

Proje No: 104O265

**Yeni Teknolojilerle Baharatlardan Esansiyel Yağ
Ekstraksiyonu ve Bu Yağların Fiziksel, Antioksidan ve
Antimikrobiyal Özellikleri**

Prof.Dr. Serpil ŞAHİN
Prof.Dr. Servet Gülüm ŞÜMNÜ
Doç.Dr. Esra YENER
Prof.Dr. Sibel KARAKAYA
Prof.Dr. Sedef NEHİR EL
Y. Doç.Dr. Nural KARAGÖZLÜ

ŞUBAT 2008
ANKARA

ÖNSÖZ

Bu projenin amacı, yeni ekstraksiyon teknolojileri kullanılarak Türkiye’de yetişen kekik, defne ve biberiye esansiyel (uçucu) yağlarının elde edilmesi ve bu yağların bileşimi ile antioksidan ve antimikrobiyel aktivitelerinin belirlenmesidir. Yeni ekstraksiyon teknolojisi olarak çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu, mikrodalga yardımcı ekstraksiyon ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu kullanılmıştır. Elde edilen yağlar verim ve kompozisyon açısından karşılaştırılmış ayrıca uçucu yağların antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri tespit edilmiştir. Proje Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ege Üniversitesi ve Celal Bayar Üniversitesi işbirliği ile gerçekleştirilmiştir. Kullanılan bitkiler KÜTAŞ (Kütaş Tarım Ürünleri Dış Tic. San. A.Ş., İzmir, Türkiye)’dan elde edilmiştir. Proje TÜBİTAK tarafından desteklenmiş proje kapsamında bir Yüksek Lisans tezi yürütülmüştür.

Çalışmanın yürütülmesi için gereken maddi desteği veren TÜBİTAK’a ve çalışmada kullanılan kekik, defne ve biberiyeyi sağladığı için KÜTAŞ’a teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
GİRİŞ.....	3
GENEL BİLGİLER.....	3
BAHARATLAR.....	3
Kekik	5
Defne.....	5
Biberiye	6
UÇUCU YAĞ ELDESİ	6
GEREÇ VE YÖNTEM	10
GEREÇLER.....	10
YÖNTEM	11
Hidrodistilasyon.....	11
Çözümsüz Mikrodalga Ekstraksiyonu (ÇME).....	11
Mikrodalga Yardımlı Hidrodistilasyon (MYH)	12
Süperkritik Karbon Dioksit Ekstraksiyonu	12
Analiz	13
<i>Parçacık boyut dağılımı</i>	13
<i>Verim</i>	14
<i>Uçucu yağ bileşenlerinin tanımlanması ve kantitatif olarak analizi</i>	14
<i>Antioksidan aktivite</i>	16
<i>Antimikrobiyal aktivite</i>	17
<i>İstatiksel analiz</i>	18
BULGULAR VE TARTIŞMA.....	18
PARÇACIK BOYUT ANALİZİ	18
ÇÖZÜMSÜZ MİKRODALGA EKSTRAKSİYONU (ÇME) DENEYLERİ.....	19
Kekik	19
<i>Uçucu yağ verimi</i>	19
<i>Uçucu yağ kompozisyonu</i>	20
Defne.....	28
<i>Uçucu yağ verimi</i>	28
<i>Uçucu yağ kompozisyonu</i>	30
MİKRODALGA YARDIMLI HİDRODİSTİLAYON (MYH) DENEYLERİ	35

Biberiye	35
<i>Uçucu yağ verimi</i>	35
<i>Uçucu yağ kompozisyonu</i>	36
SÜPERKRİTİK KARBON DİOKSİT EKSTRAKSİYONU	42
Kekik yağı.....	42
Defne yağı	44
Biberiye yağı	47
ANTİOKSİDAN AKTİVİTE	49
ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radikalinin inhibisyonu	49
DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin inhibisyonu.....	49
Linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonu	50
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE.....	52
SONUÇ VE ÖNERİLER	56

