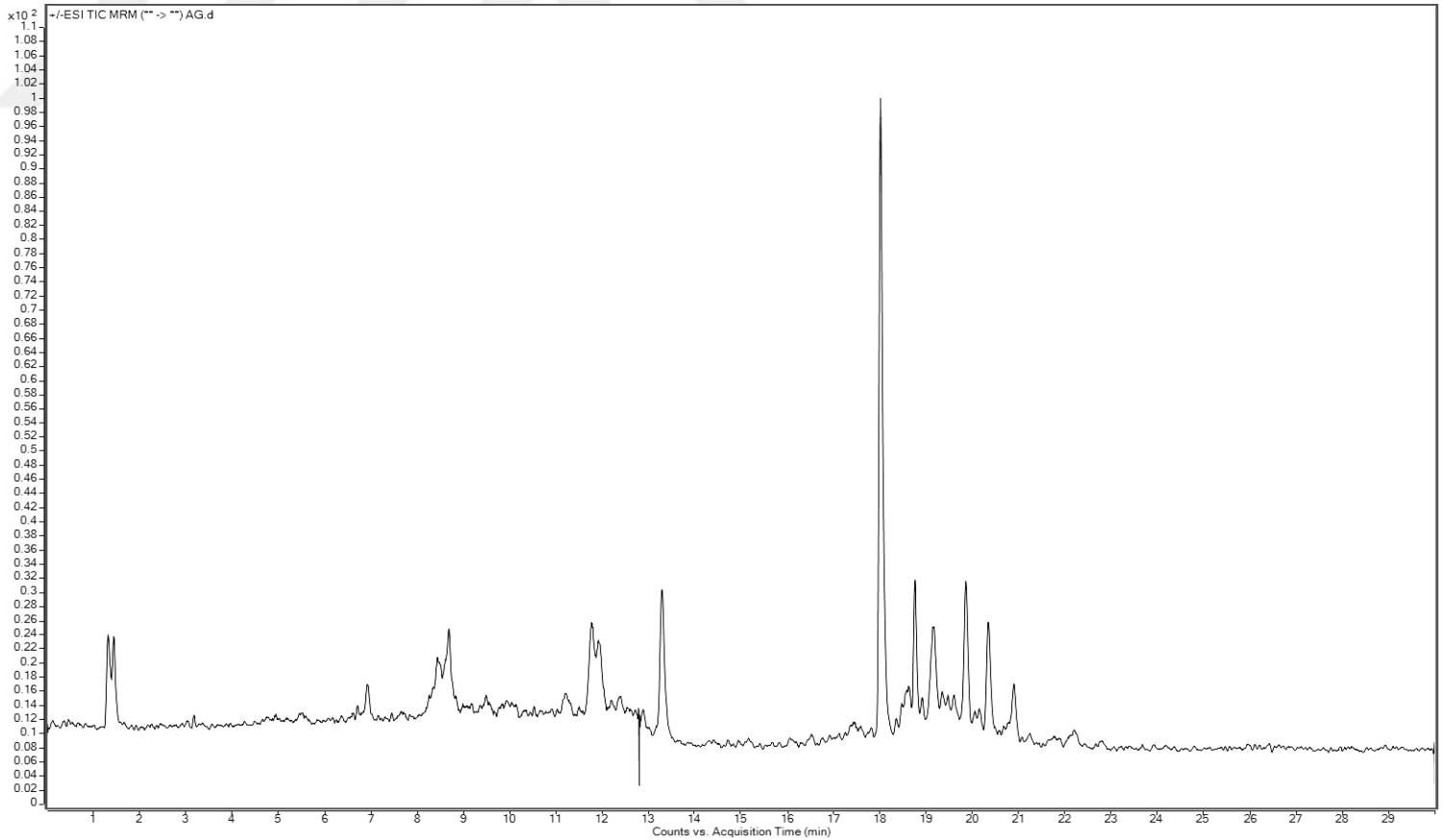
EK 18 Aseton+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



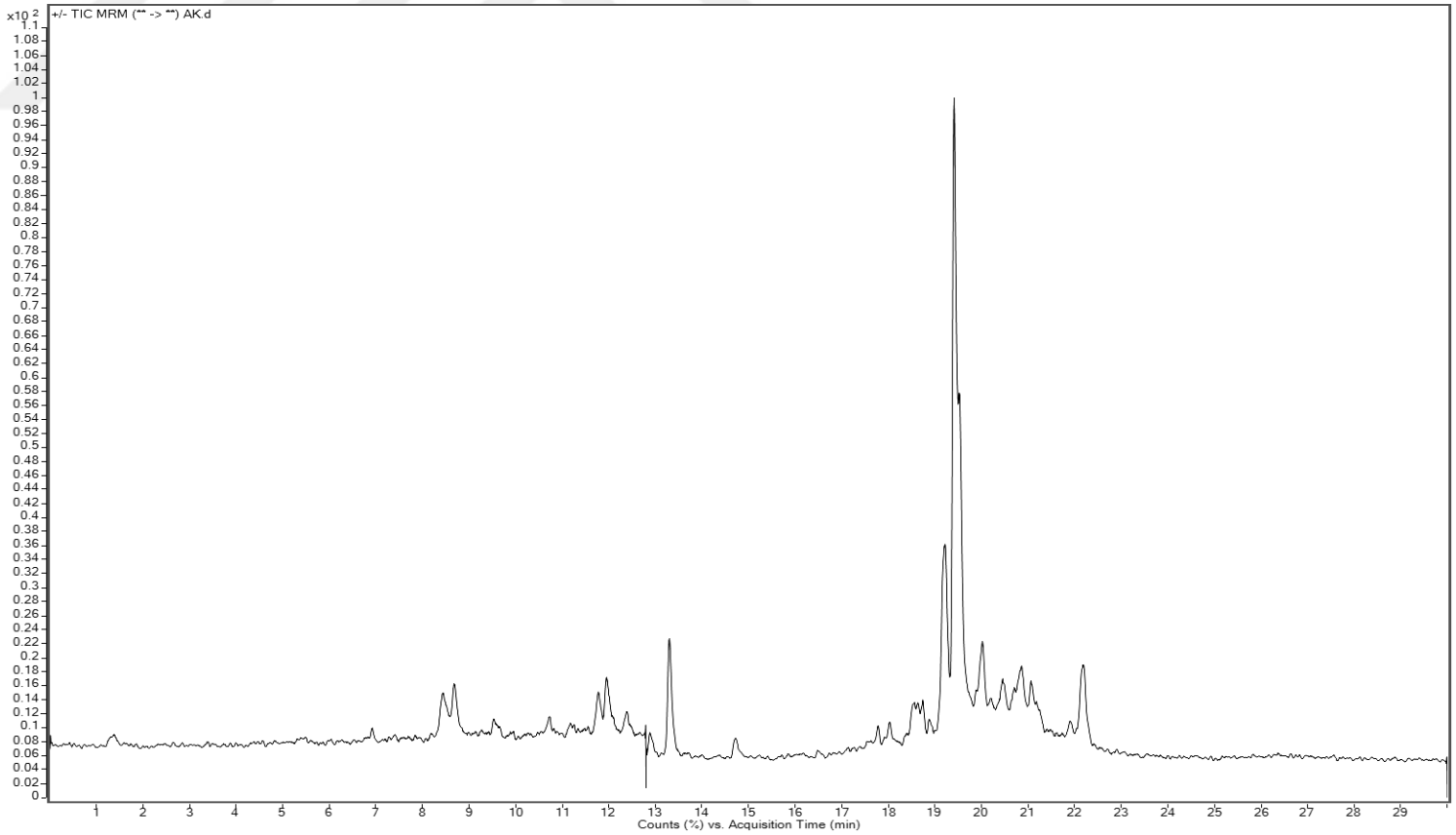
EK 19 Aseton+M LC-MS/MS Kromatogramı



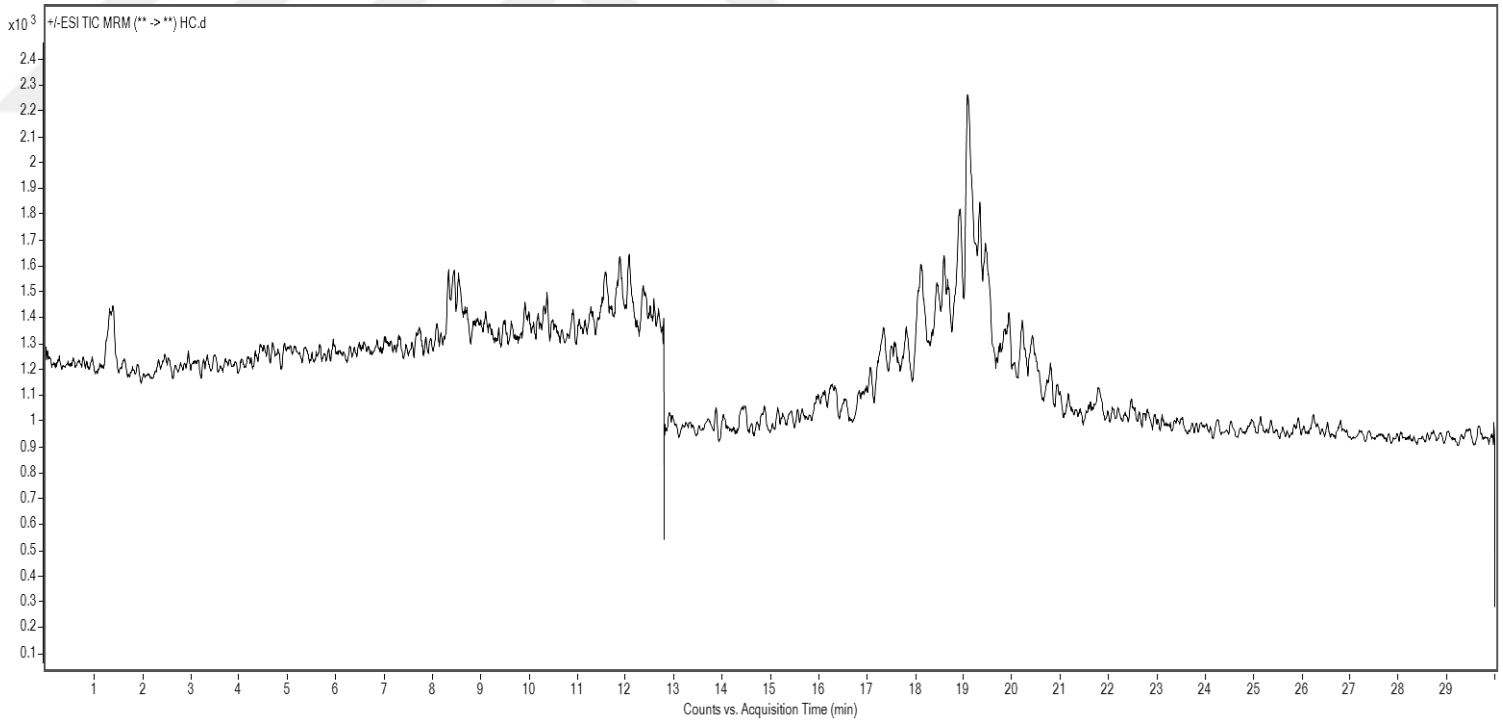
EK 20 Aseton+G LC-MS/MS Kromatogramı



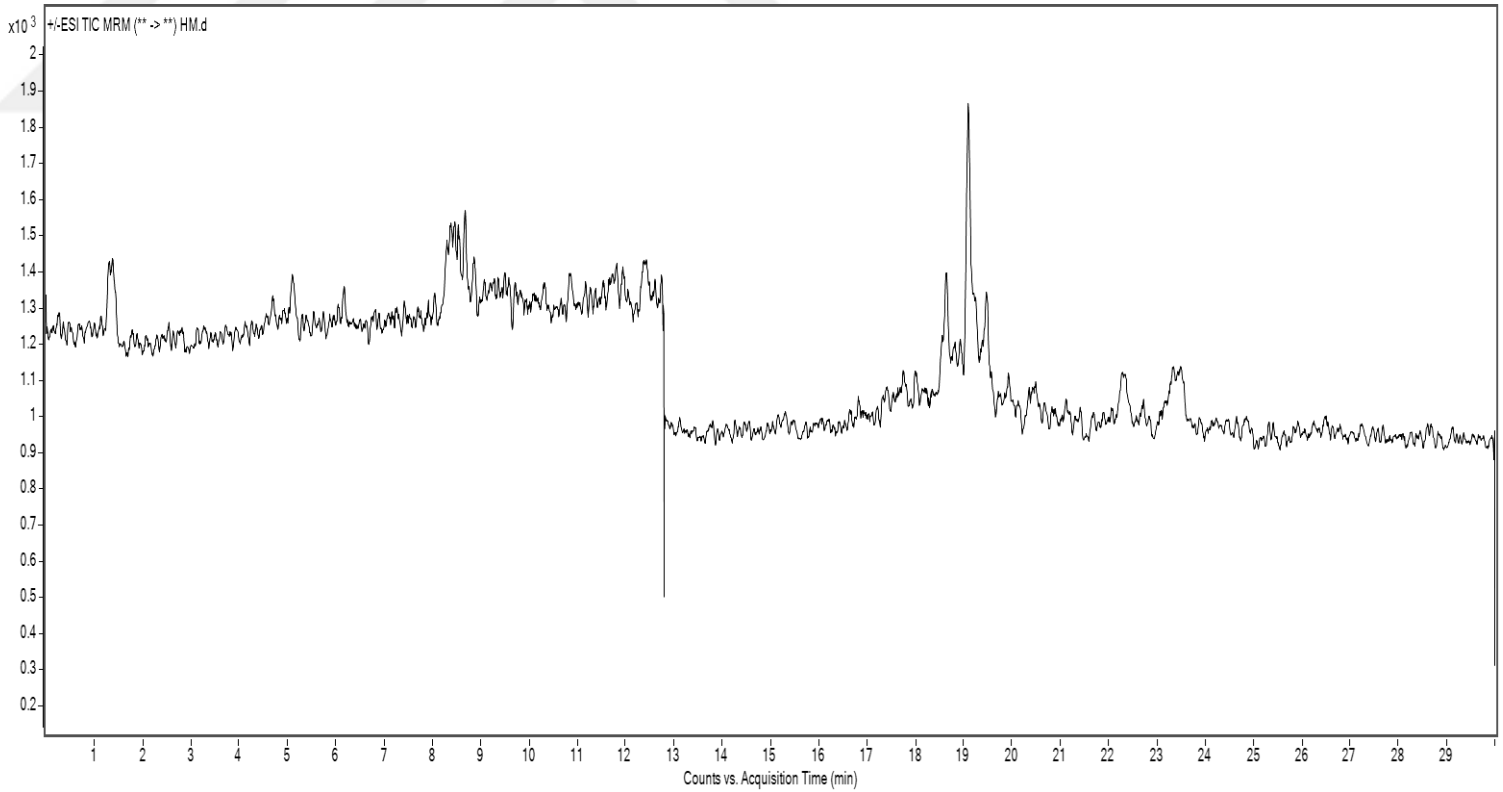
EK 21 Aseton+K LC-MS/MS Kromatogramı



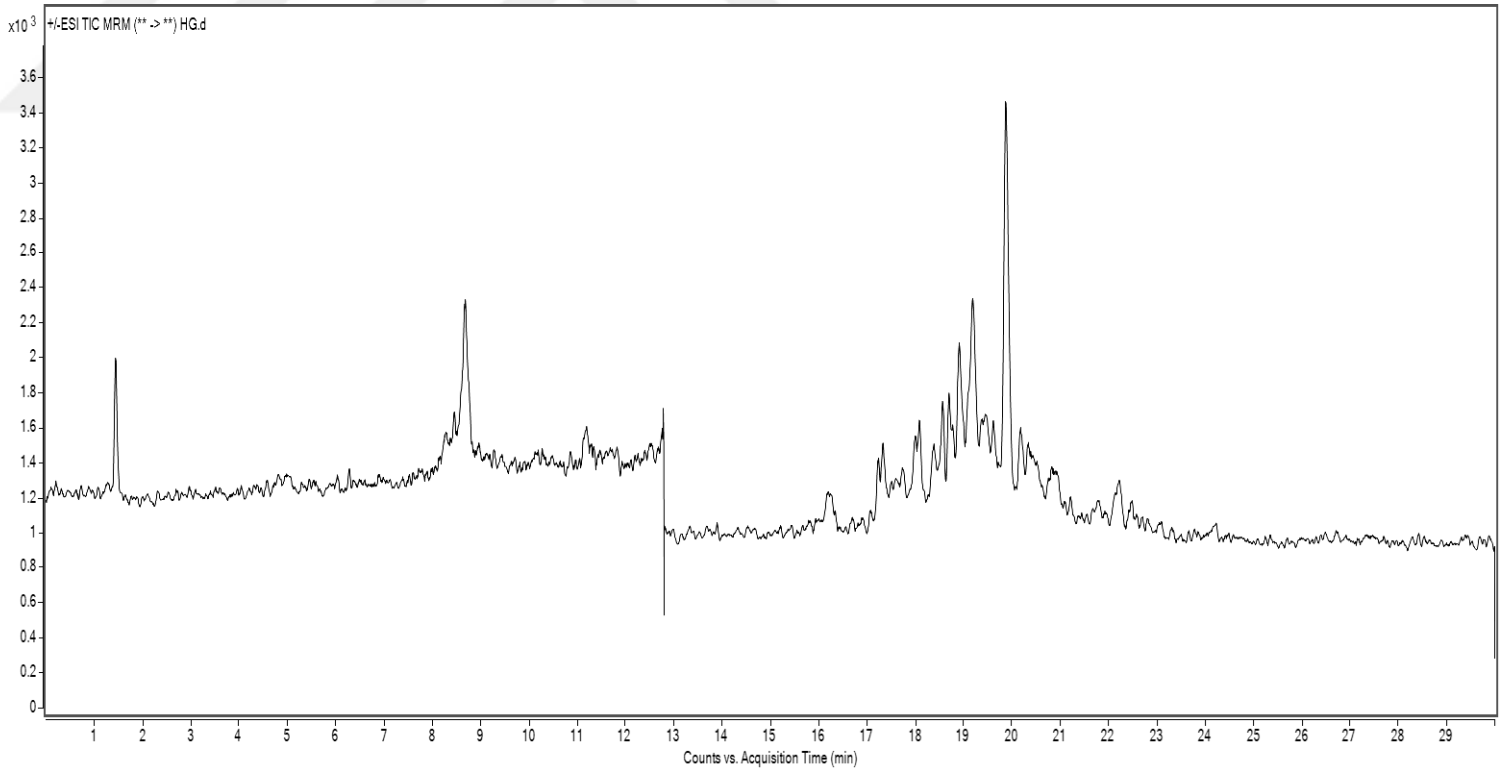
EK 22 Hekzan+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



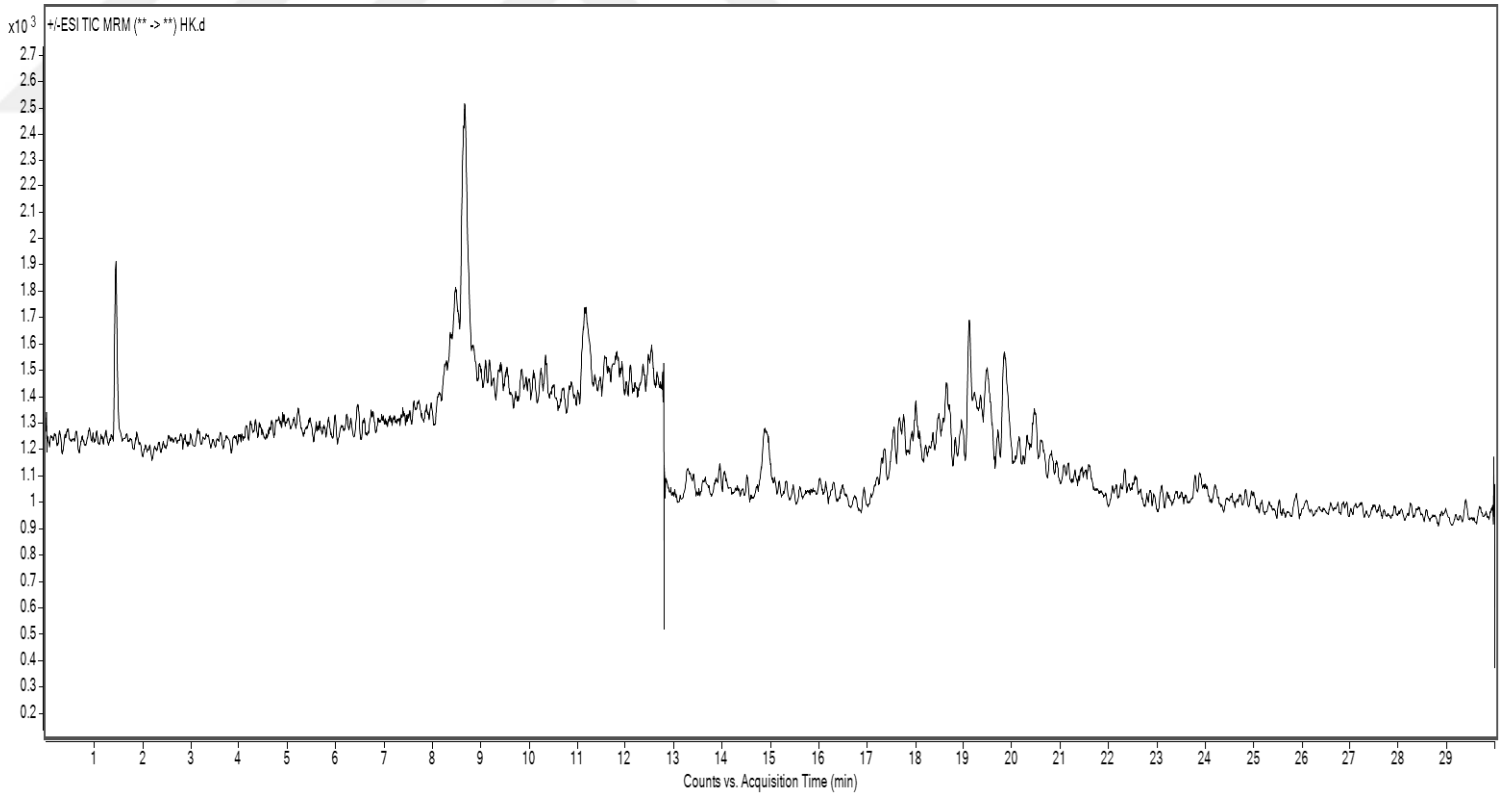
EK 23 Hekzan+M LC-MS/MS Kromatogramı



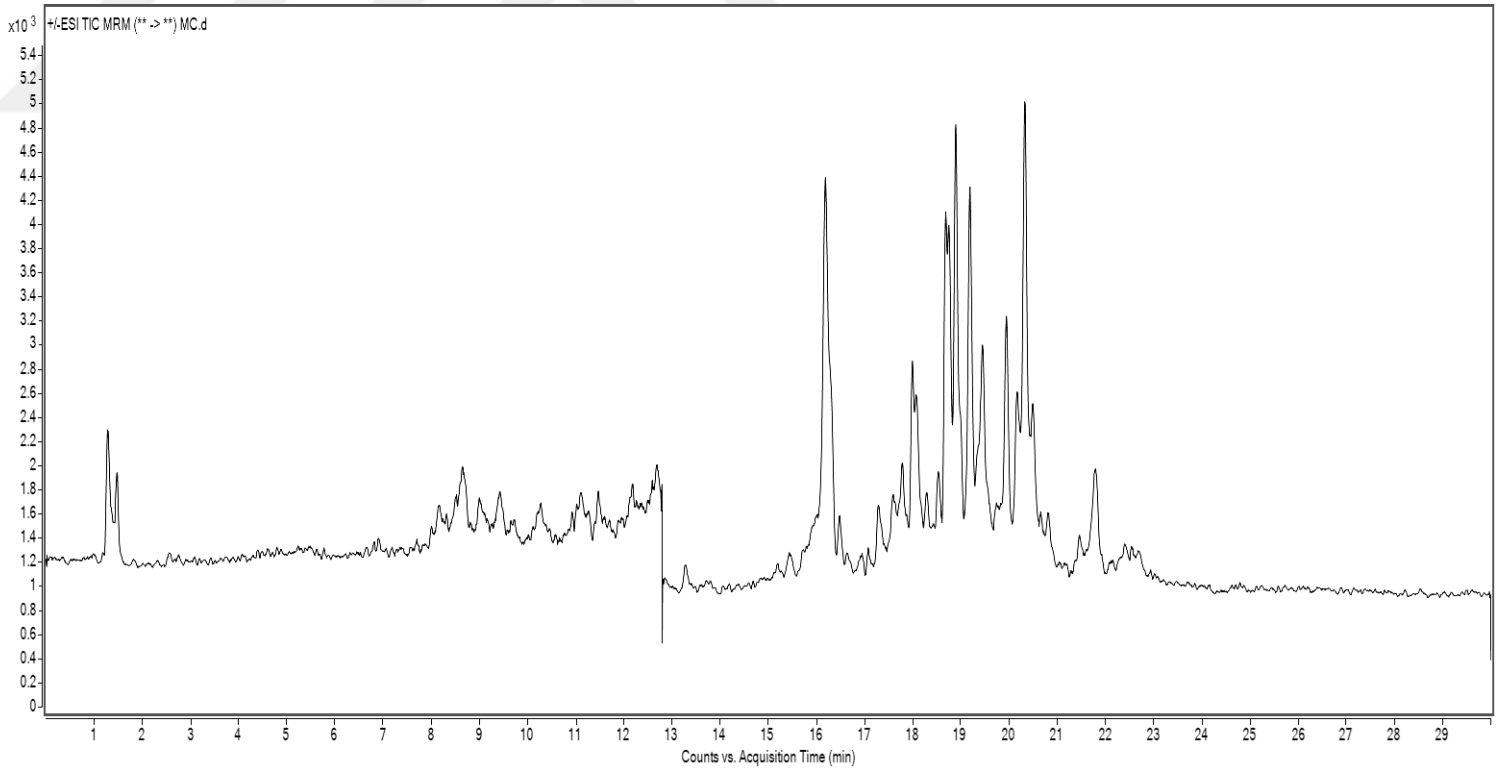
EK 24 Hekzan+G LC-MS/MS Kromatogramı



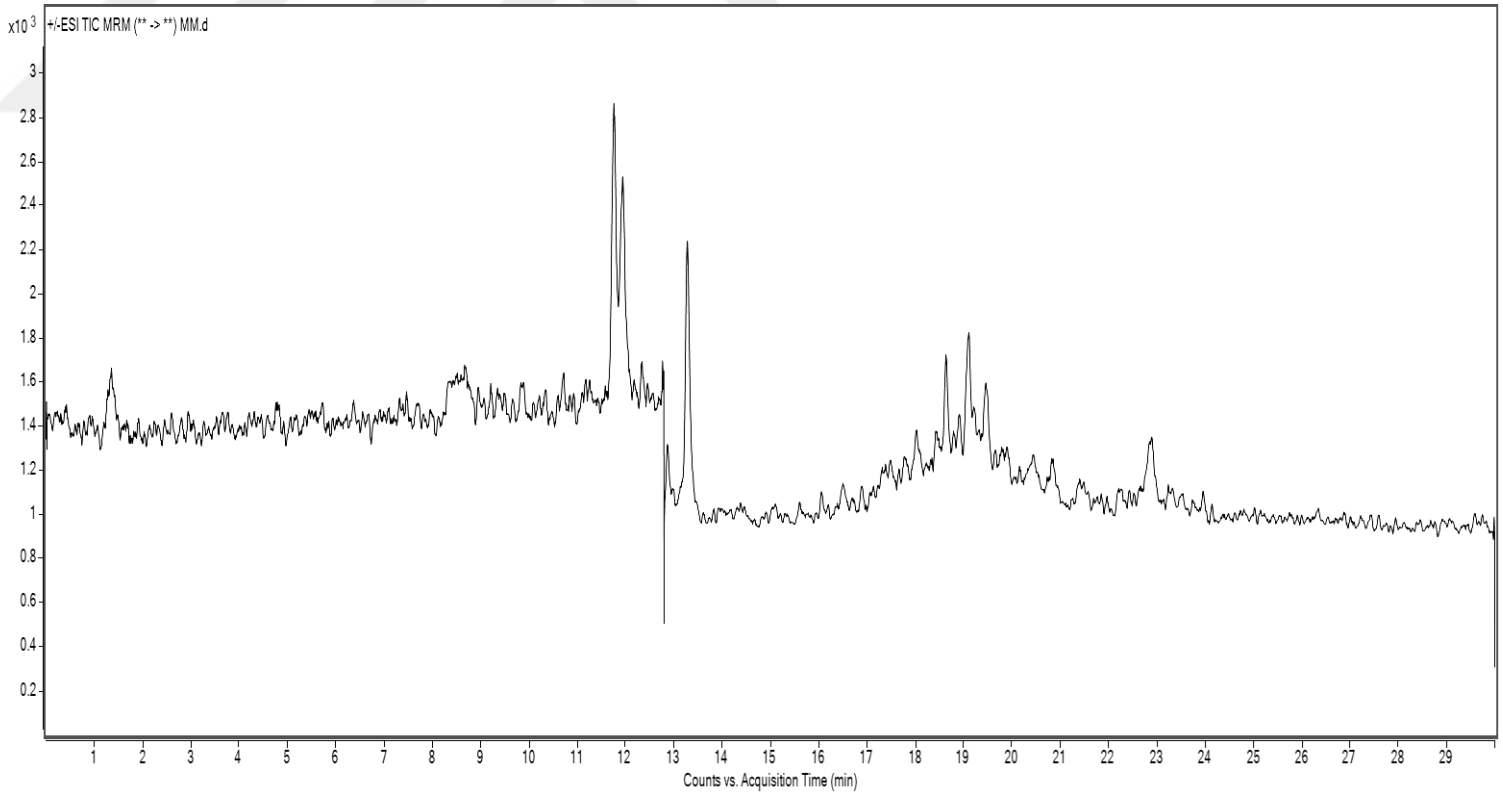
EK 25 Hekzan+K LC-MS/MS Kromatogramı



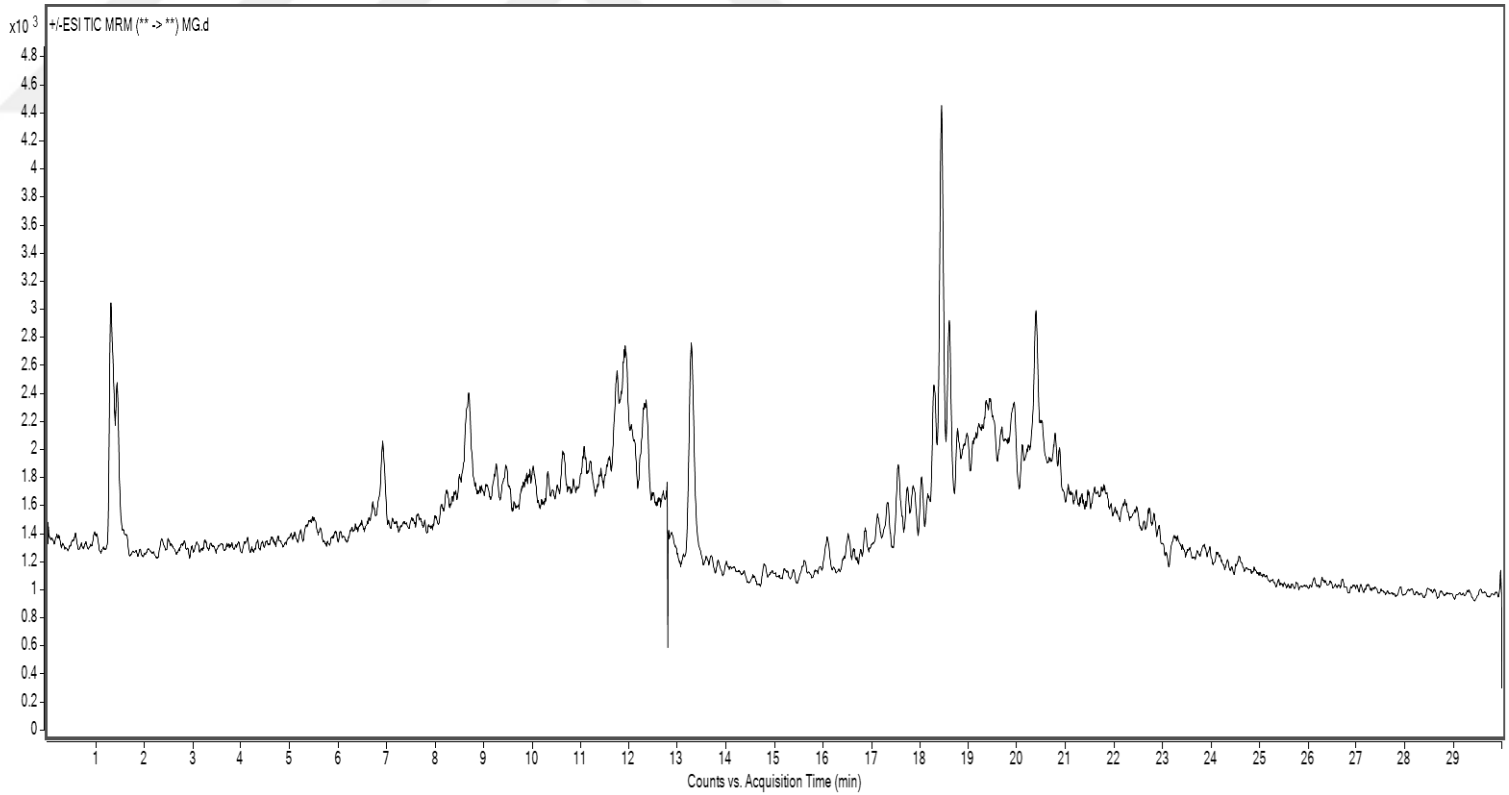
EK 26 Metanol+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



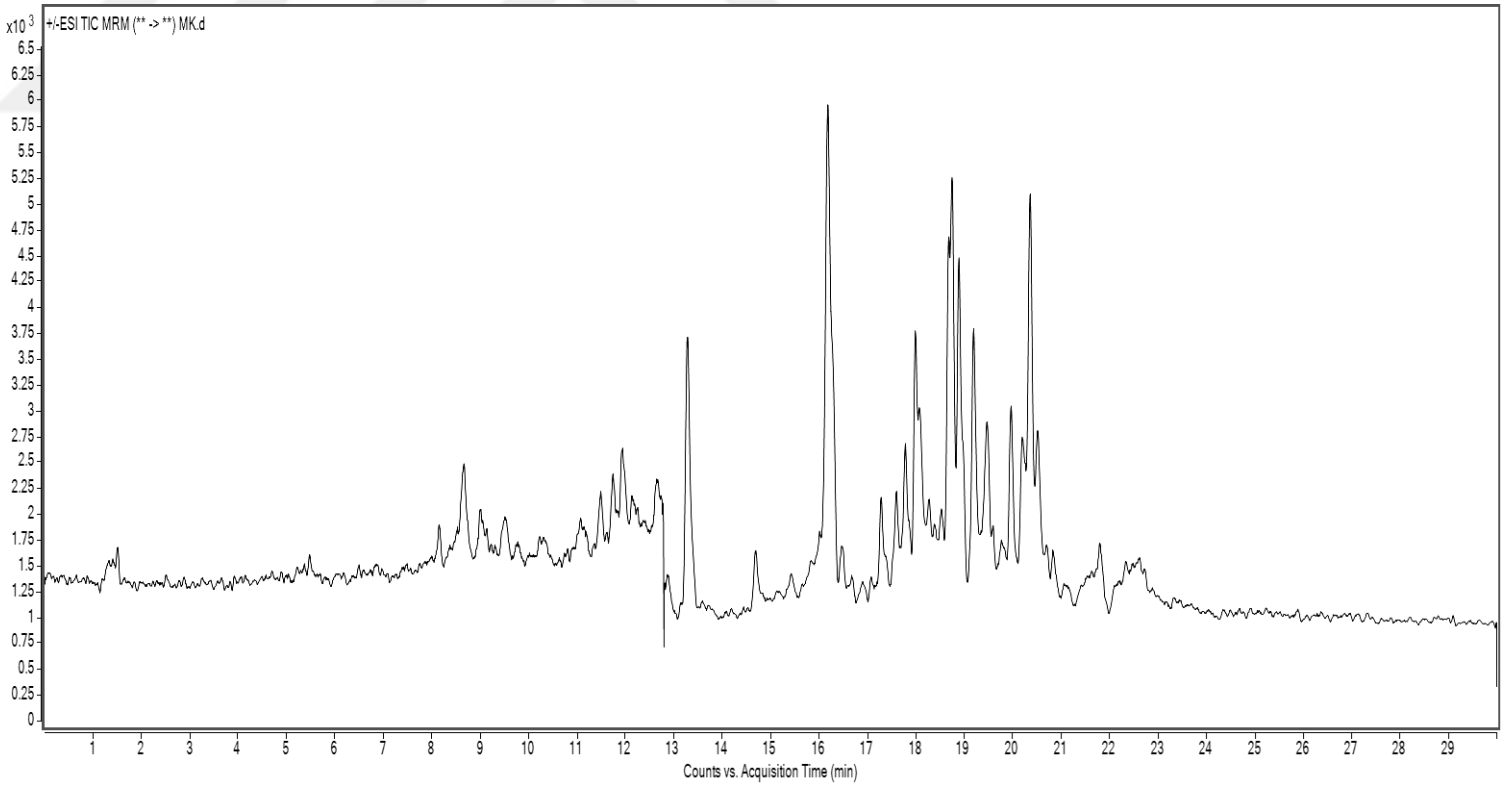
EK 27 Metanol+M LC-MS/MS Kromatogramı



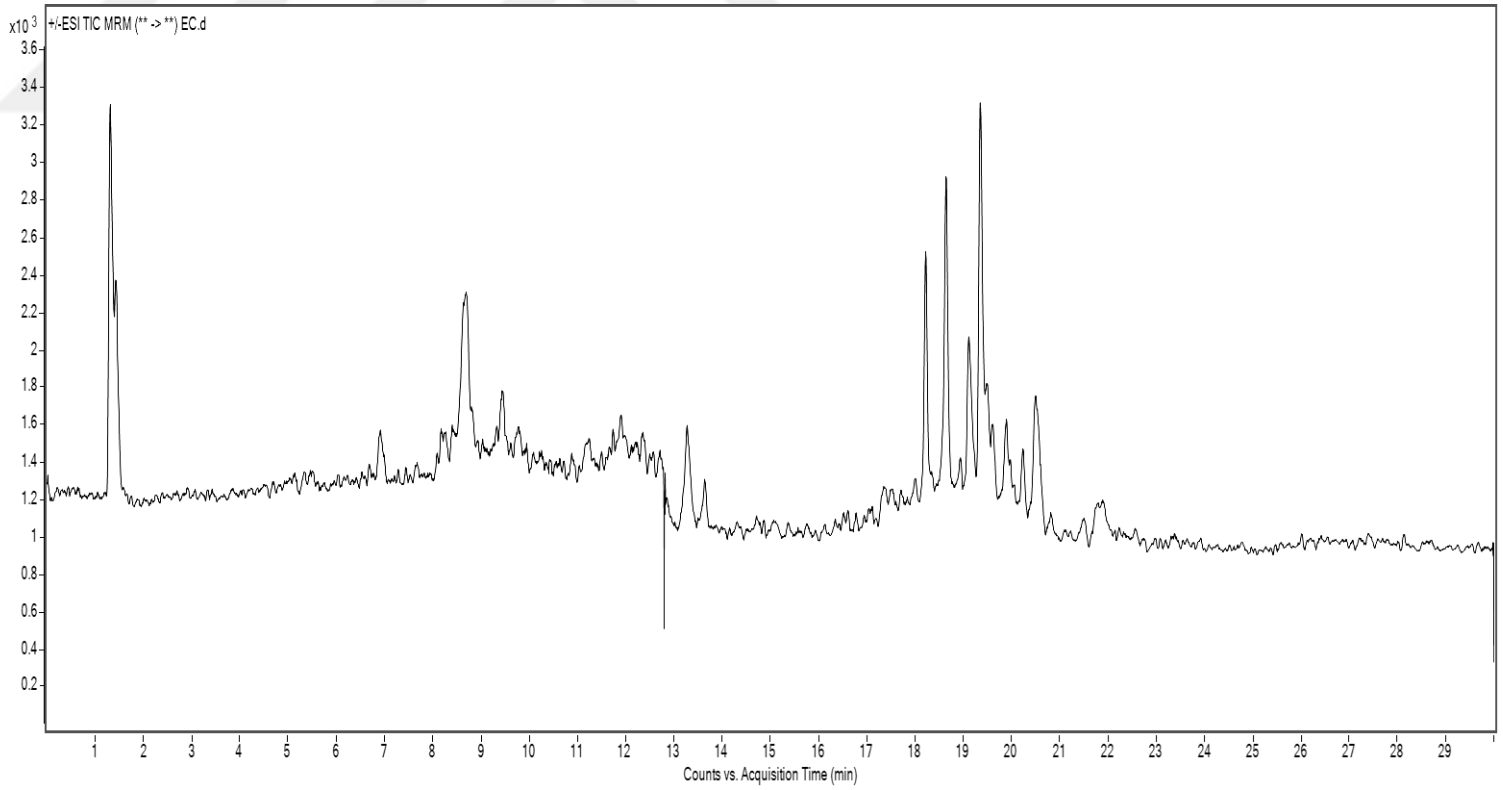
EK 28 Metanol+G LC-MS/MS Kromatogramı



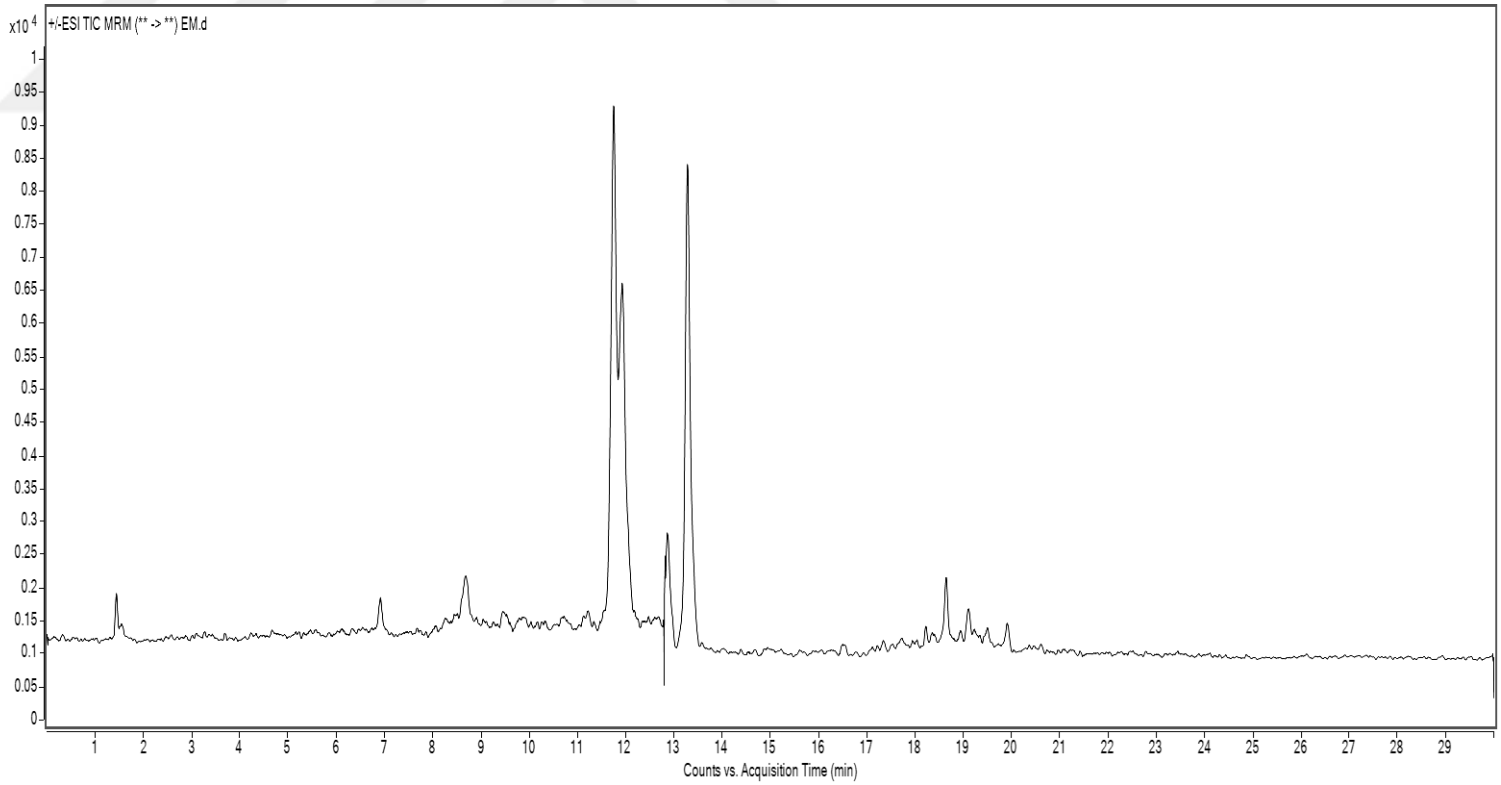
EK 29 Metanol+K LC-MS/MS Kromatogramı



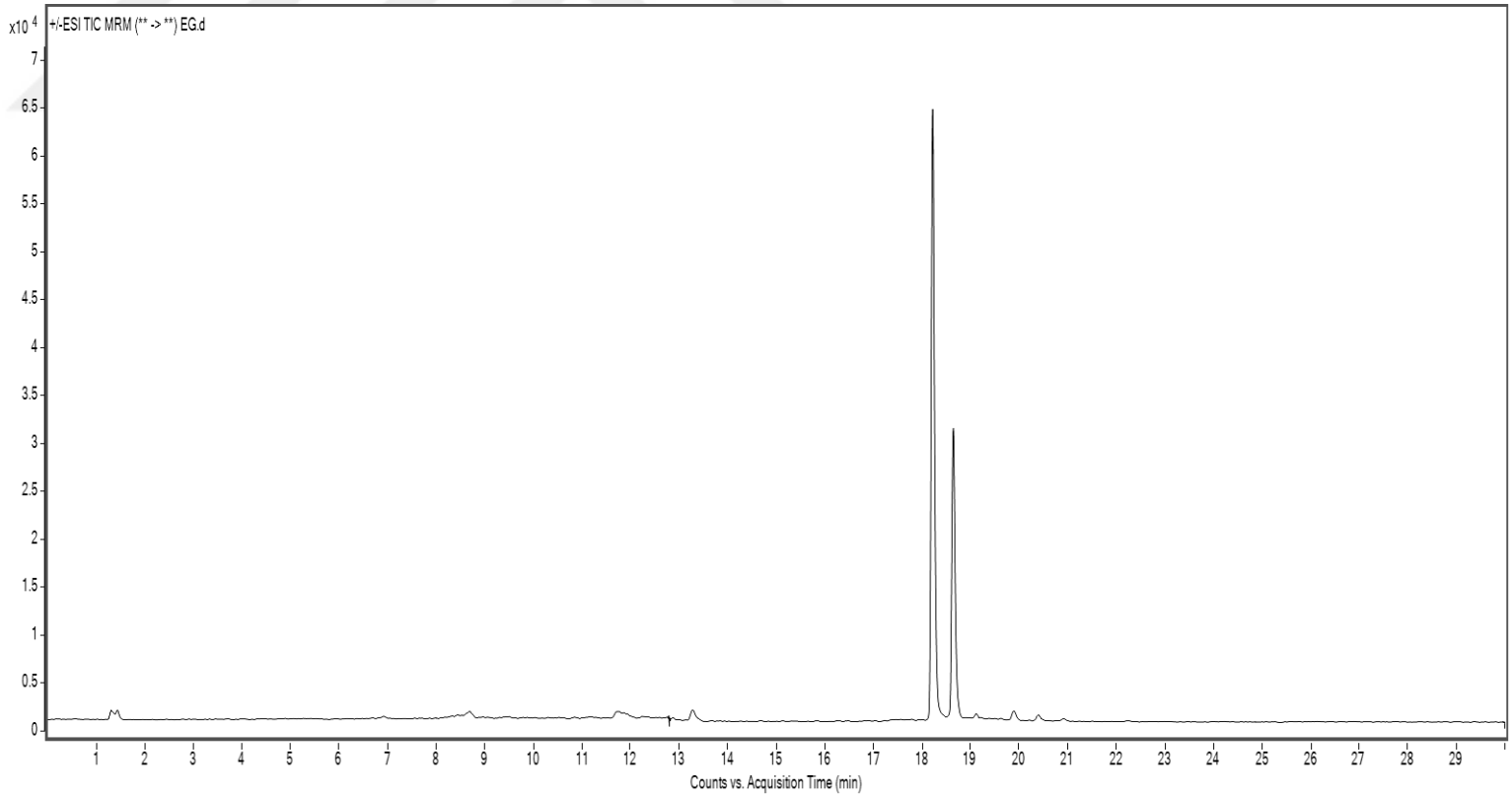
EK 30 Etanol+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