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Hidrodistilasyonla elde edilen <i>Origanum vulgare</i> L. uçucu yağında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları	23
Tablo 2.	Farklı mikrodalga güçlerinde ÇME metodu ile elde edilen <i>Origanum vulgare</i> L. uçucu yağında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları ...	24
Tablo 3.	Hidrodistilasyon ve farklı mikrodalga güçlerinde ÇME metodu ile elde edilen <i>Laurus nobilis</i> L. uçucu yağında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları	31-32
Tablo 4.	Hidrodistilasyon ve farklı mikrodalga güçlerinde MYH metodu ile elde edilen <i>Rosmarinus officinalis</i> L. uçucu yağında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları	38-39
Tablo 5.	Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen kekik yağının içeriği (basınç=105 bar, sıcaklık=40°C, ekstraksiyon süresi=30 dakika)	41
Tablo 6.	Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile kekik yağının ekstraksiyon süresine bağlı olarak ayrılan fraksiyonlarının ana bileşenleri (basınç=103.4 bar, sıcaklık=40°C)	42
Tablo 7.	Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen defne yağının içeriği (basınç=105 bar, sıcaklık=40°C, ekstraksiyon süresi=30 dakika)	44
Tablo 8.	Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen biberiye yağının içeriği (basınç=105 bar, sıcaklık=40°C, ekstraksiyon süresi=30 dakika)	46
Tablo 9.	Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların ABTS radikali üzerine antioksidan etkileri	47
Tablo 10.	Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların DPPH radikali üzerine antioksidan etkileri	48
Tablo 11.	Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların linoleik asit peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri	49
Tablo 12.	Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların <i>Escherichia coli</i> O157:H7 üzerine antimikrobiyal etkileri	50
Tablo 13.	Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların <i>Staphylococcus aureus</i> 6538P üzerine antimikrobiyal etkileri	50

Tablo 14.	Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların <i>Salmonella typhimurium</i> NRRL E 4463 üzerine antimikrobiyal etkileri	51
Tablo 15.	Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların <i>Listeria monocytogenes</i> Scott-A üzerine antimikrobiyal etkileri	51

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. ÇME ve MYH için deney düzeneği 12
- Şekil 2. Kekikte hidrodistilasyon ve farklı güçler kullanılarak mikrodalga ile yapılan ekstraksiyon işleminin uçucu yağ verimi üzerine etkisi (■ % 100 mikrodalga gücü^{a*}, ◆ % 80 mikrodalga gücü^a, ▲ % 60 mikrodalga gücü^{ab}, ● % 40 mikrodalga gücü^{bc}, □ konvansiyonel^c)
* farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, p≤0.05 20
- Şekil 3. Çözgensiz mikrodalga ekstraksiyon metodu ile % 100 mikrodalga gücü kullanılarak elde edilen kekik yağı numunesinin GC-MS analizi sonucu elde edilen toplam iyon kromatogramı
(1) α-tujen, (2) α-pinen, (3)kampen, (4) 1-okten-3-ol, (6) β-mirsen, (7) α-fellandren, (9) α-terpinen, (10) p-simen, (11) β-fellandren, (12) γ-terpinen, (13) terpinolen, (14) borneol, (15) 4-terpineol, (16) timol, (17) karvakrol, (18) β-karyofilen, (20) α-humulen, (22) β-bisabolen. 21
- Şekil 4. *Origanum vulgare* L. uçucu yağı bileşen gruplarının hidrodistilasyon ve çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu metotlarına göre değişimi (▨, hidrodistilasyon-180 dak; ■, ÇME-100% mikrodalga gücü-45 dak; ▩, ÇME-80% mikrodalga gücü -60 dak; ≡, ÇME-60% mikrodalga gücü -60 dak; ≡≡, ÇME-40% mikrodalga gücü -60 dak)
* herbir bileşen grubunda farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, p≤0.05 26
- Şekil 5. Hidrodistilasyon ve farklı güçlerde çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu teknikleriyle *Laurus nobilis* L.'den elde edilen verimin zamana bağlı değişimi (■, ÇME-622 W mikrodalga gücü^a; ●, ÇME-249 W mikrodalga gücü^a; □, hidrodistilasyon^a)
* farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, p≤0.05. 27
- Şekil 6. Çözgensiz mikrodalga ekstraksiyon metodu ile % 100 mikrodalga gücü (622 W) kullanılarak elde edilen *Laurus nobilis* L. uçucu yağının GC-MS analizi sonucu elde edilen toplam iyon kromatogramı (1: α-tujen, 2: α-pinen, 3: kamfen, 4: sabinen, 5: β-pinen, 7: α-terpinen, 8: p-simen, 10: 1,8-sineol, 11: γ-terpinen, 12: terpinolen, 13: linalol, 14: pinokarveol/trans-pinokarveol, 17: pinokarvon, 19: 4-terpineol, 21: mirtenal, 24: bornil asetat, 27: α-terpinil asetat, 28: öjenol, 30: metil öjenol, 34: dehidrokostuslakton(?), 35: erementin(?)) 28

- Şekil 7. *Laurus nobilis* L. uçucu yağında monoterpen hidrokarbon ve oksijenli bileşenlerin konsantrasyonlarının hidrodistilasyon ve çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu metotlarına göre değişimi (▧, ÇME-249 W mikrodalga gücü; ■, ÇME-622 W mikrodalga gücü; ▨, hidrodistilasyon) *herbir bileşen grubunda farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$. 29
- Şekil 8. *Laurus nobilis* L. uçucu yağında seskiterpenlerin konsantrasyonlarının hidrodistilasyon ve çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu metotlarına göre değişimi (▧, ÇME-249 W mikrodalga gücü; ■, ÇME-622 W mikrodalga gücü; ▨, hidrodistilasyon) *herbir bileşen grubunda farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$. 30
- Şekil 9. Hidrodistilasyon ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon teknikleriyle *Rosmarinus officinalis* L.'den elde edilen uçucu yağ veriminin zamana bağlı değişimi (■, MYH-622 W mikrodalga gücü^a; ●, MYH-249 W mikrodalga gücü^b; □, hidrodistilasyon^a) * farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$. 34
- Şekil 10. Mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon metodu ile % 100 mikrodalga gücü kullanılarak elde edilen biberiye yağı numunesinin GC-MS analizi sonucu elde edilen toplam iyon kromatogramı (1: trisiklen, 2: α -tujen, 3: α -pinen, 4: kamfen, 7: β -pinen, 8: 1-okten-3-ol, 9: β -mirsen, 10: α -fellandren, 12: α -terpinen, 13: p-simen, 15: 1,8-sineol, 17: γ -terpinen, 18: terpinolen, 19: linalol, 20: fenol, 22: kamfor, 23: izopulegol, 26: borneol, 27: 4-terpineol, 29: α -terpineol, 31: verbenon, 32: sitronellol(?), 33: bornil asetat, 35: karvakrol, 36: metil öjenol, 37: β -karyofilen, 38: α -humulen, 39: metil jasmonat) 35
- Şekil 11. *Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağı bileşen gruplarının hidrodistilasyon ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon metotlarına göre değişimi (▨, hidrodistilasyon; ■, MYH-622 W mikrodalga gücü; ▧, MYH-249 W mikrodalga gücü) * herbir bileşen grubunda farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$. 36
- Şekil 12. Basıncın süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen defne

- yağı içeriğine etkisi (sıcaklık=40°C, ekstraksiyon süresi=30 dakika, ■ oksijenli bileşikler, □ monoterpen hidrokarbonları) 43
- Şekil 13. Sıcaklığın süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen defne yağı içeriğine etkisi (basın=105 bar, ekstraksiyon süresi=30 dakika, ■ oksijenli bileşikler, □ monoterpen hidrokarbonları) 43

ÖZET

Bu çalışmanın amacı yeni ekstraksiyon teknolojileri kullanılarak Türkiye’de yetişen kekik, defne ve biberiye (esansiyel) uçucu yağlarının eldesidir. Farklı ekstraksiyon metodları ile elde edilen ürün yağ içeriği ve kompozisyonu açısından karşılaştırılmıştır. Ayrıca, farklı ekstraksiyon metodlarıyla elde edilen uçucu yağların antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, kekik ve defne için çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu (ÇME) ve biberiye için mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon (MYH) kullanılmıştır. Ayrıca, baharatlardan yağ elde etmek için süperkritik akışkan ekstraksiyonu denenmiştir. Kontrol olarak hidrodistilasyon kullanılmıştır.