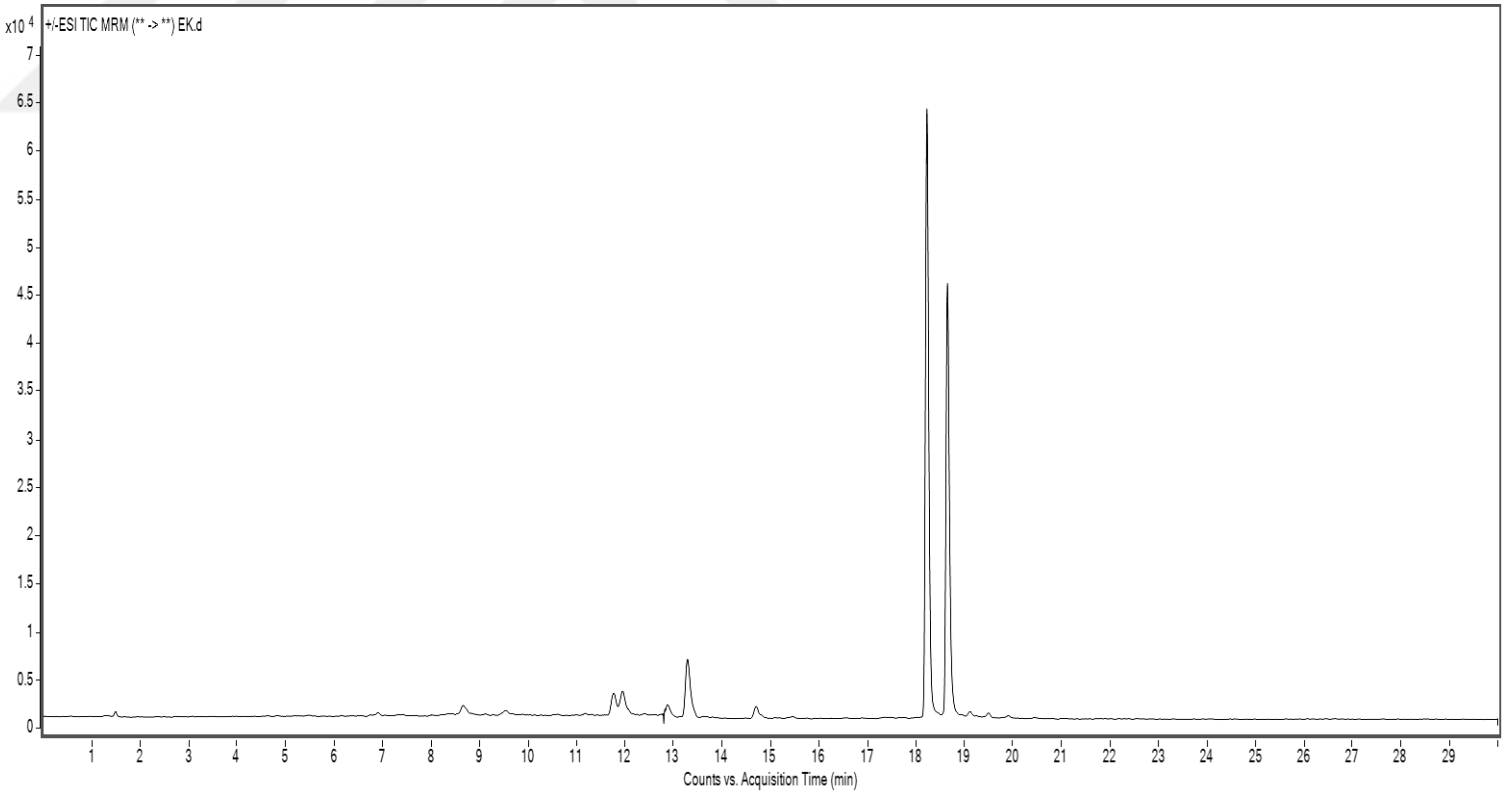
EK 31 Etanol+M LC-MS/MS Kromatogramı



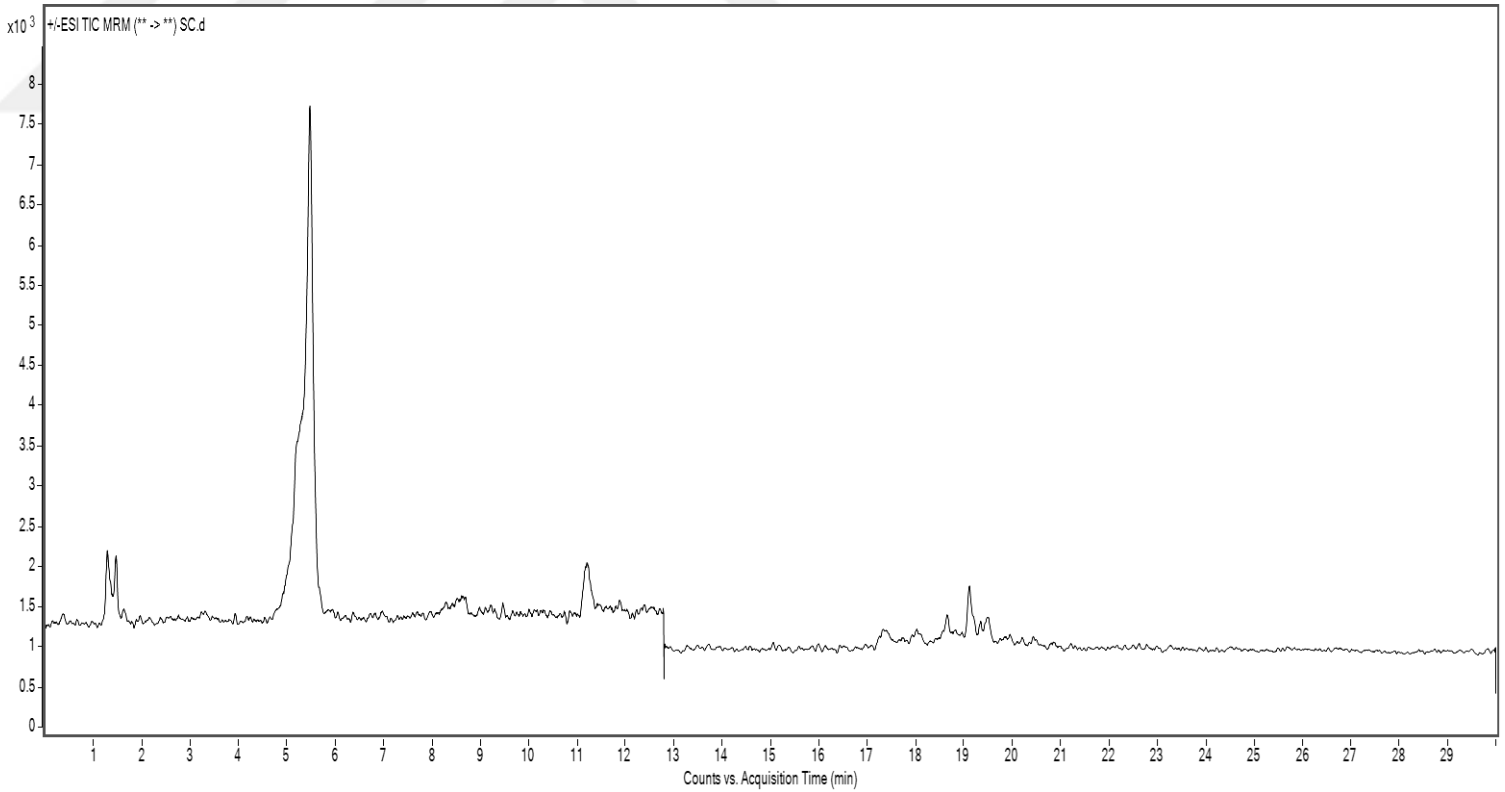
EK 32 Etanol+G LC-MS/MS Kromatogramı



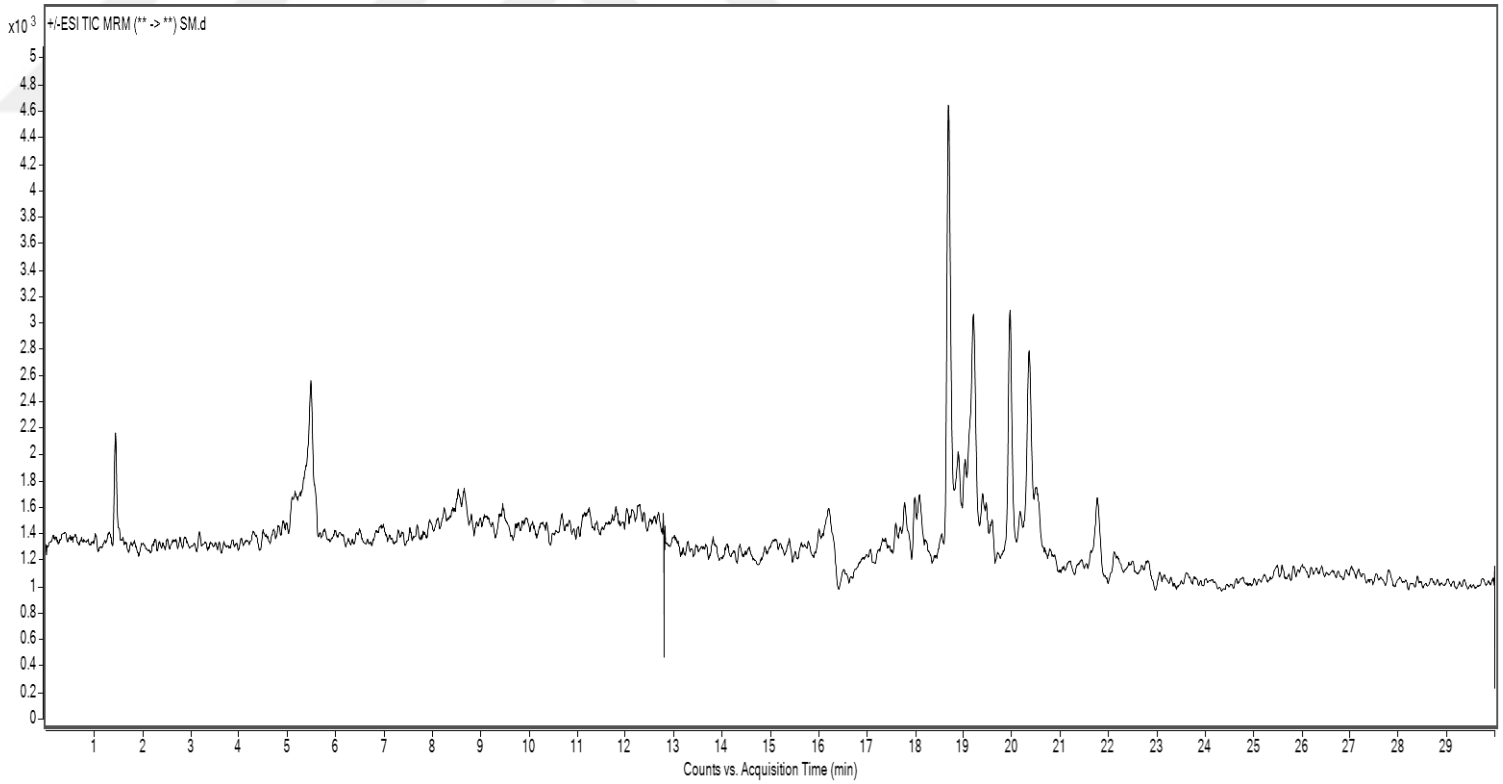
EK 33 Etanol+K LC-MS/MS Kromatogramı



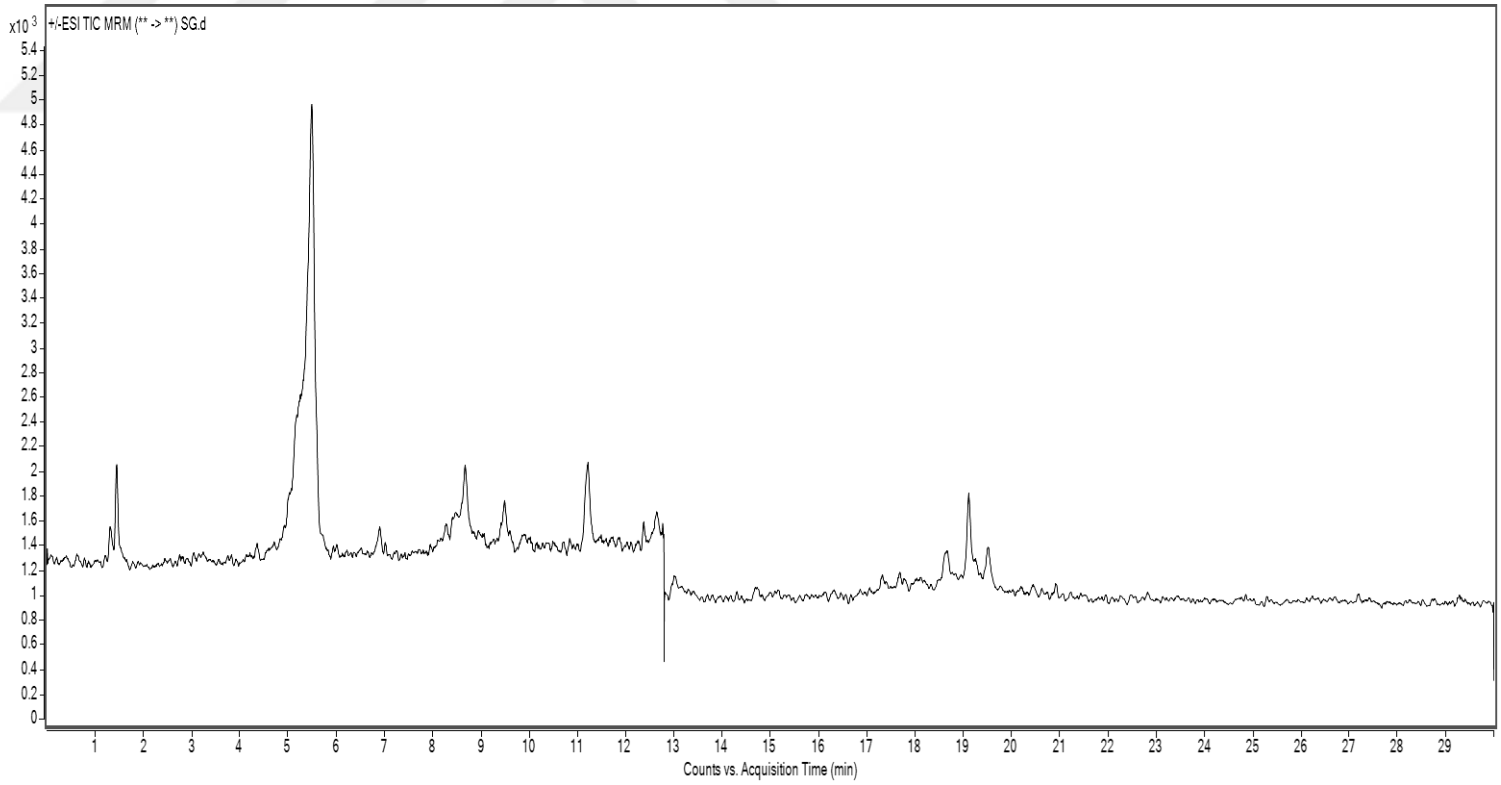
EK 34 Saf su+Kç LC-MS/MS Kromatogramı



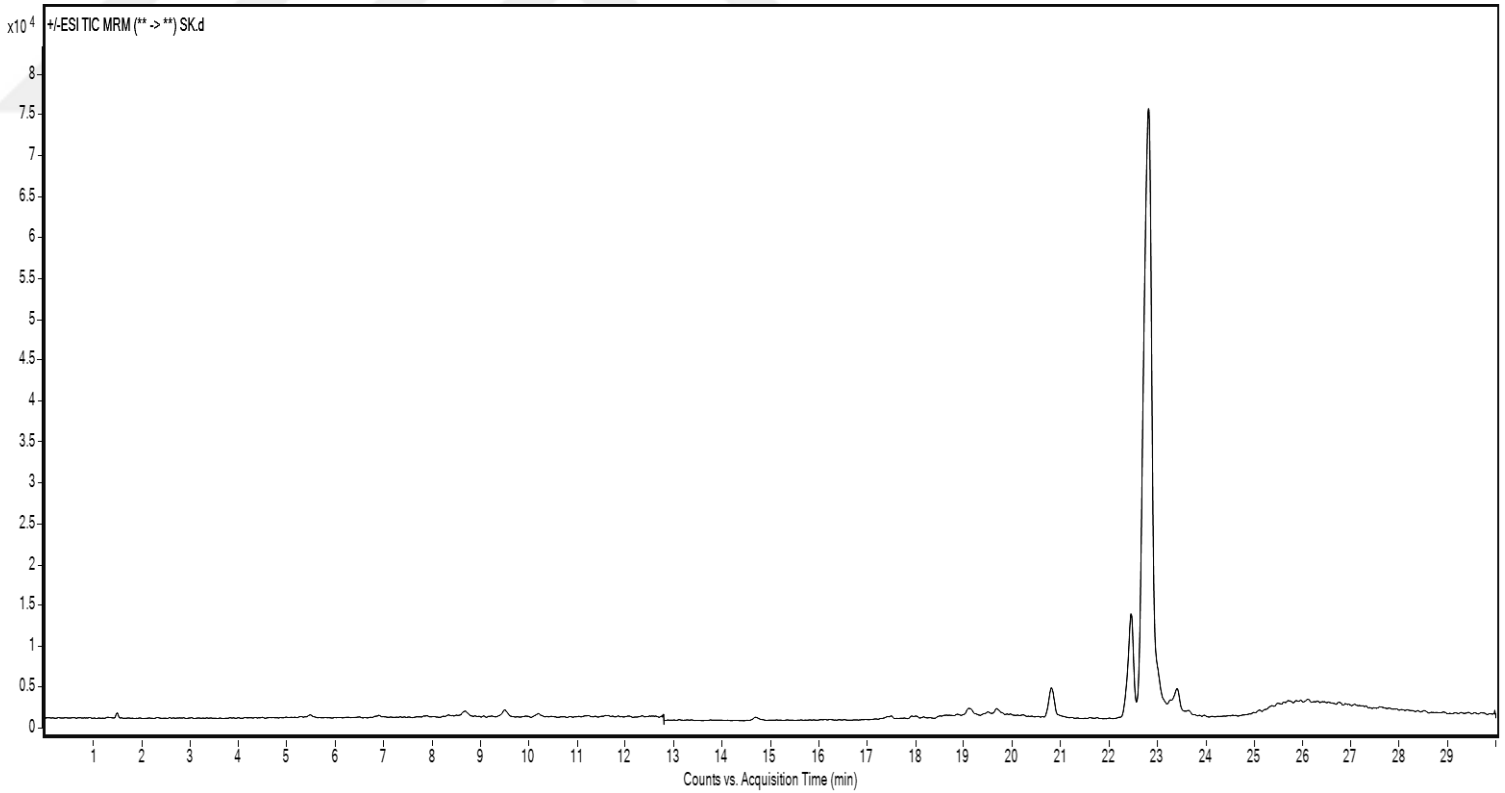
EK 35 Saf su+M LC-MS/MS Kromatogramı



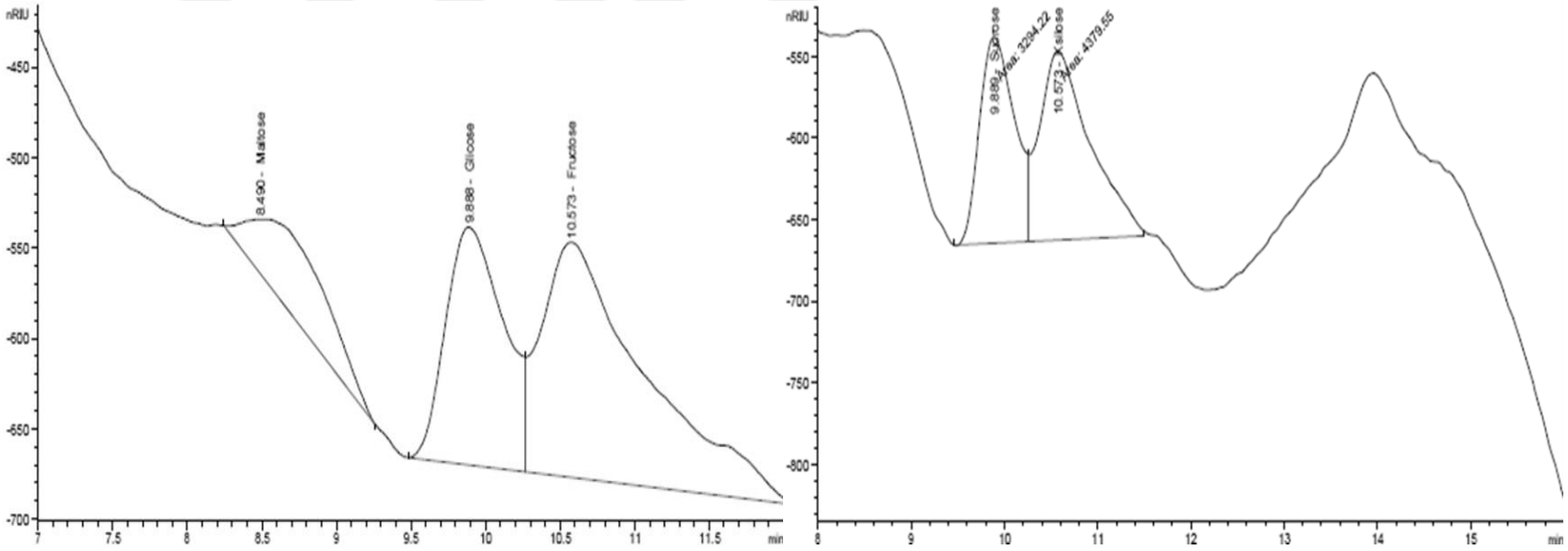
EK 36 Saf su+G LC-MS/MS Kromatogramı



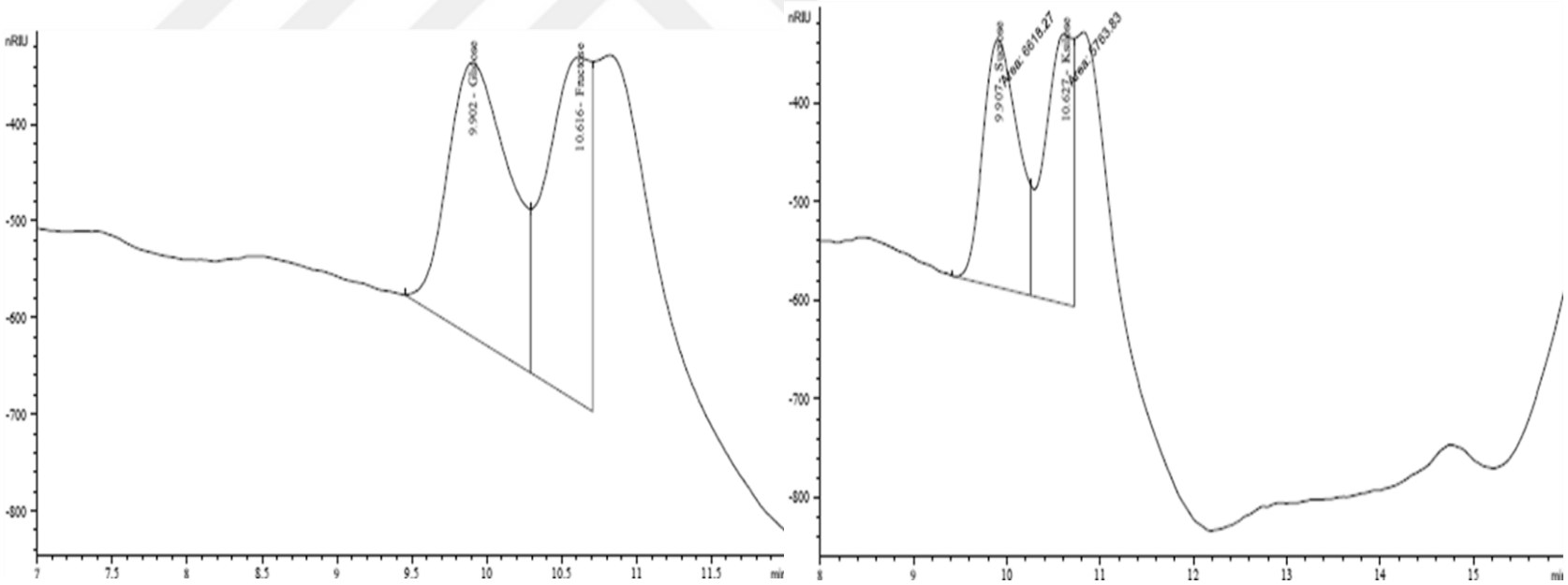
EK 37 Saf su+K LC-MS/MS Kromatogramı



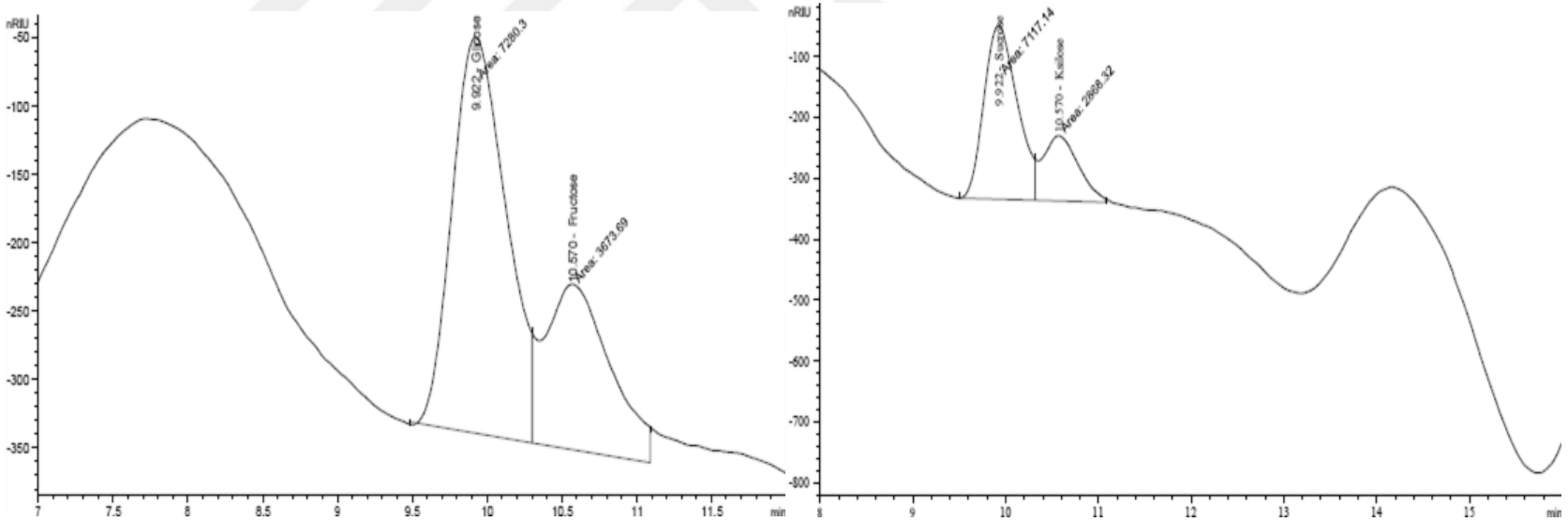
EK 38 Döç-1+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



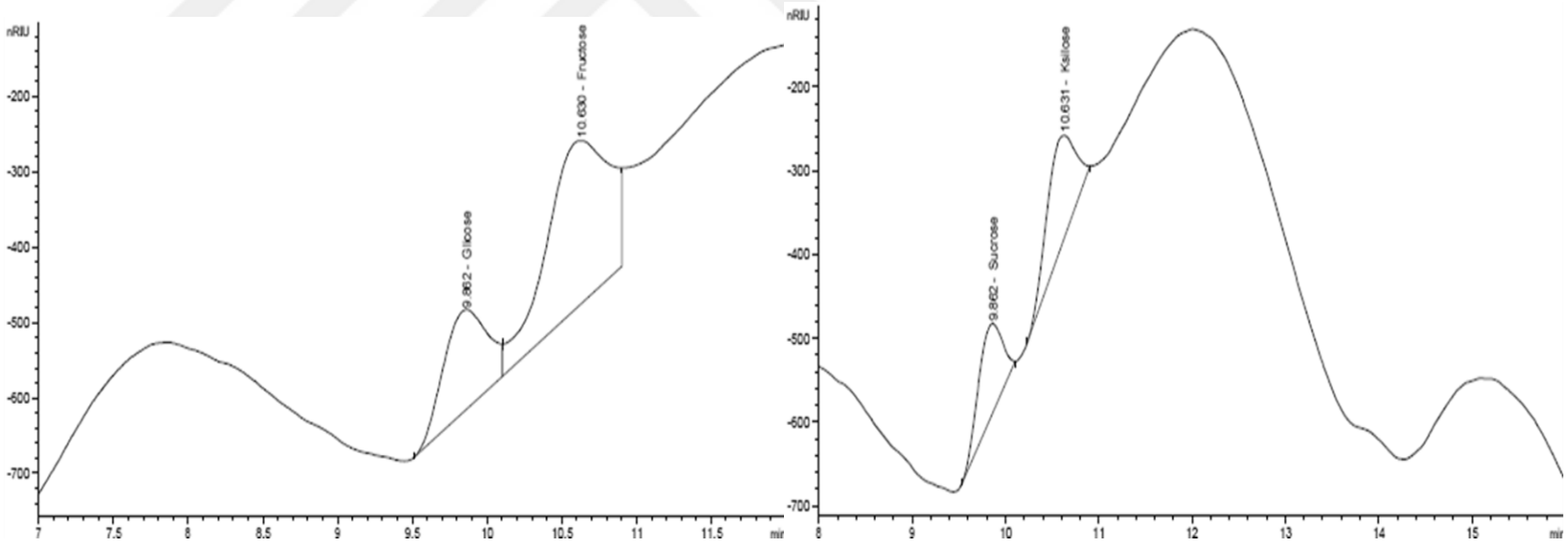
EK 39 Döç-1+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



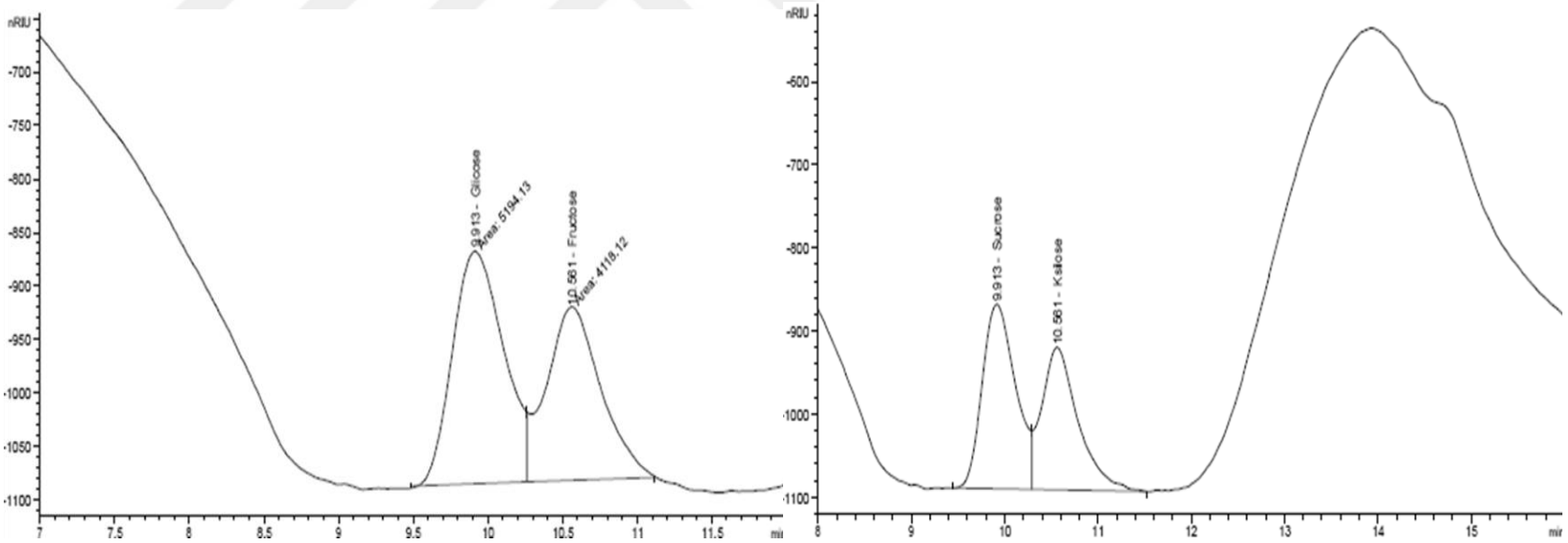
EK 40 Döç-1+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



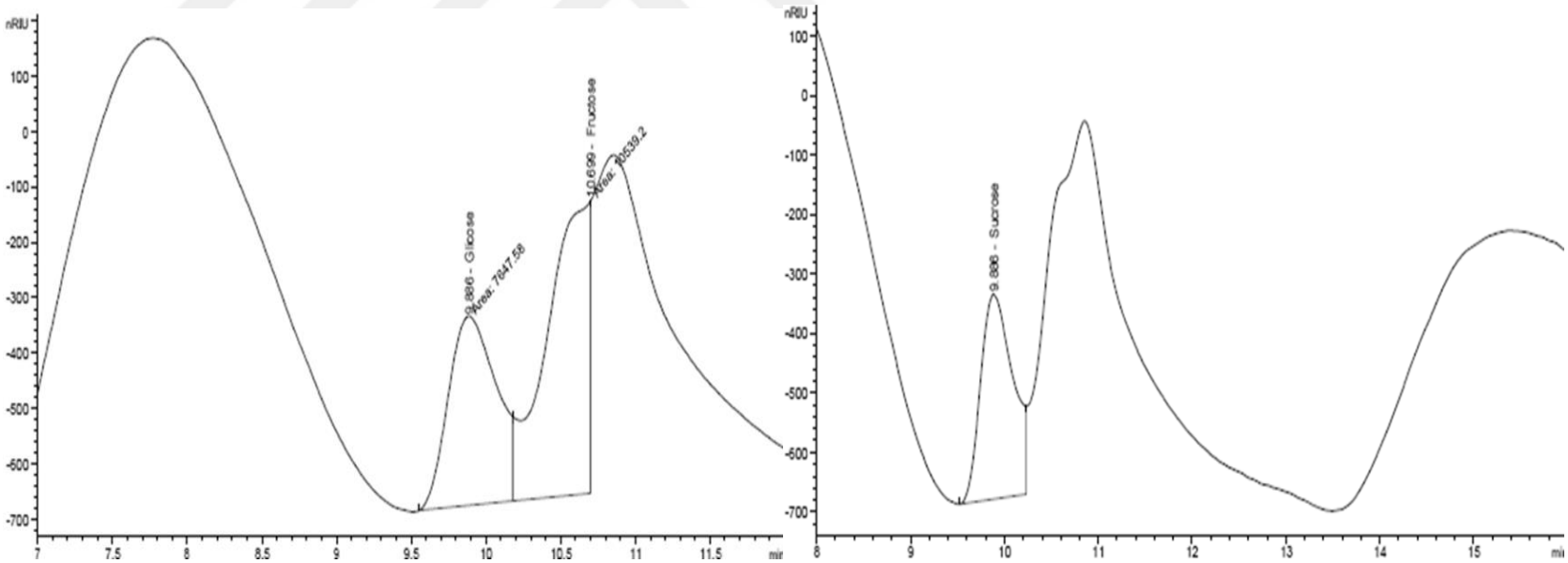
EK 41 Döç-1+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



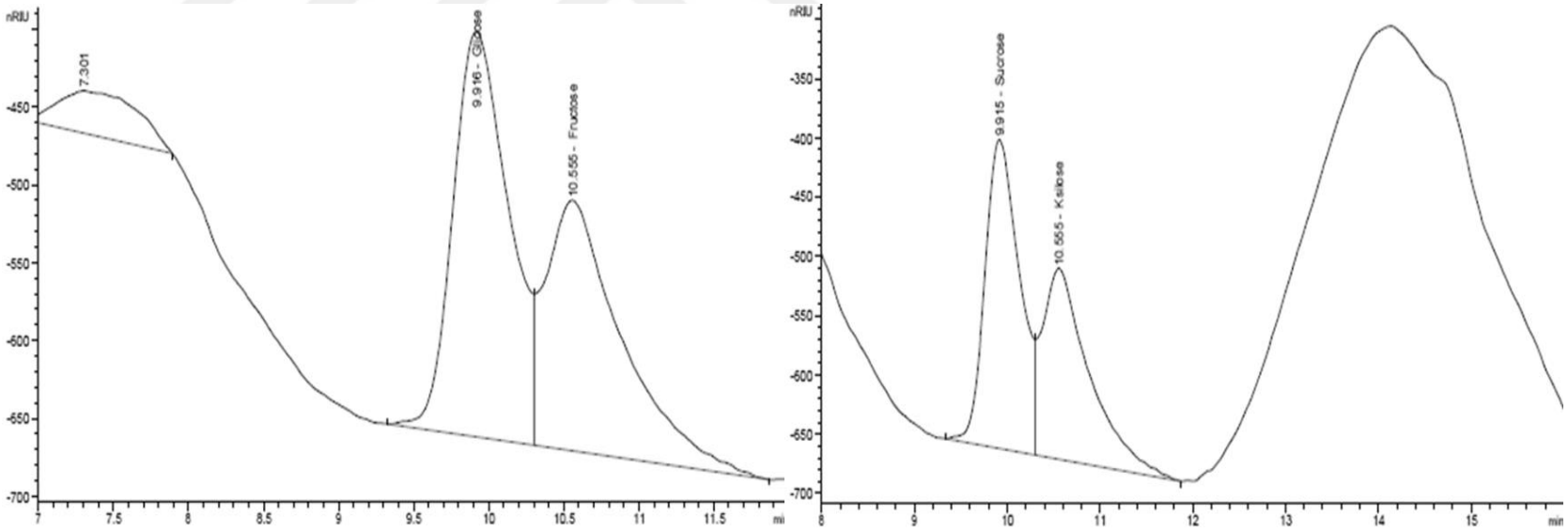
EK 42 Döç-2+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



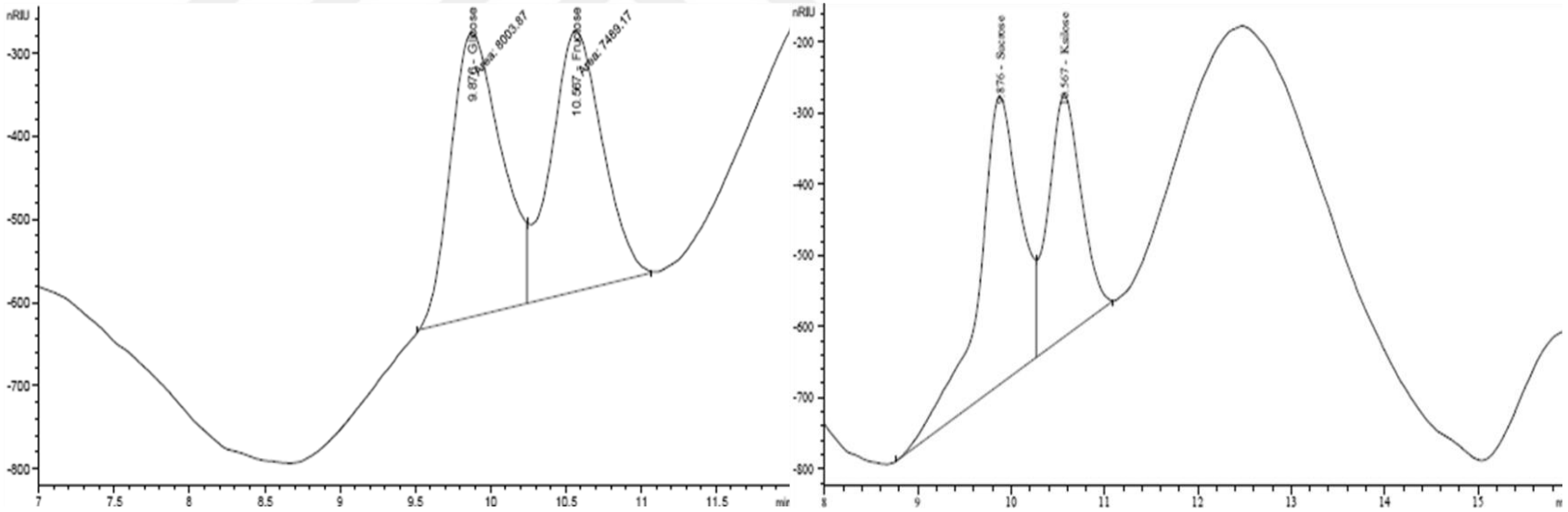
EK 43 Döç-2+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



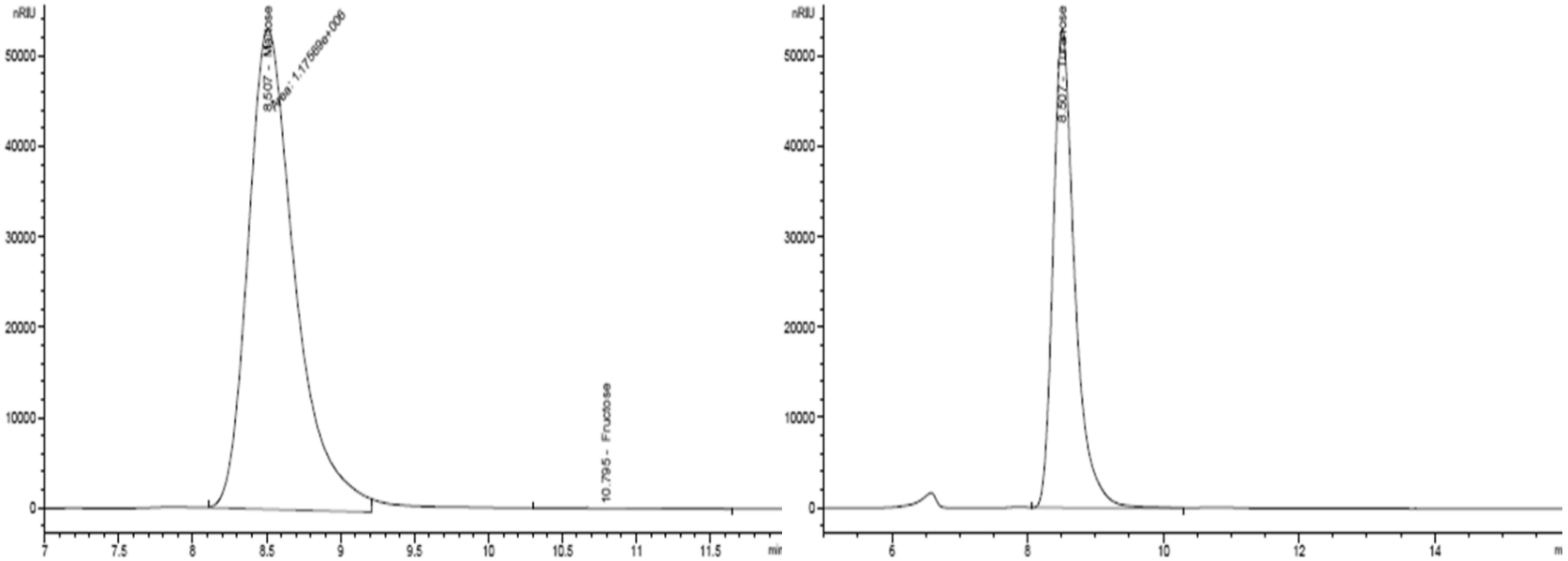
EK 44 Döç-2+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



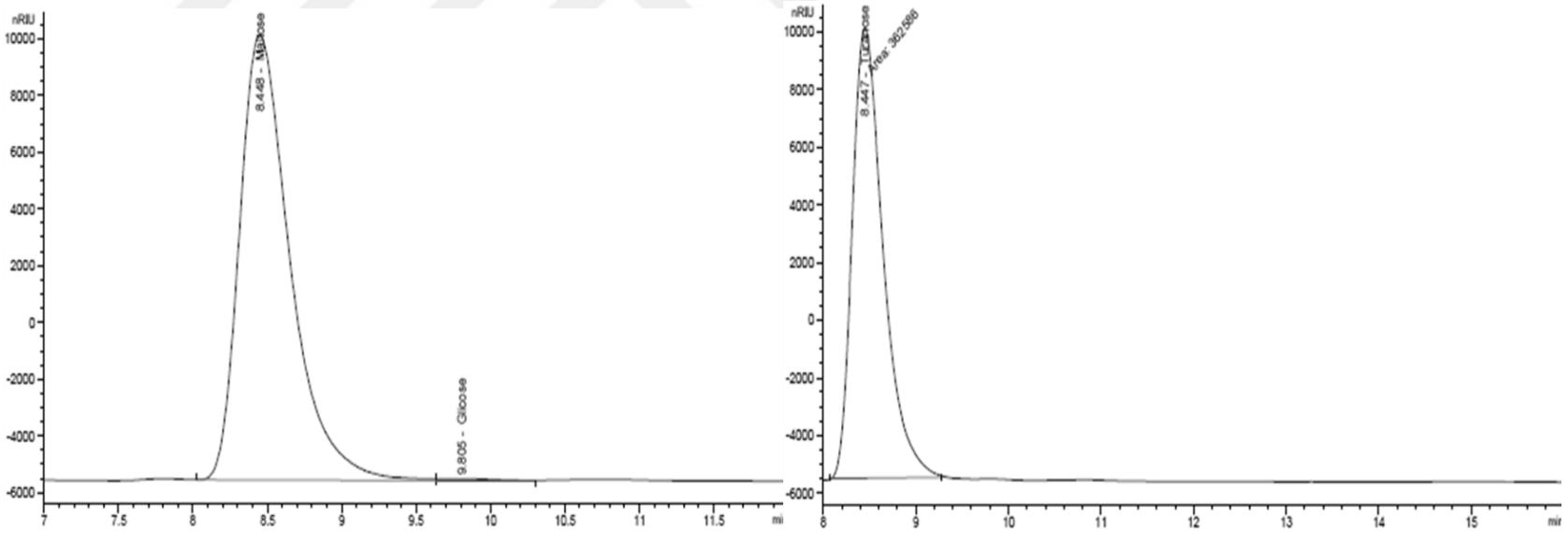
EK 45 Döç-2+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



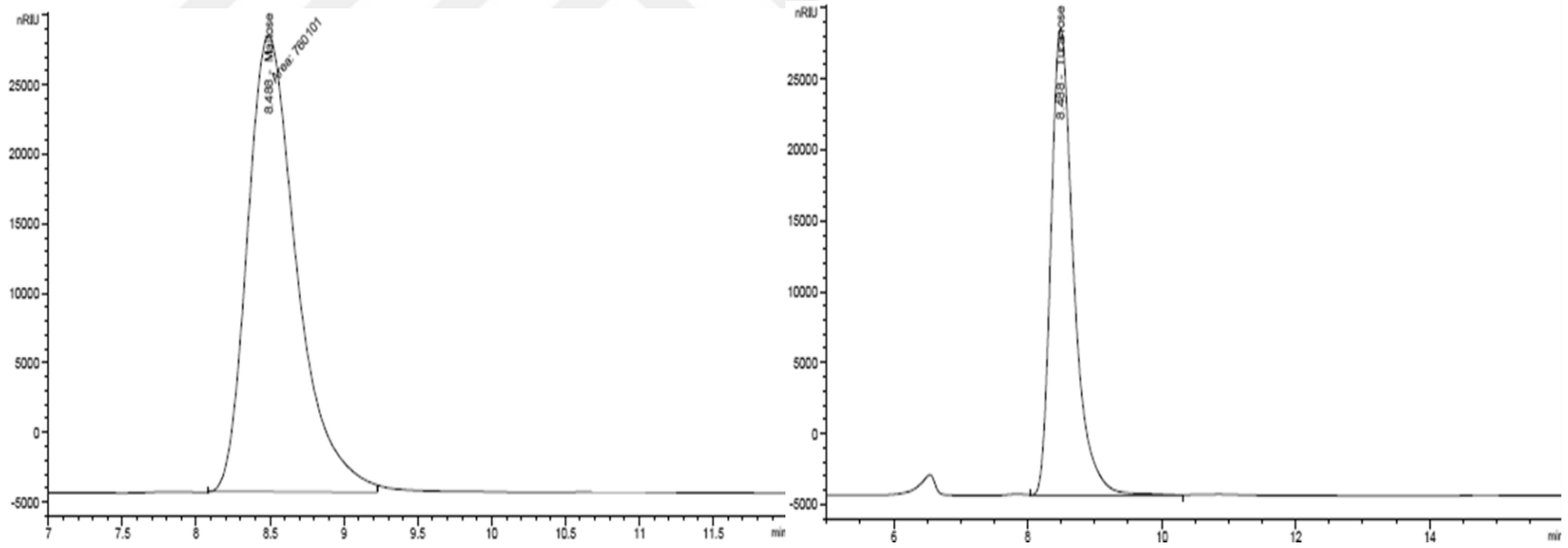
EK 46 Döç-3+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



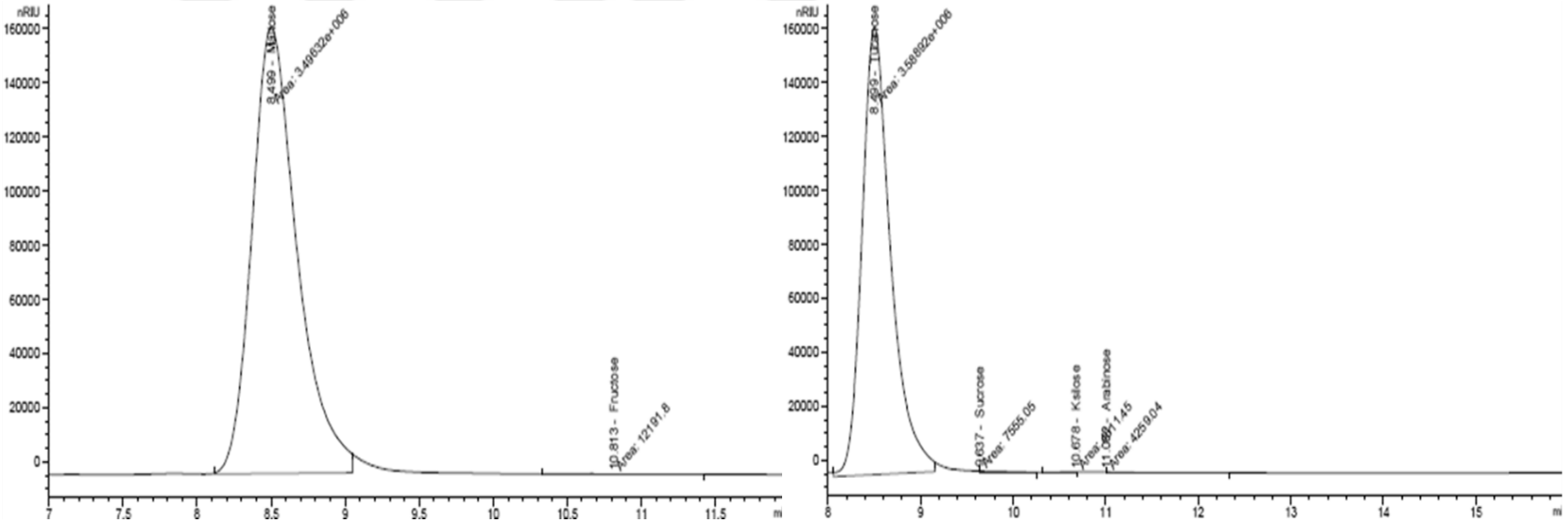
EK 47 Döç-3+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



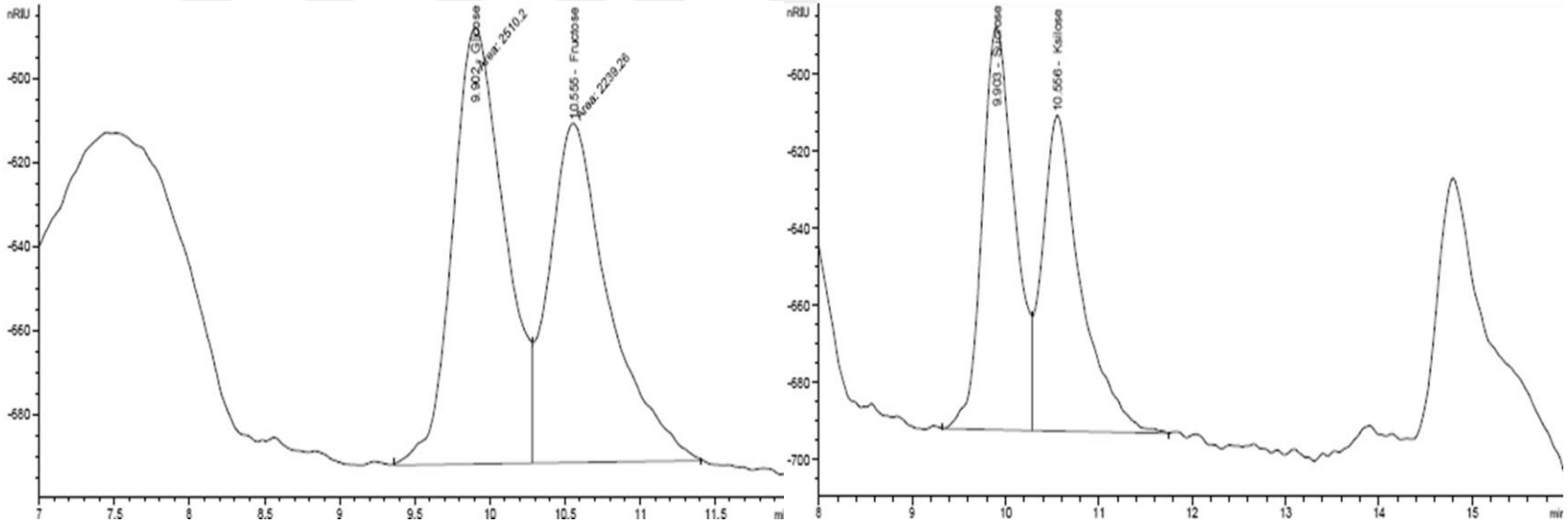
EK 48 Döç-3+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



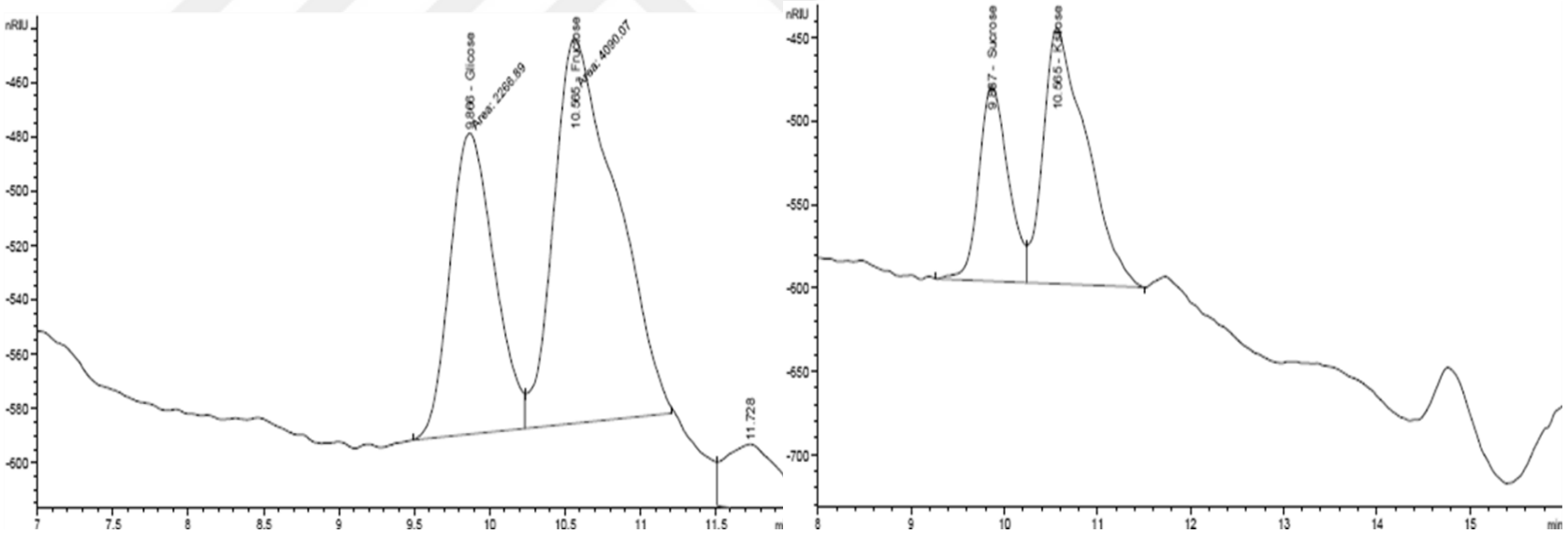
EK 49 Döç-3+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



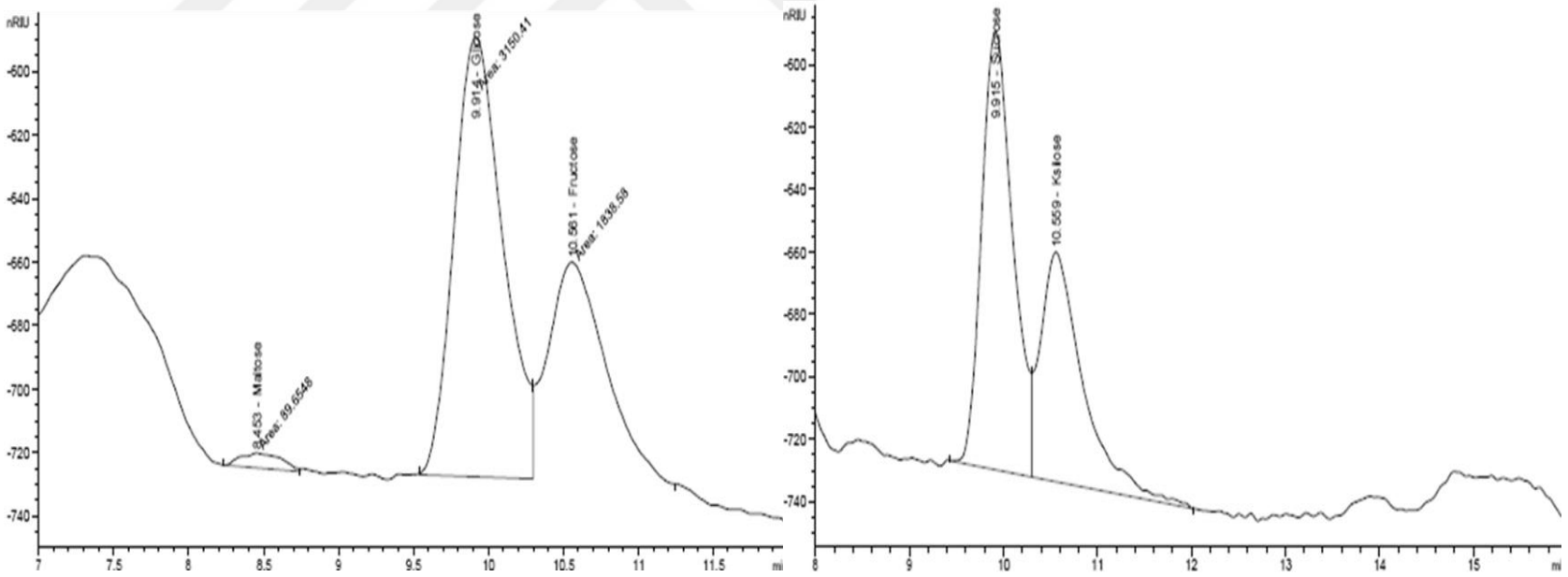
EK 50 Döç-4+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



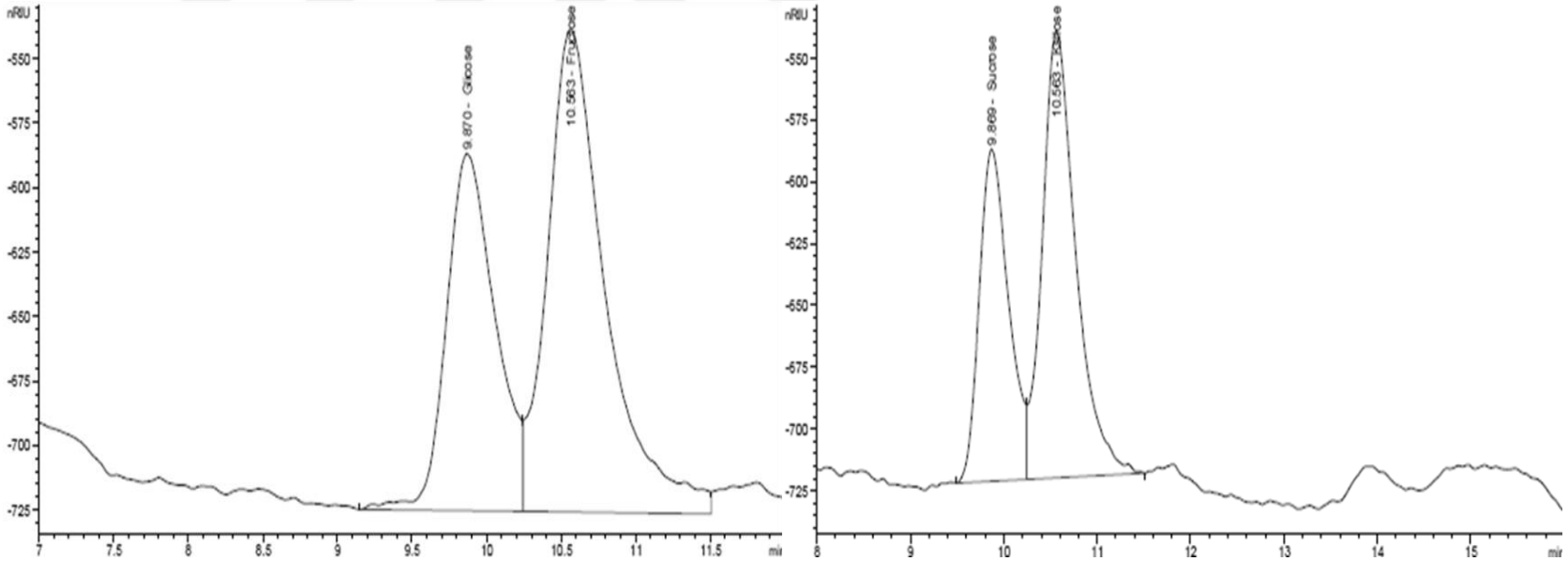
EK 51 Döç-4+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



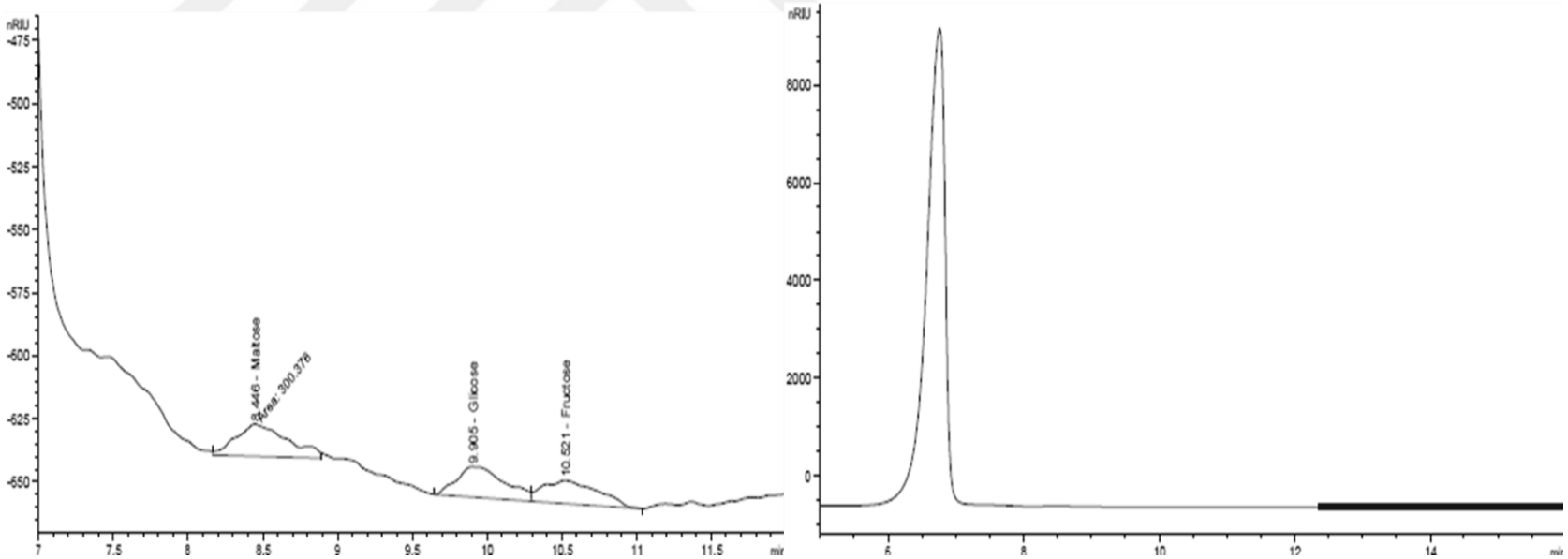
EK 52 Döç-4+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



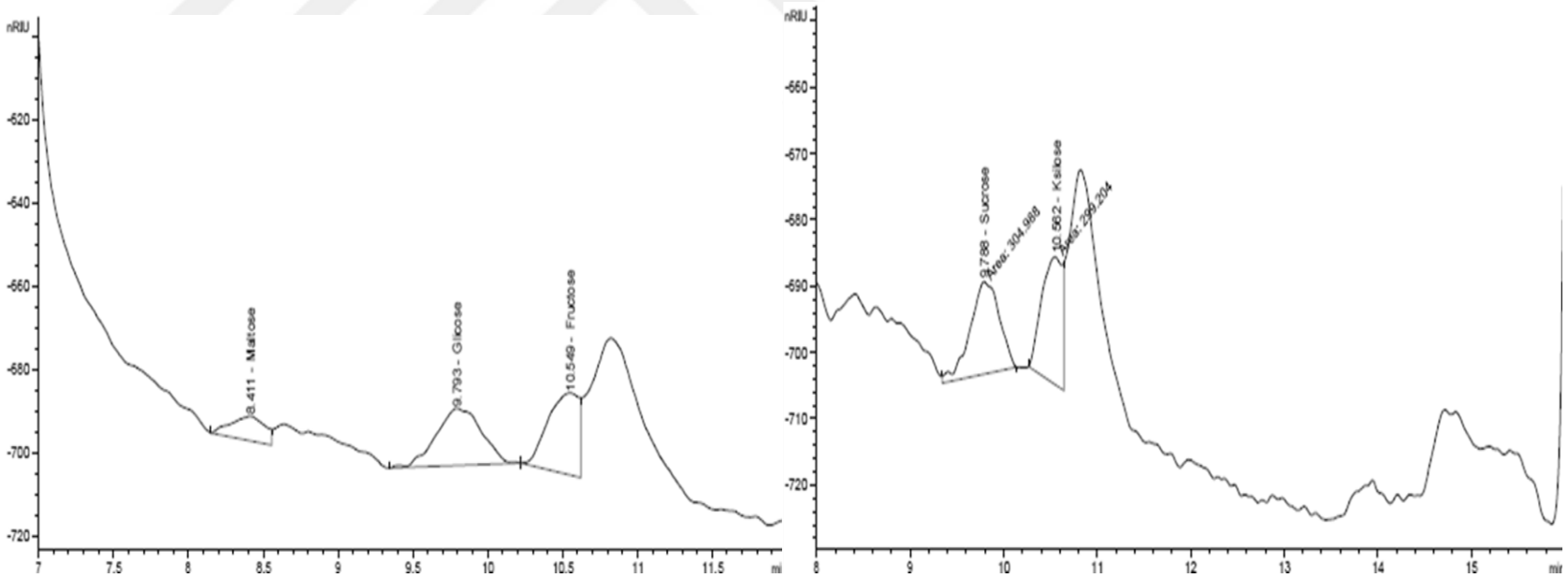
EK 53 Döç-4+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



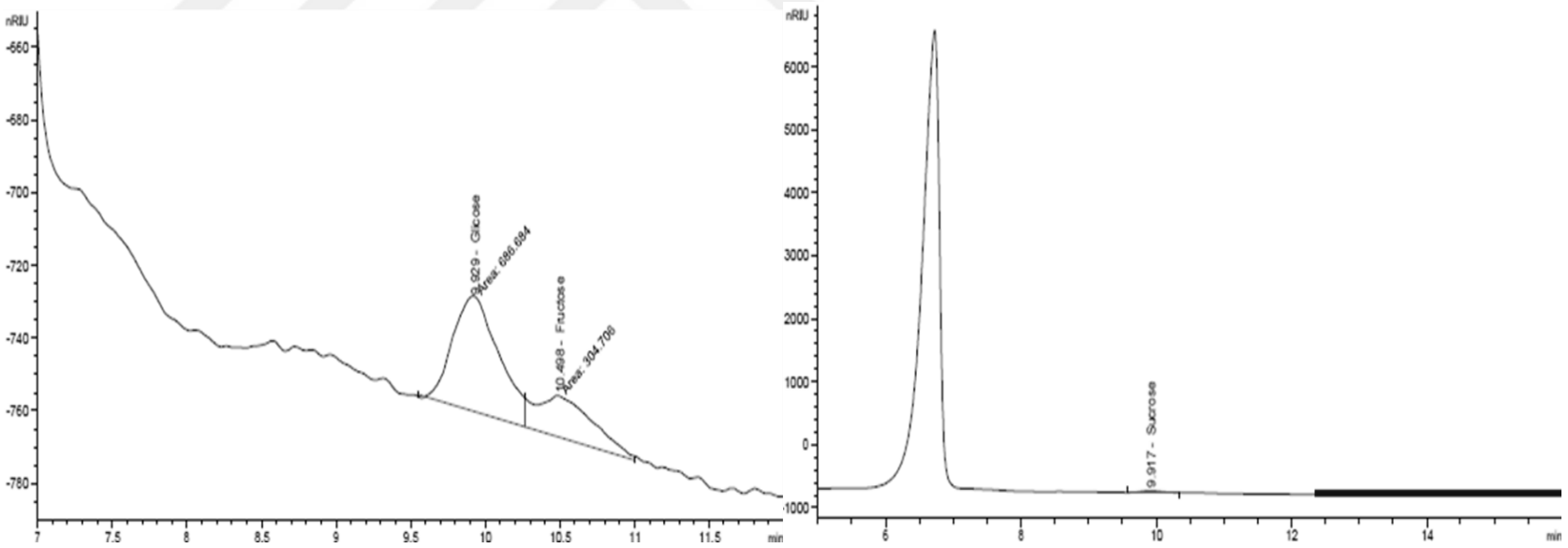
EK 54 Aseton+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



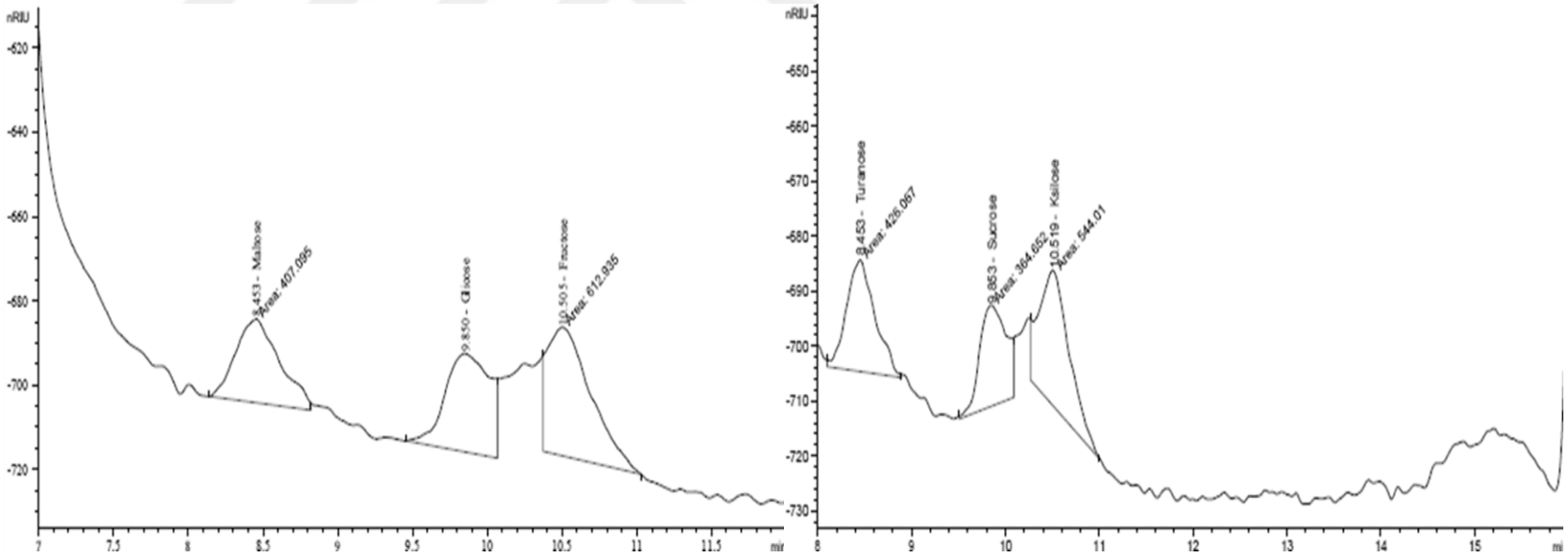
EK 55 Aseton+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



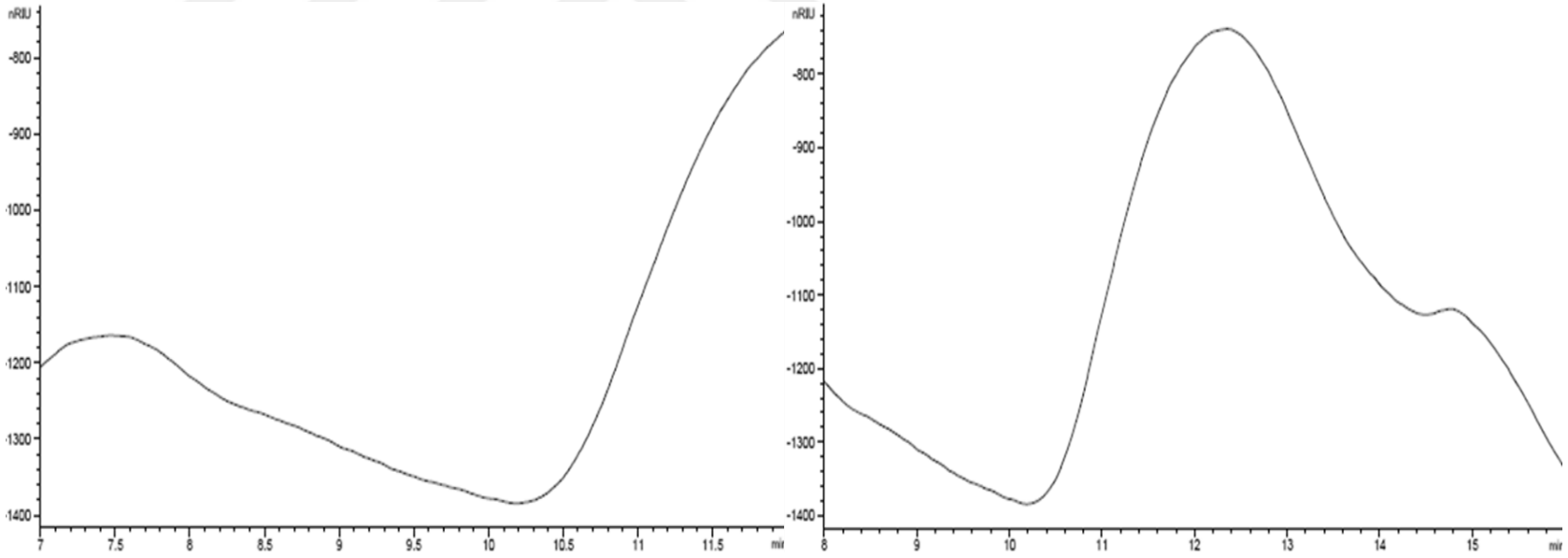
EK 56 Aseton+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



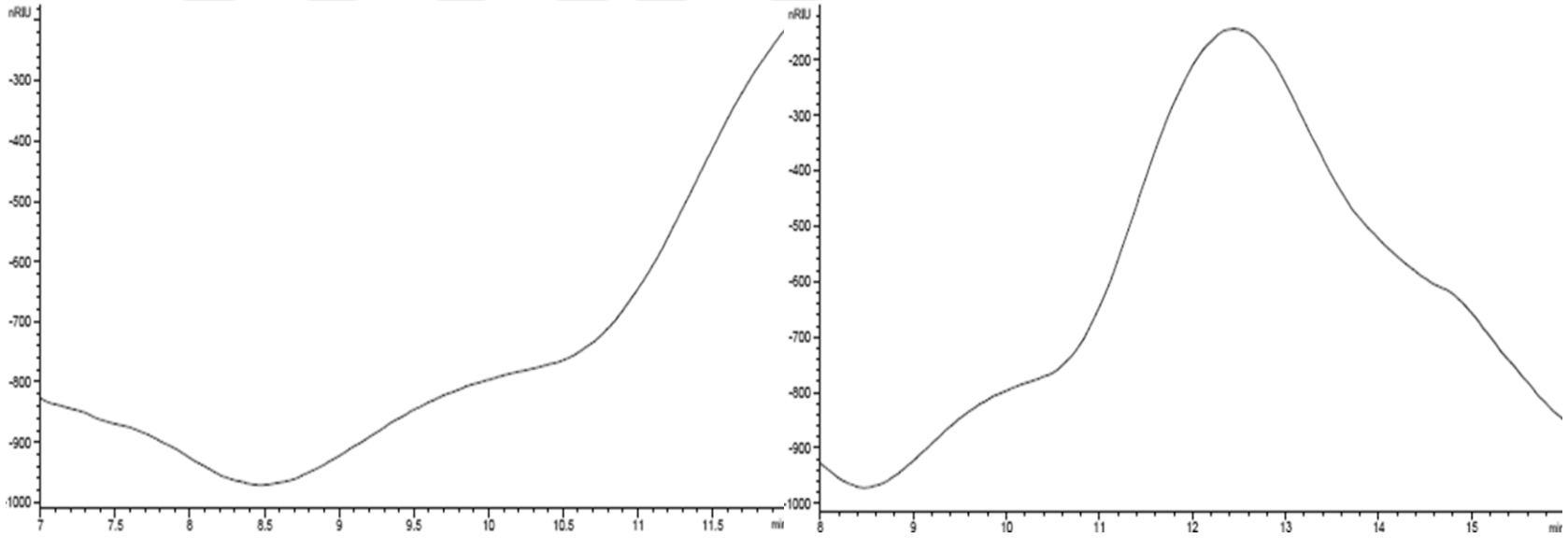
EK 57 Aseton+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



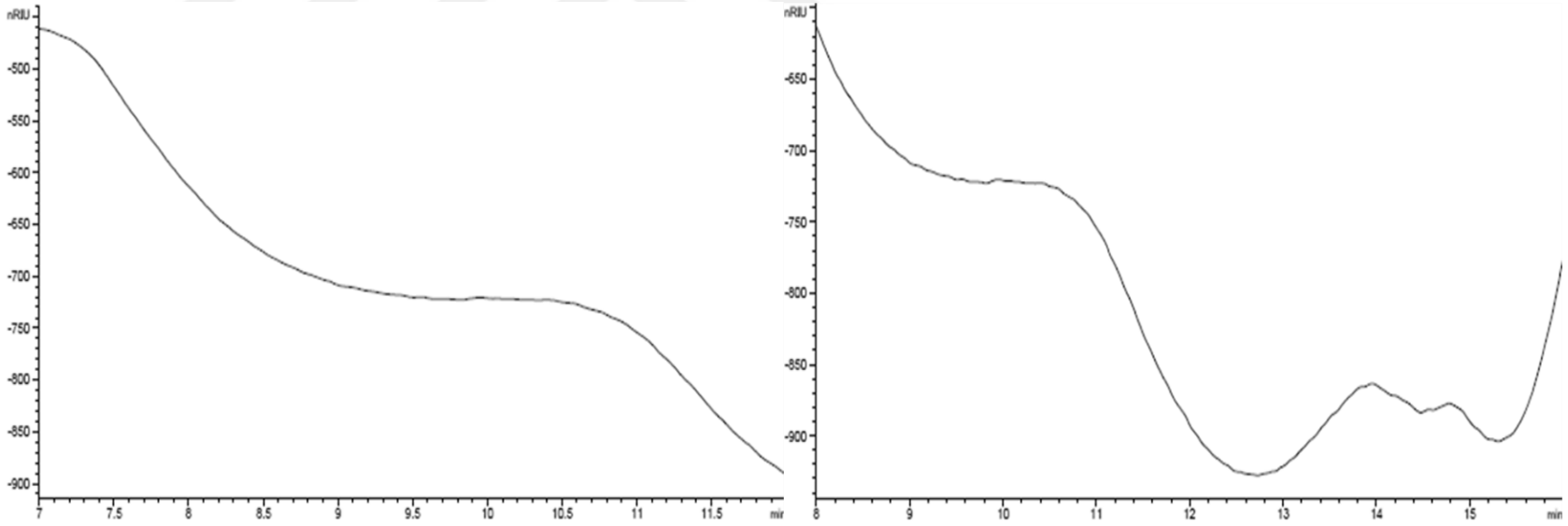
EK 58 Hekzan+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



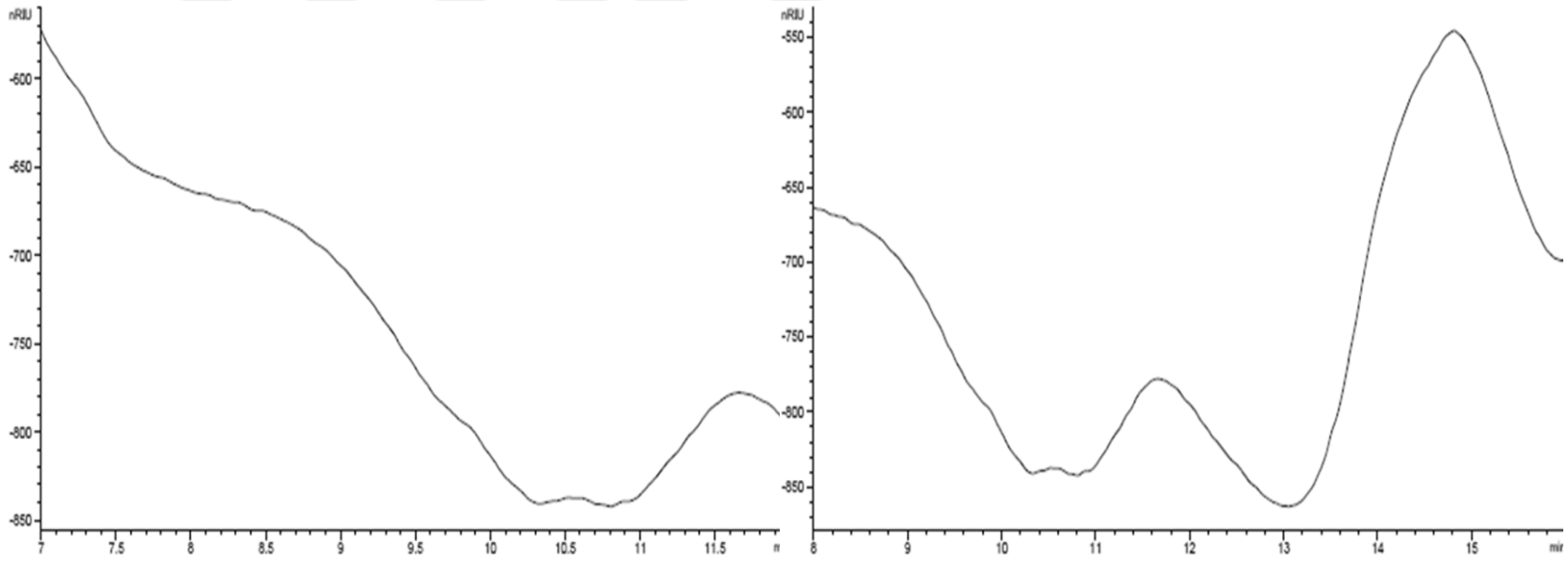
EK 59 Hekzan+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



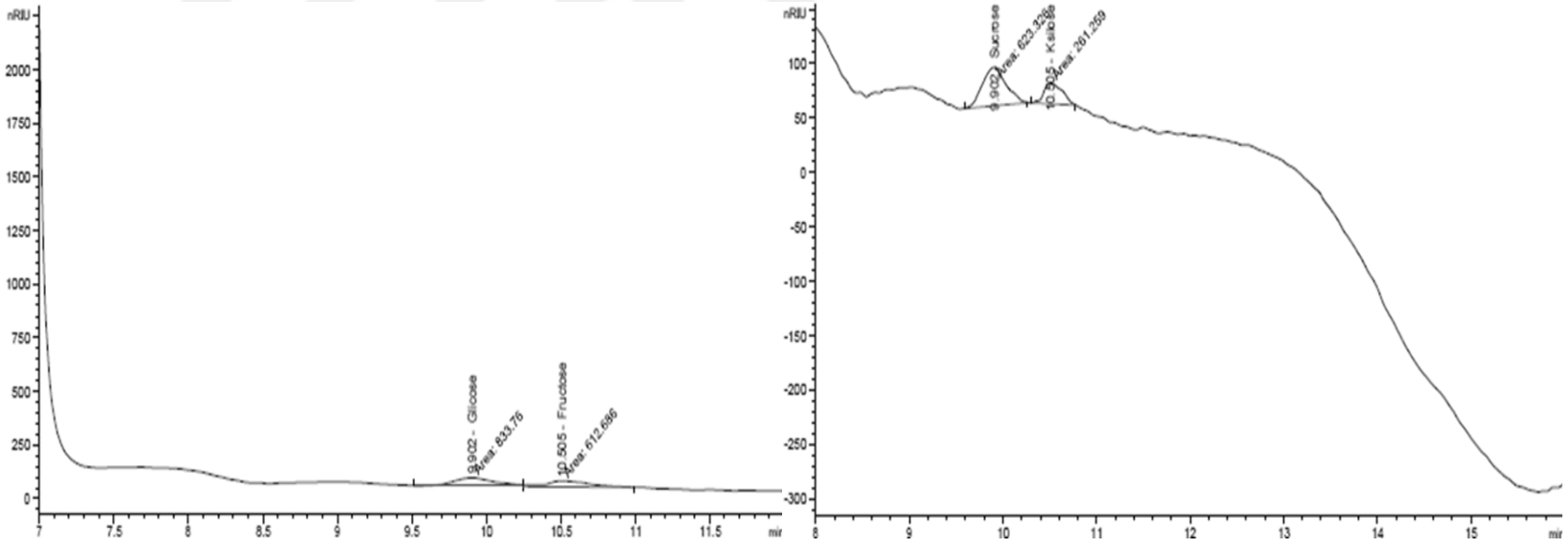
EK 60 Hekzan+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



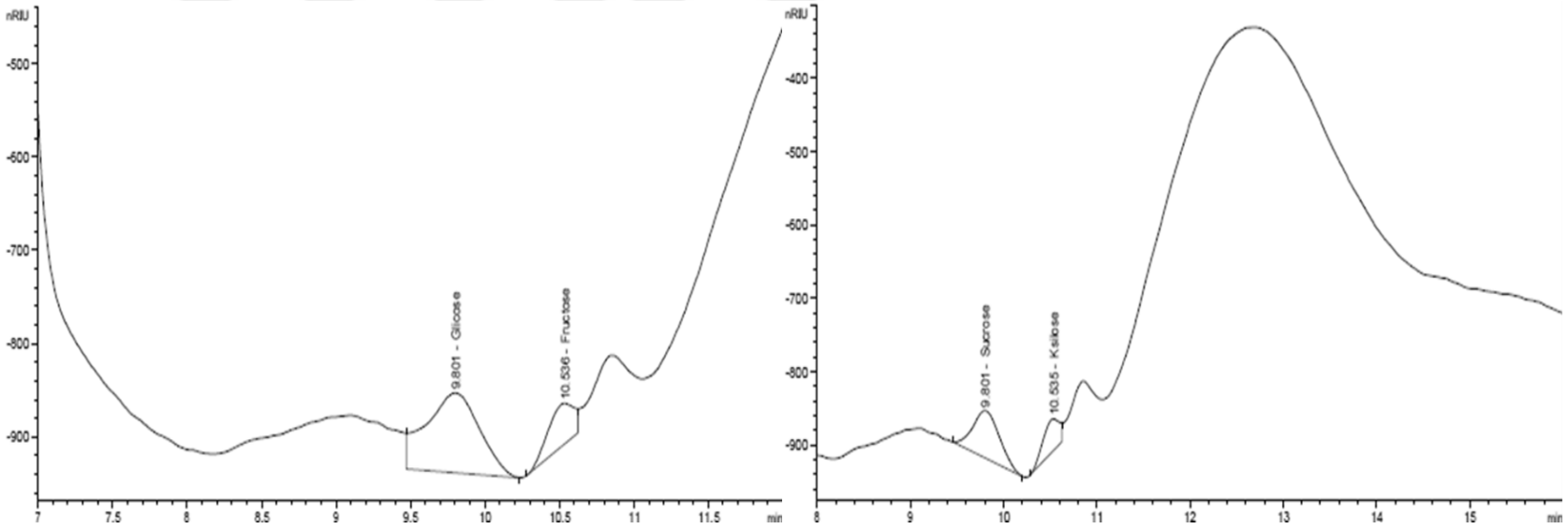
EK 61 Hekzan+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



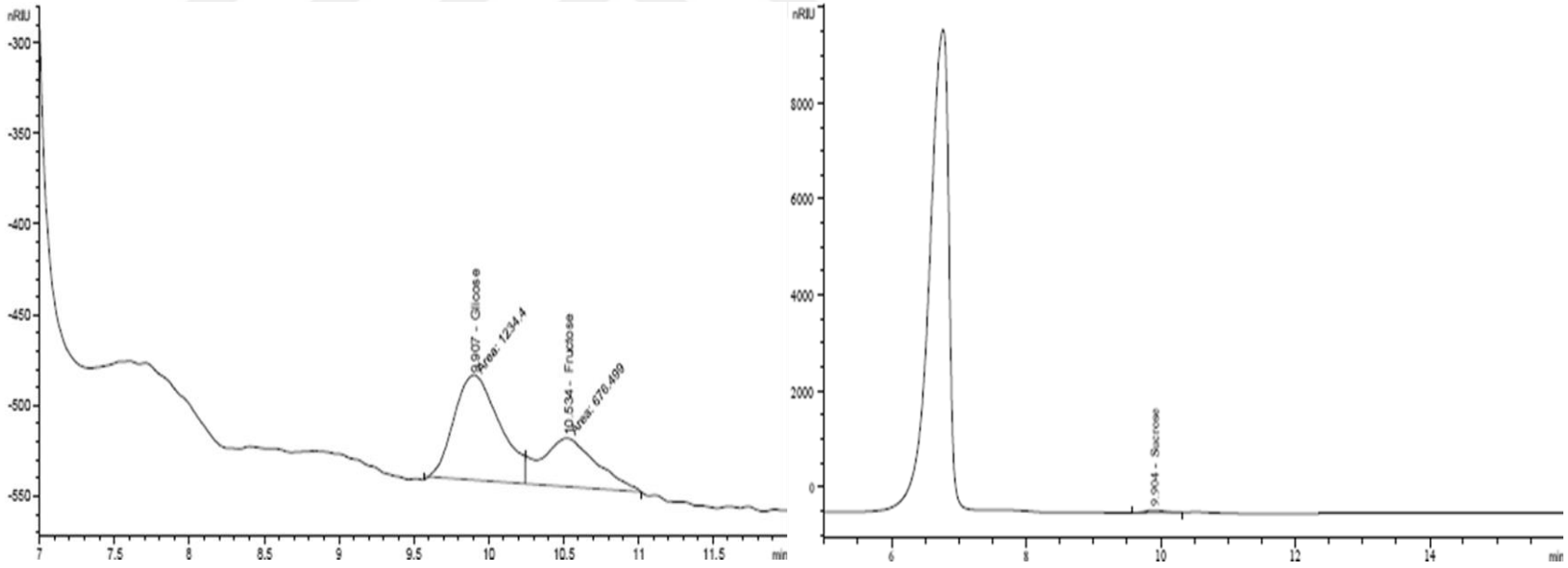
EK 62 Metanol+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



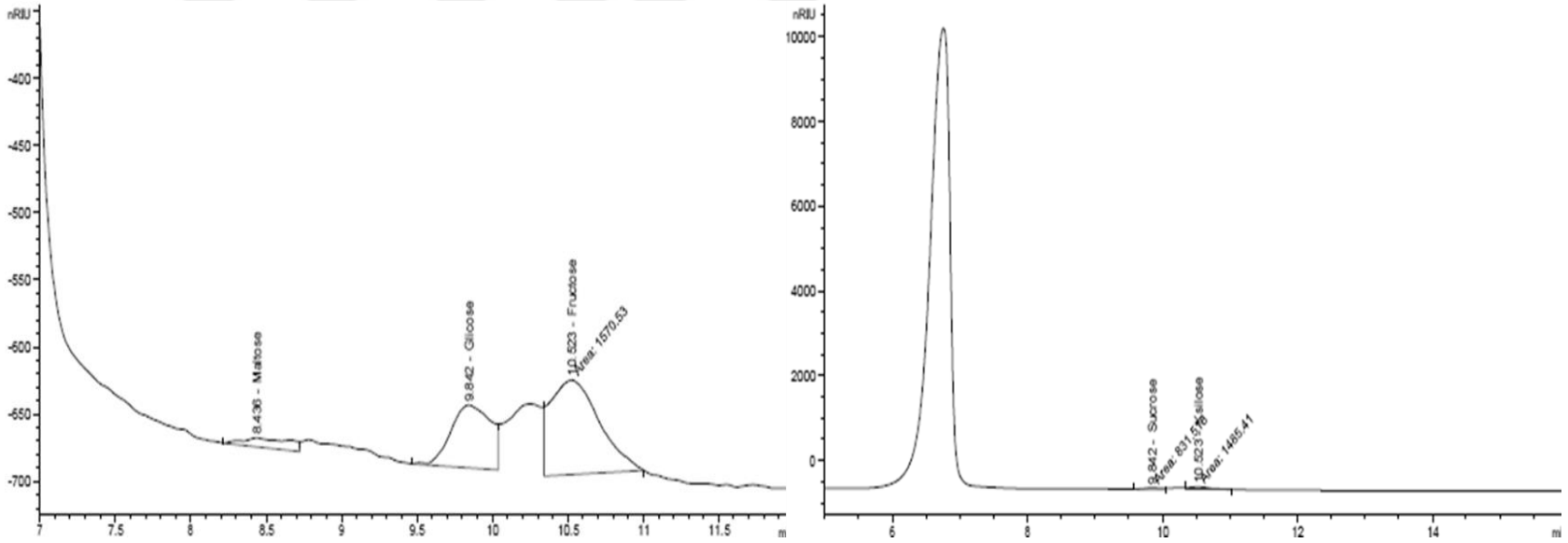
EK 63 Metanol+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



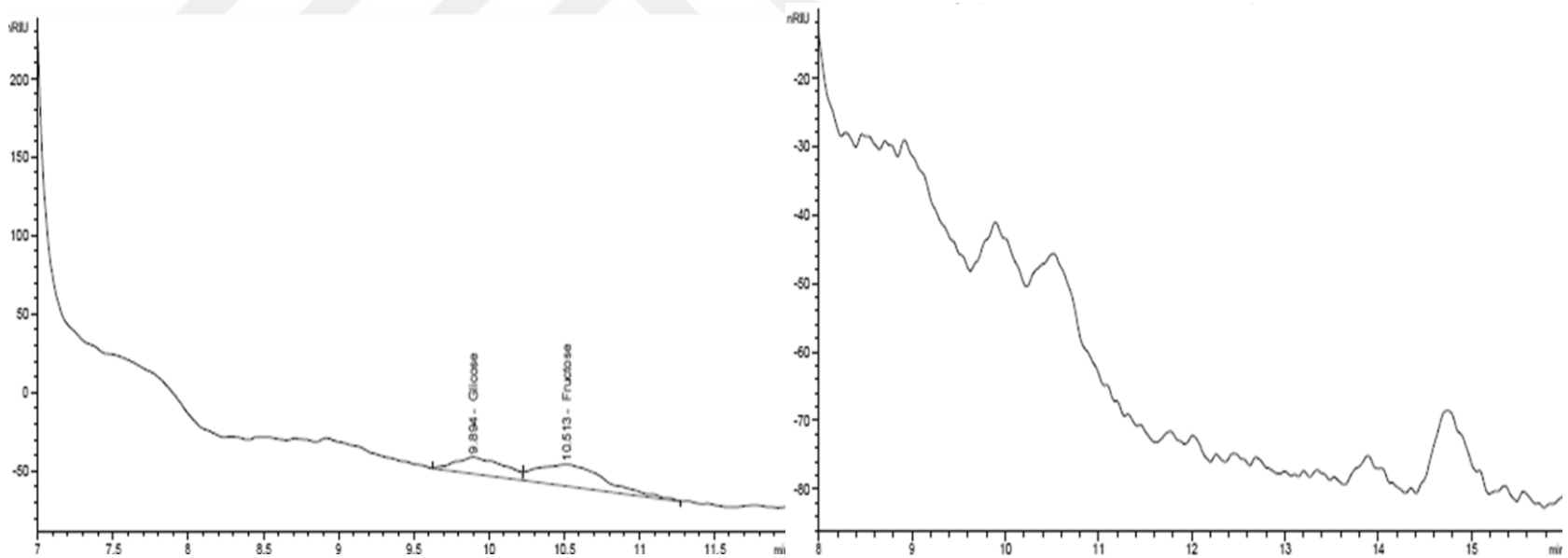
EK 64 Metanol+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



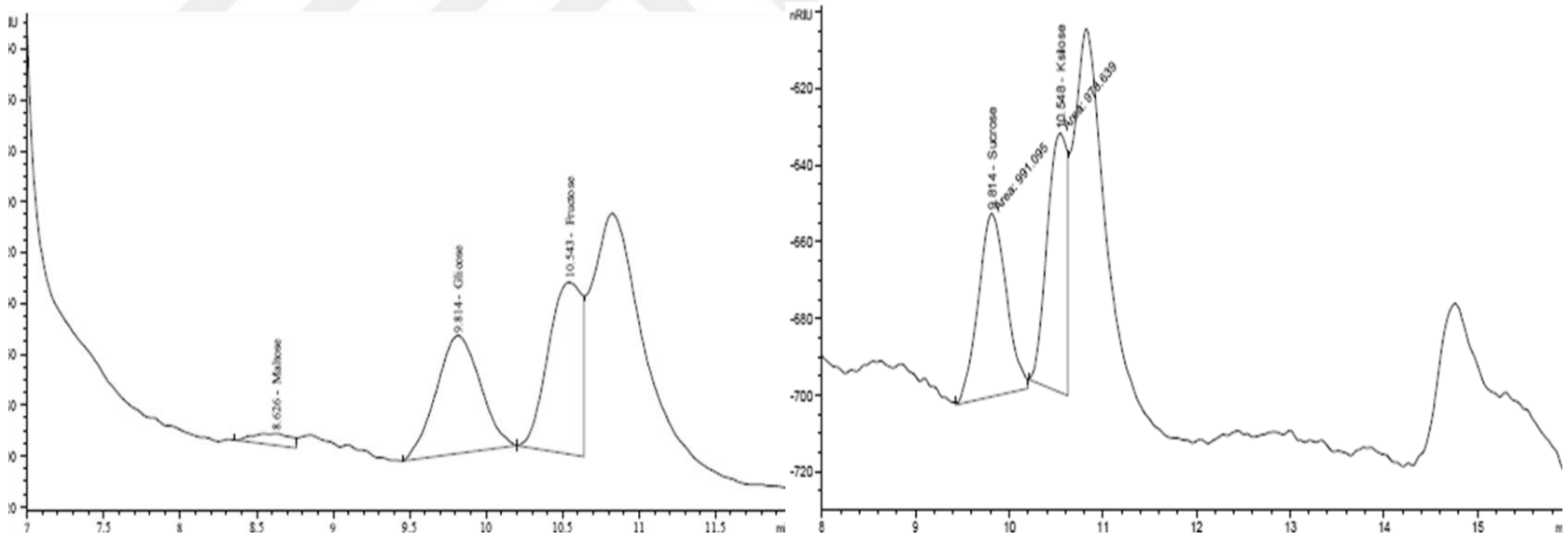
EK 65 Metanol+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



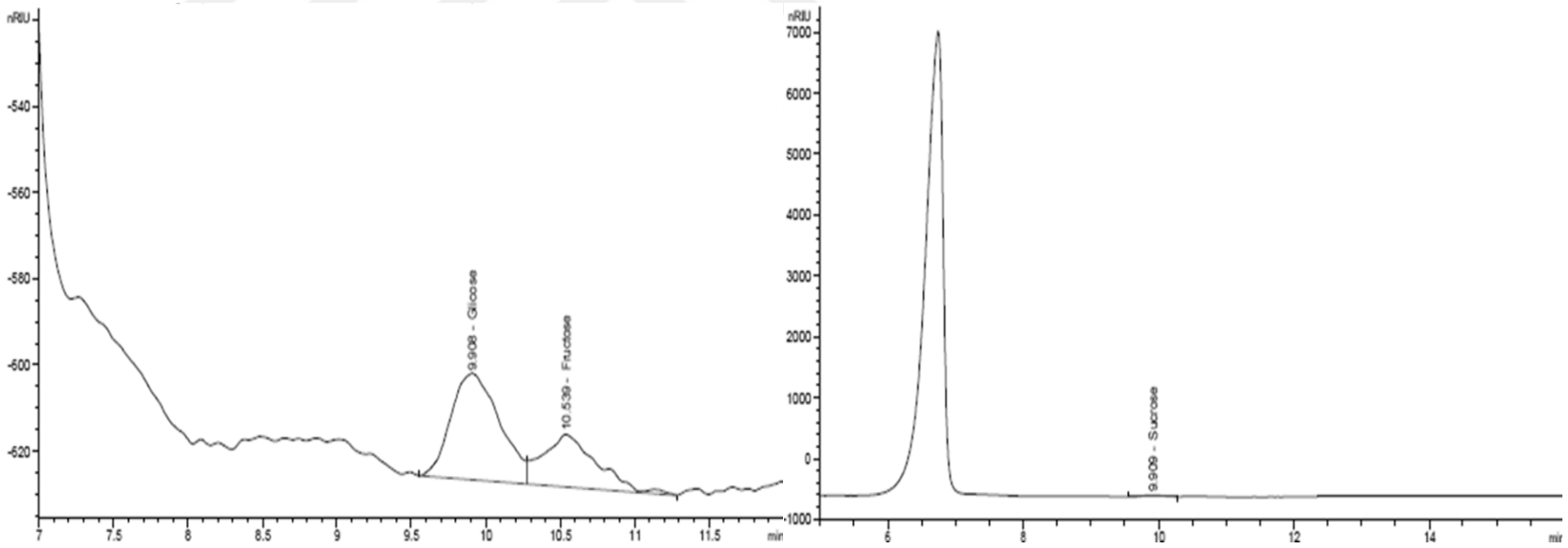
EK 66 Etanol+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



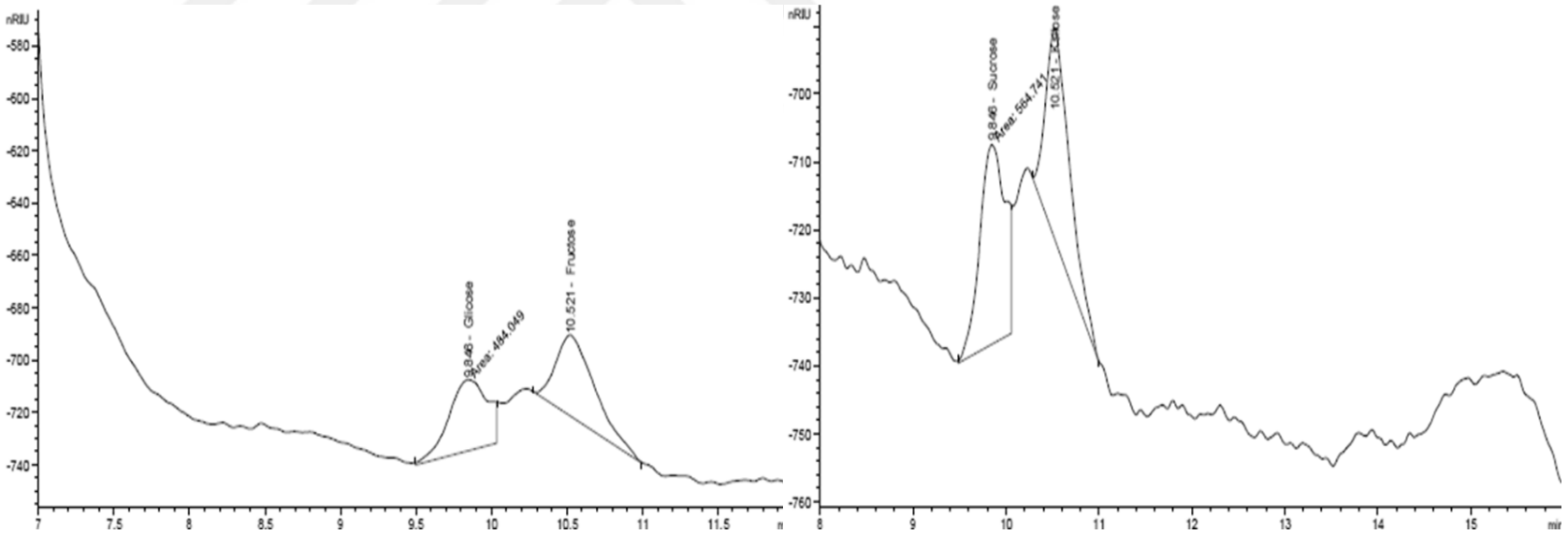
EK 67 Etanol+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



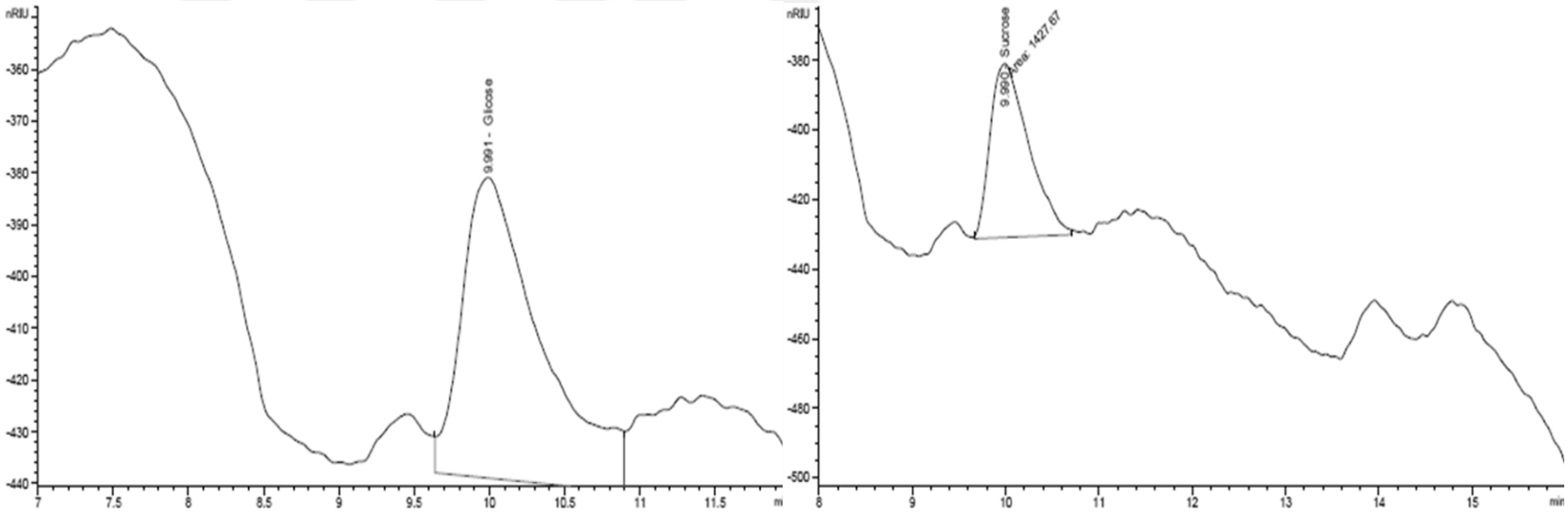
EK 68 Etanol+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



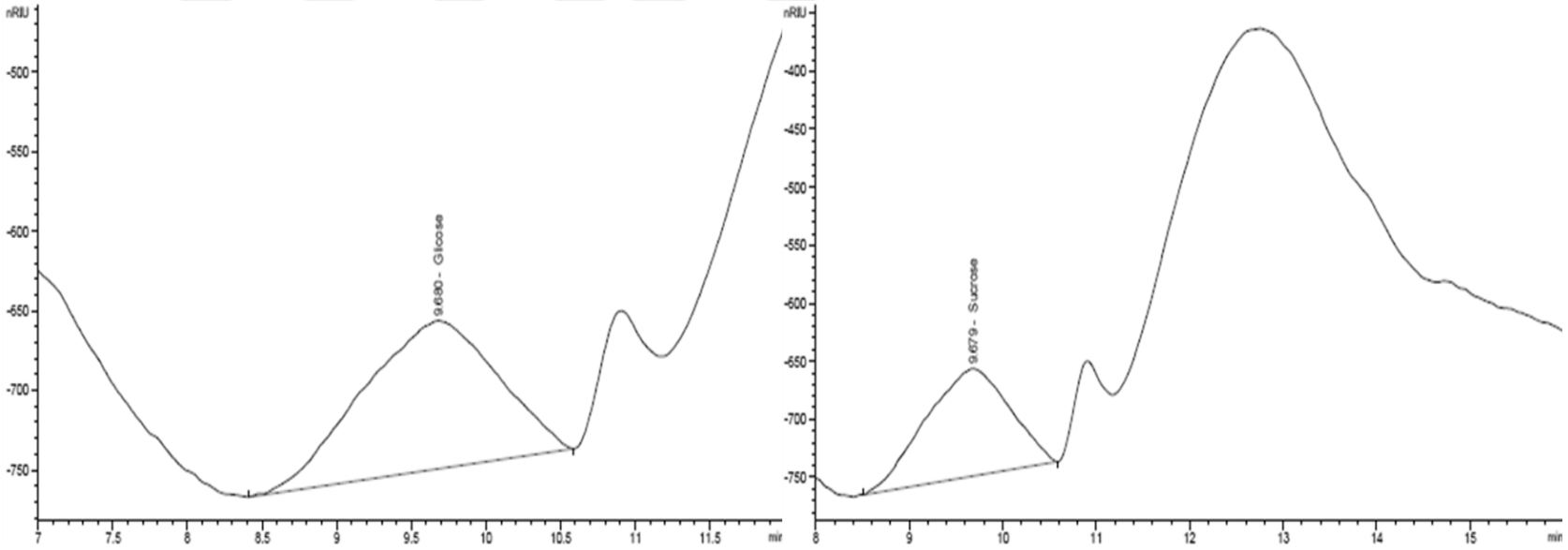
EK 69 Etanol+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



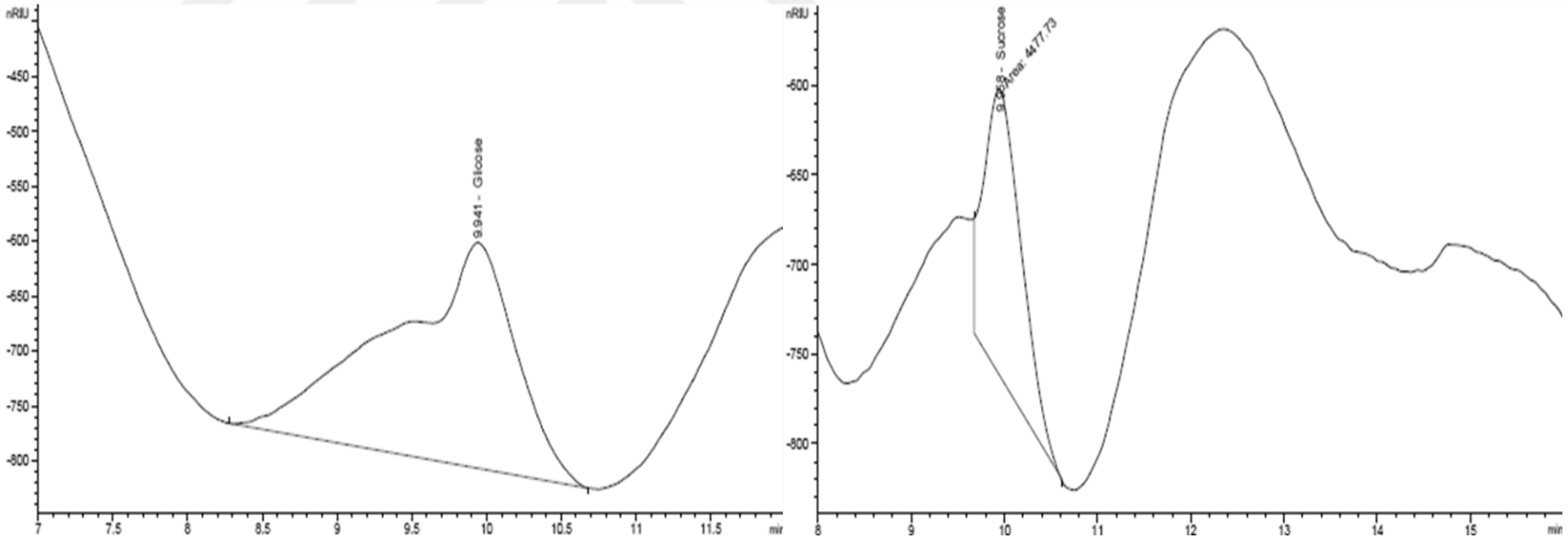
EK 70 Saf su+Kç HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



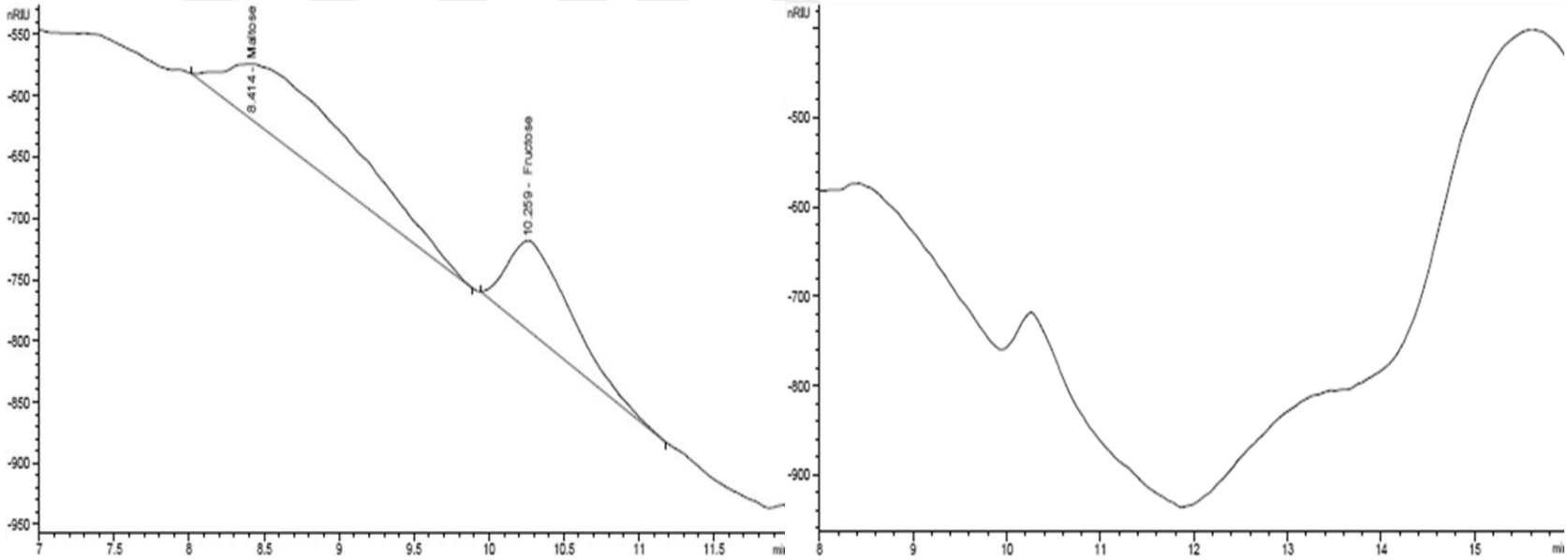
EK 71 Saf su+M HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



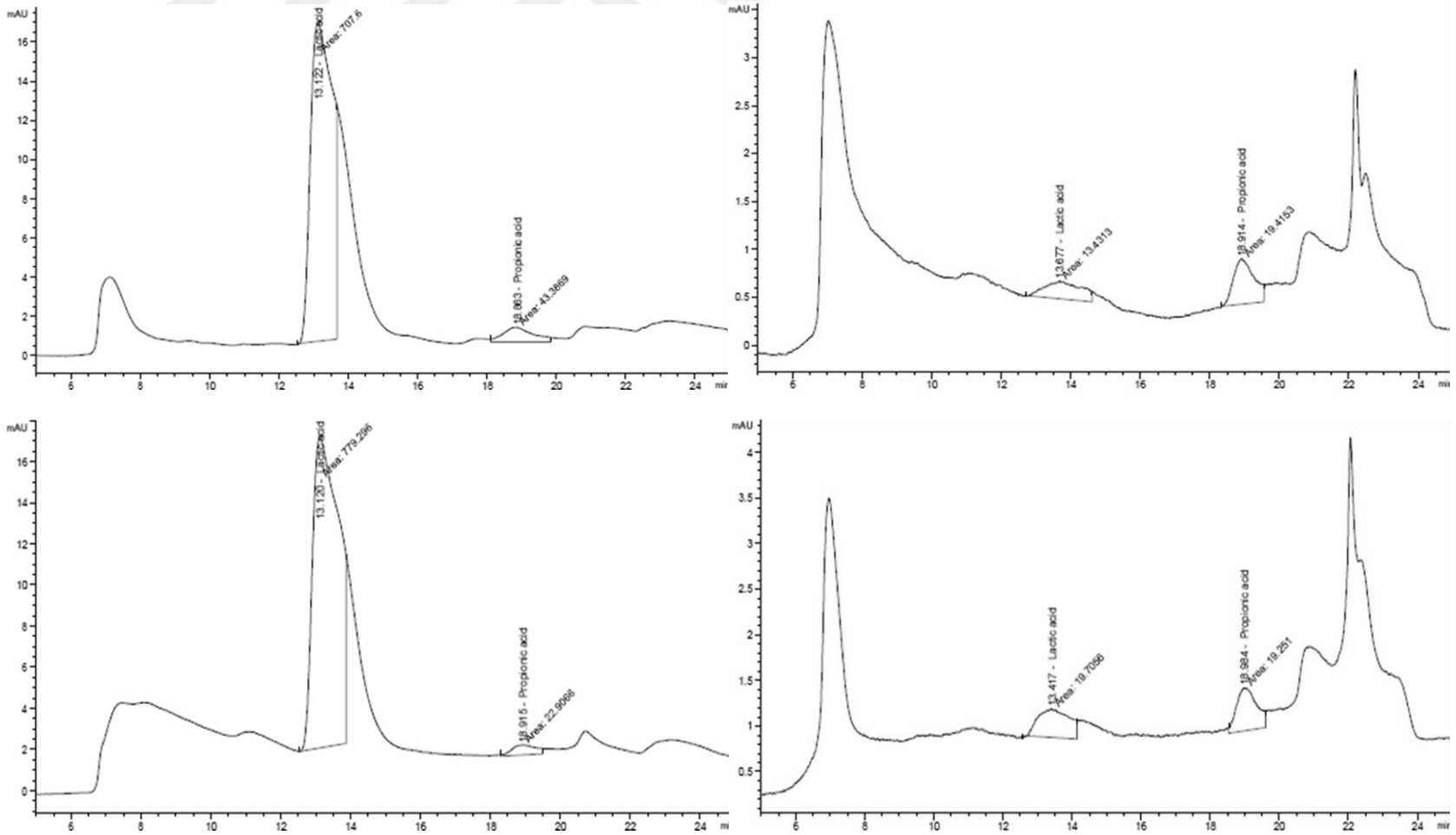
EK 72 Saf su+G HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



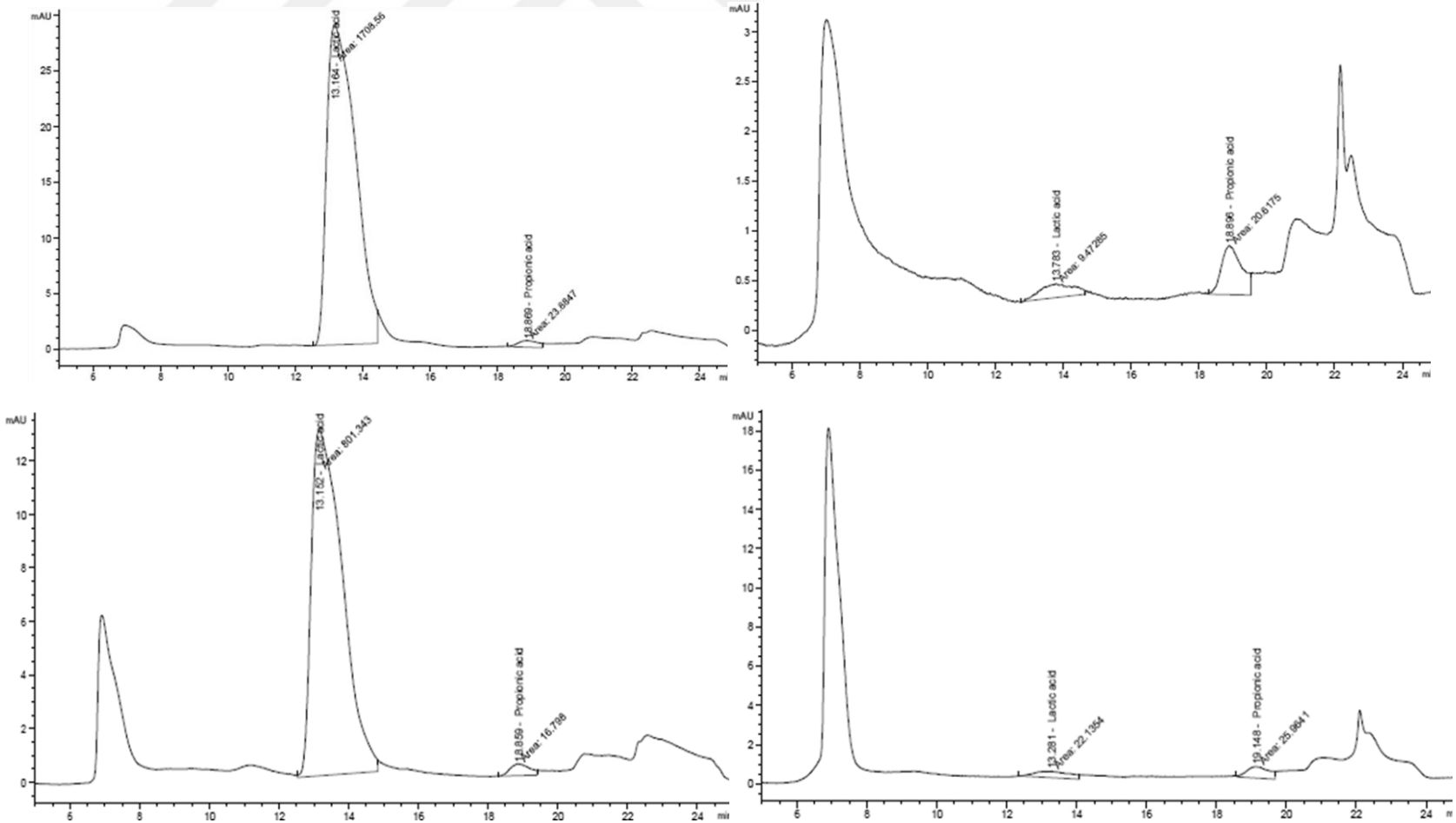
EK 73 Saf su+K HPLC Şeker Analizi Kromatogramı



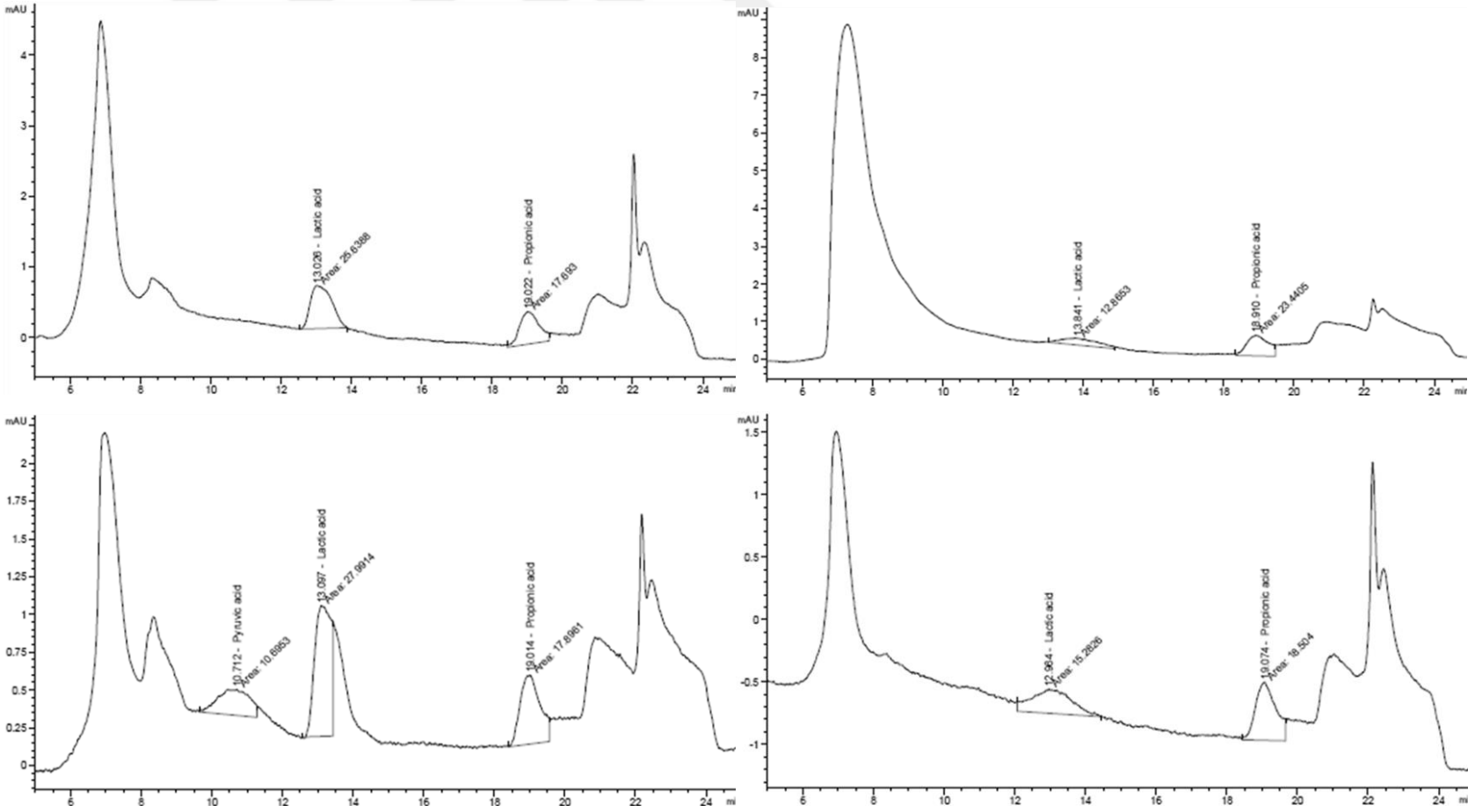
EK 74 Döç-1+Kç, Döç-1+M, Döç-1+G, Döç-1+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



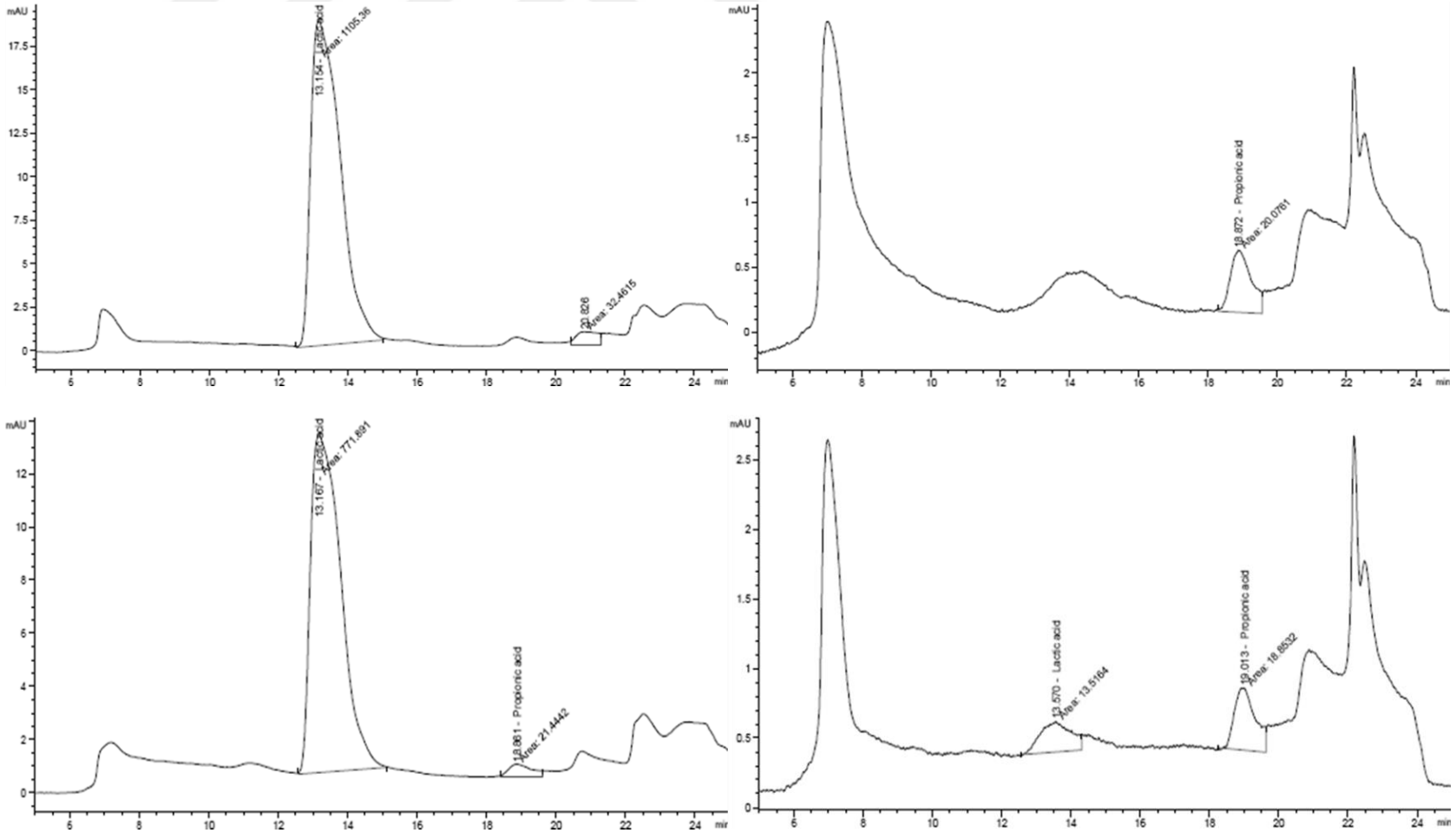
EK 75 Döç-2+Kç, Döç-2+M, Döç-2+G, Döç-2+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



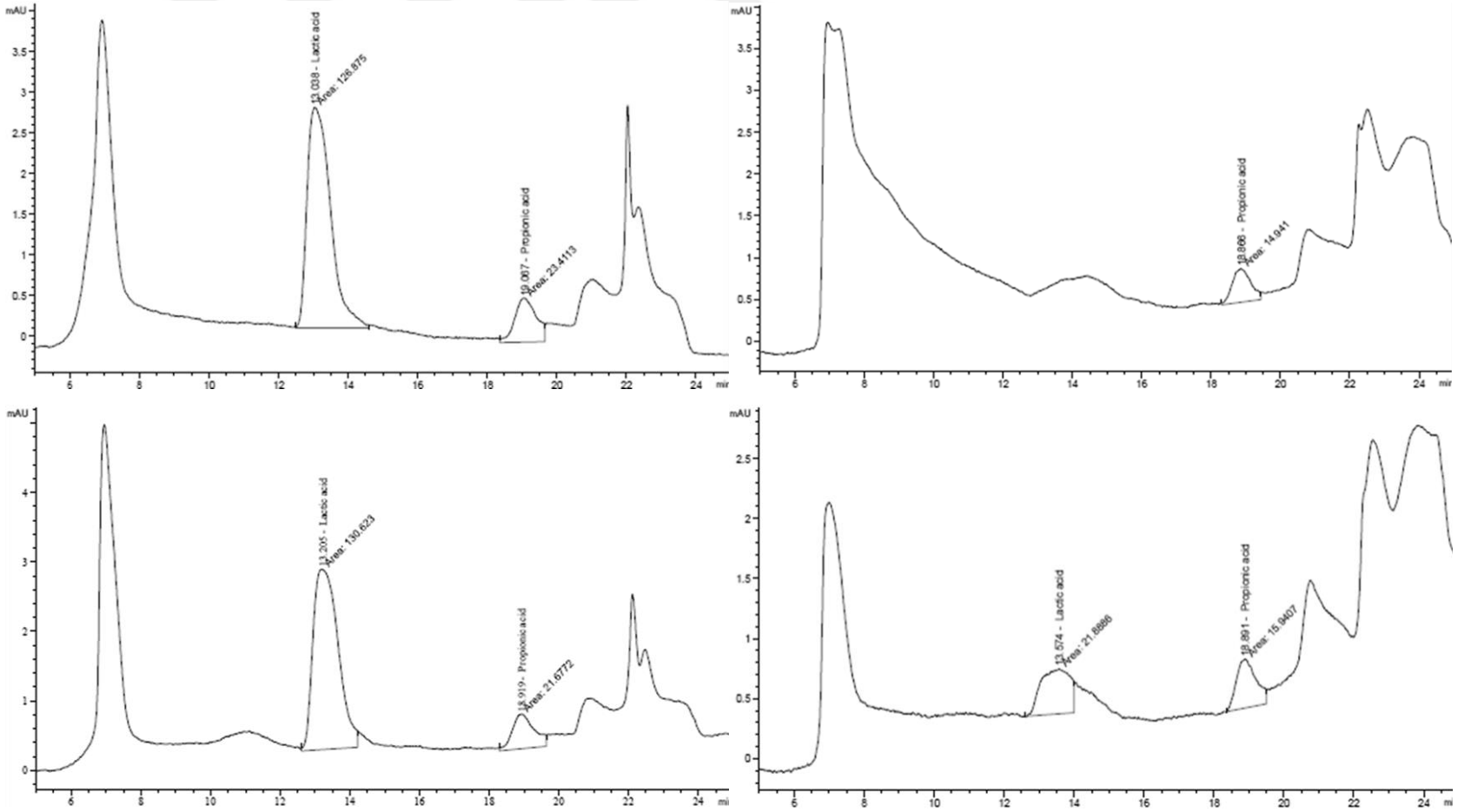
EK 76 Döç-3+Kç, Döç-3+M, Döç-3+G, Döç-3+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



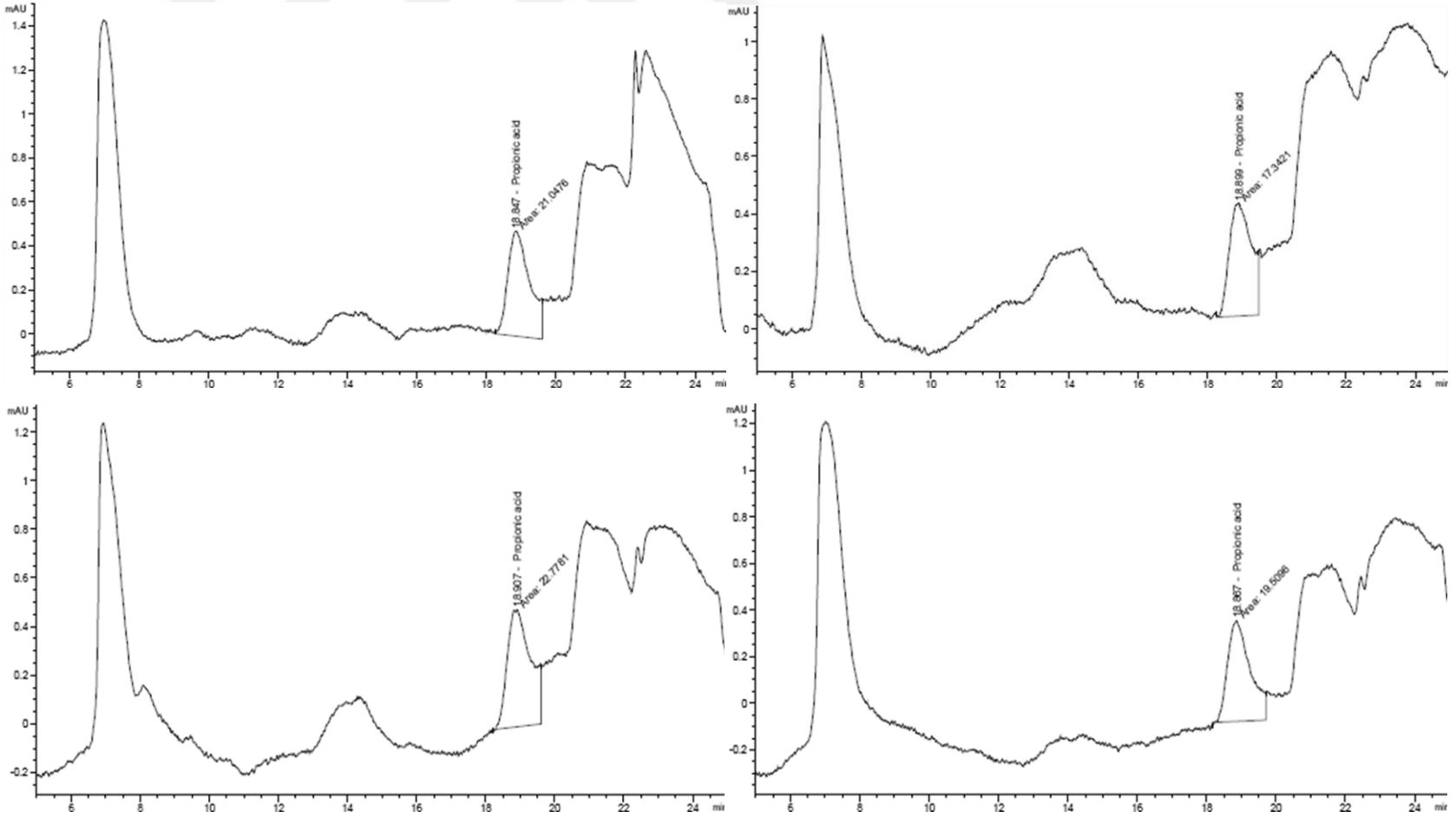
EK 77 Döç-4+Kç, Döç-4+M, Döç-4+G, Döç-4+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



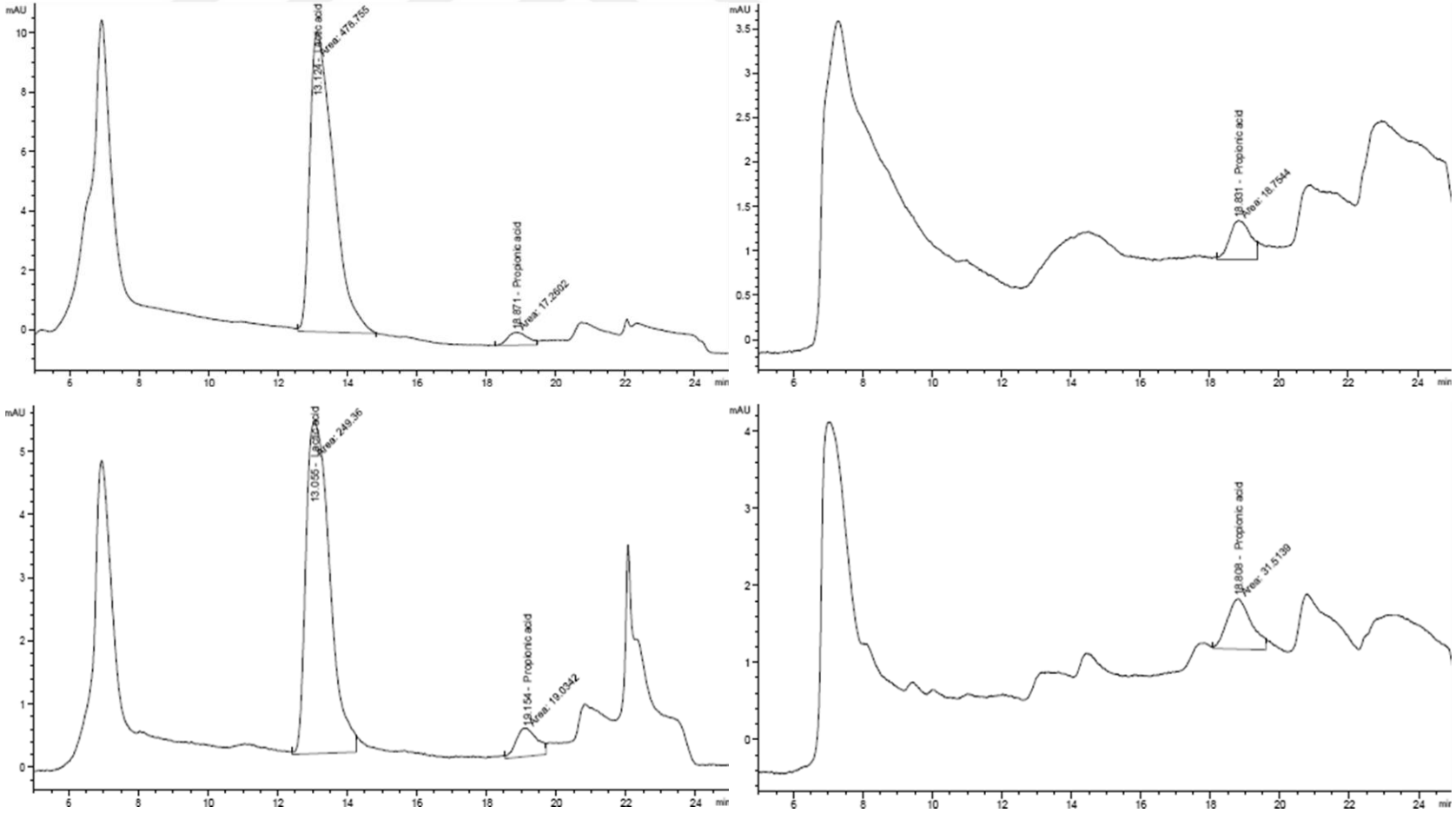
EK 78 Aseton+Kç, Aseton +M, Aseton +G, Aseton +K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



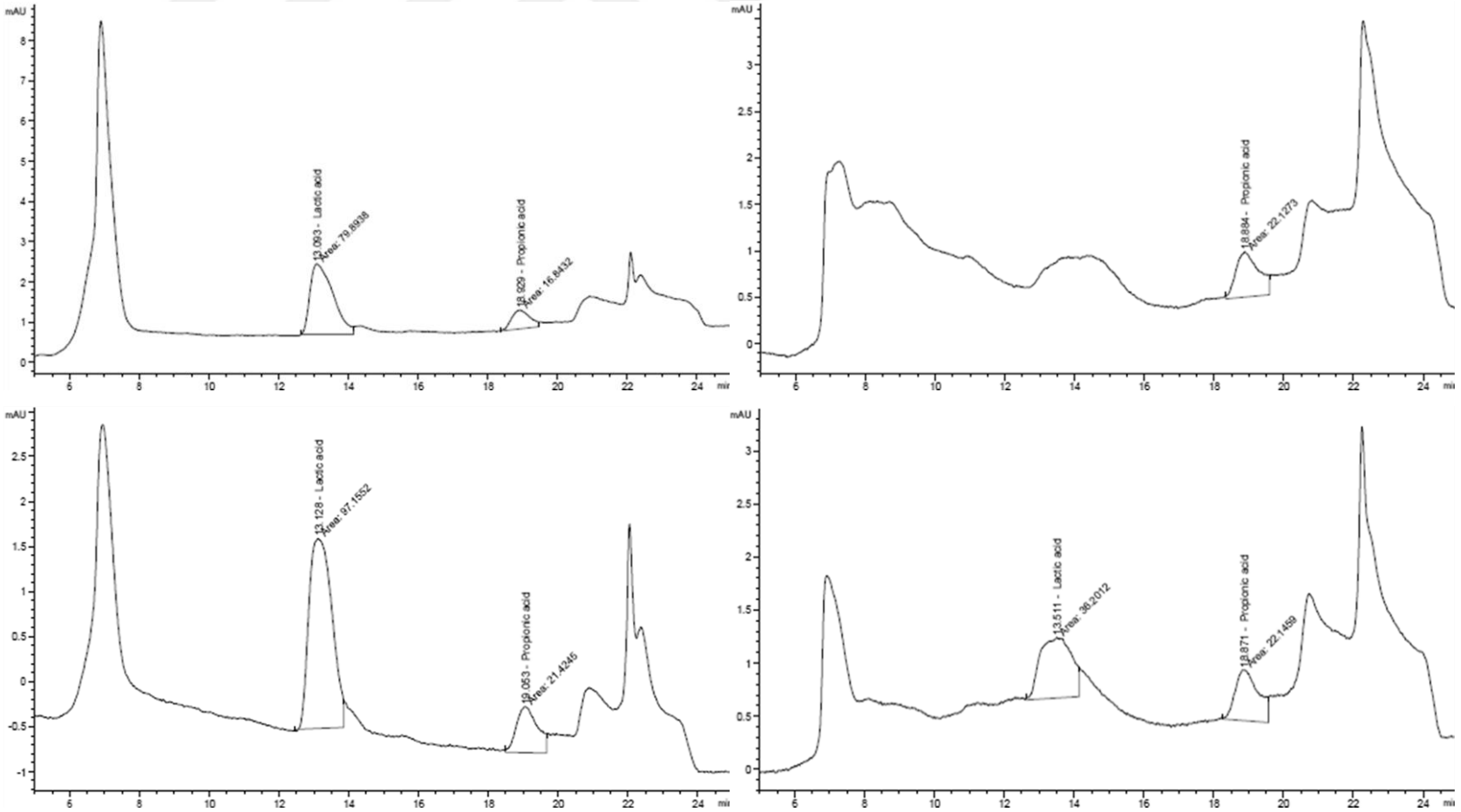
EK 79 Hekzan+Kç, Hekzan +M, Hekzan +G, Hekzan +K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



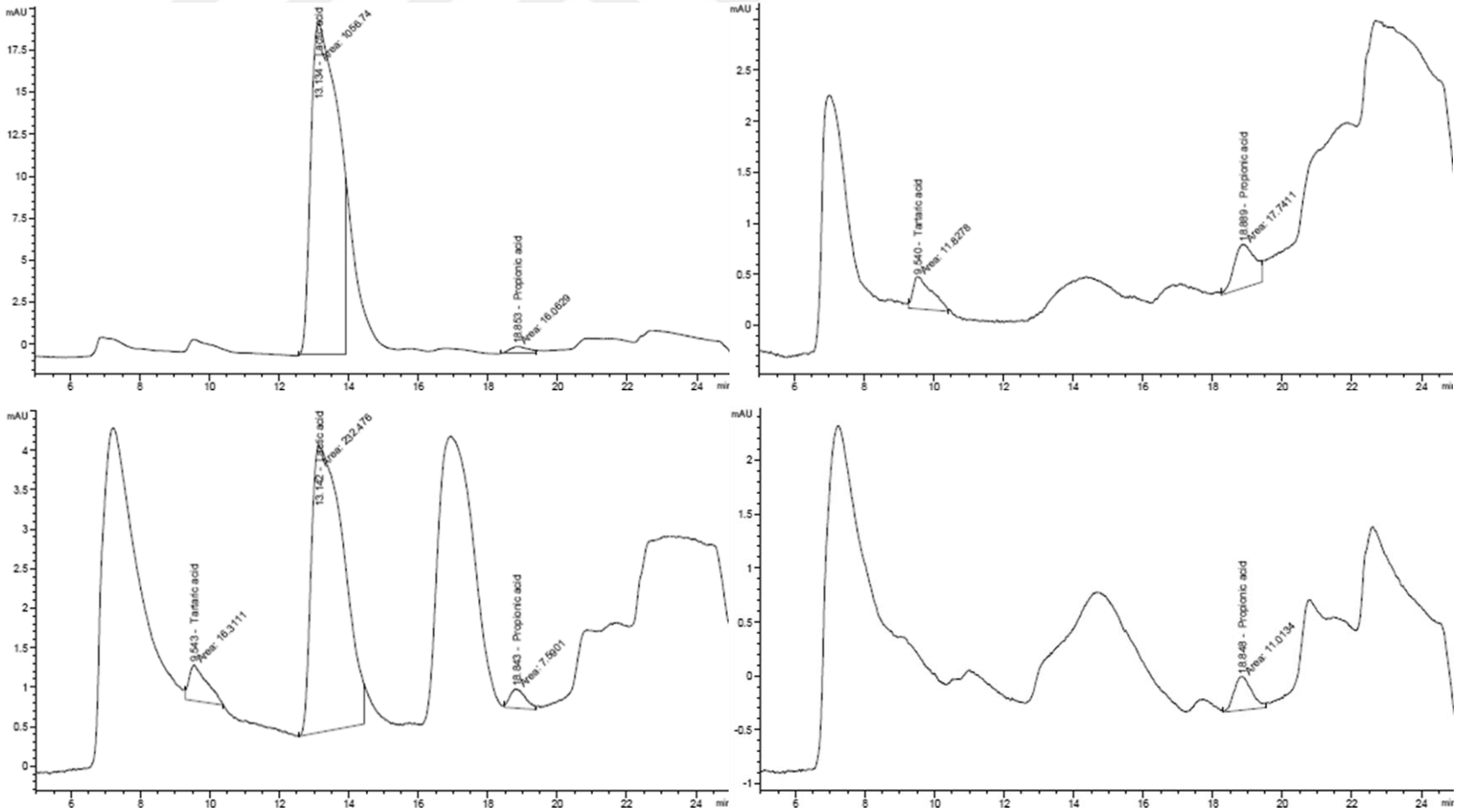
EK 80 Metanol+Kç, Metanol+M, Metanol+G, Metanol+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



EK 81 Etanol+Kç, Etanol+M, Etanol+G, Etanol+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



EK 82 Saf su+Kç, Saf su+M, Saf su+G, Saf su+K HPLC Organik Asit Analizi Kromatogramı



EK 83 Karaçam, Meşe, Göknar ve Kayın Örneklerinin SPME Yöntemi Uçucu Bileşen Analiz Kromatogramı