ÇME ya da süperkritik karbondioksit ekstraksiyon metodlarının, hidrodistilasyonla kıyaslandığında daha fazla kekik uçucu yağı verdiği tespit edilmiştir. ÇME ve hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağların kompozisyonları dolayısıyla antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri arasında önemli bir fark bulunmazken süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde edilen yağın kompozisyonu farklı bulunmuştur. ÇME yönteminde hidrodistilasyona göre işlem süresi %80 azalmıştır.

ÇME ve hidrodistilasyon yöntemleriyle elde edilen defne yağları arasında verim, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite bakımından önemli bir fark bulunmamıştır. ÇME yöntemi kullanıldığında işlem süresinin hidrodistilasyona göre % 55-60 oranında kısaldığı görülmüştür. En yüksek verim süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda elde edilirken, en çok oksijenli bileşen miktarı ÇME yöntemi kullanıldığında elde edilmiştir.

Biberiye yaprakları suyu yeterince emmediği için ÇME yöntemi bu bitki için başarılı olmamış ve onun yerine MYH metodu kullanılmıştır. Bu metod, hidrodistilasyona göre işlem süresini % 65 oranında kısaltmıştır. MYH metodu ile hidrodistilasyona ve süperkritik akışkan ekstraksiyonuna göre daha fazla oksijenli bileşen elde edilmiştir. MYH metodu ve hidrodistilasyon ile elde edilen biberiye uçucu yağları antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri açısından benzerlik göstermiştir.

Hidrodistilasyona göre daha kısa sürede daha kaliteli yağ elde edilen çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu kekik ve defne için ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon biberiye için en uygun ekstraksiyon metodları olarak seçilmiştir.

Anahtar Sözcükler. *Laurus nobilis* L.; *Origanum vulgare* L.; *Rosmarinus officinalis* L.; uçucu yağ; kompozisyon; hidrodistilasyon; mikrodalga; süperkritik akışkan; antioksidan aktivite; antimikrobiyal aktivite.

ABSTRACT

The objective of this study is to extract essential oils of oregano, laurel and rosemary which are widely grown in Turkey by using novel extraction methods. The essential oils obtained from different extraction methods were compared with respect to yield and composition. In addition, the antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils obtained using different extraction methods were determined.

In this study, solvent free microwave extraction (SFME) for oregano and laurel and microwave assisted hydrodistillation (MAHD) for rosemary were used. In addition, extractions were performed using supercritical carbondioxide extraction (SFE) method. Essential oils were also obtained using hydrodistillation method as control.

SFME and supercritical carbondioxide extraction offered significantly higher oregano essential oil yield as compared to hydrodistillation. While no significant difference was obtained in the compositions and consequently antioxidant and antimicrobial activities of oregano essential oils obtained by SFME and hydrodistillation, the composition was quite different in the case of SFE. Conventional process time was reduced by 80% in SFME.

No significant differences were obtained between SFME and hydrodistillation with respect to both yield and antioxidant and antimicrobial activities of laurel oil. The process time was reduced by 55-60% when SFME was used. The highest yield was obtained in SFE while the concentration of oxygenated compounds was the highest in SFME.

In the extraction of essential oils from oregano (*Origanum vulgare* L.) and laurel (*Laurus nobilis* L.) SFME gave good results but it couldn't be applied for the extraction of essential oil from rosemary. Therefore, in the case of rosemary, MAHD was used. MAHD reduced process time by 65 % as compared to hydrodistillation. Significantly higher amounts of oxygenated compounds were detected in the essential oils extracted by MAHD than by hydrodistillation and SFE. Rosemary essential oils obtained by hydrodistillation and MAHD were not different with respect to their antioxidant and antimicrobial activities.

SFME was found to be a simple, time saving method and a good alternative for the extraction of essential oils from oregano and laurel. In rosemary, MAHD can be used as an alternative.

Keywords. *Laurus nobilis* L.; *Origanum vulgare* L.; *Rosmarinus officinalis* L.; essential oil; composition; hydrodistillation; microwave; supercritical fluid extraction; antioxidant activity; antimicrobial activity.

GİRİŞ

Kekik, defne ve biberiyenin, gıda, kozmetik ve tıp endüstrisinde önemli bir yeri vardır. Bu baharatlardan elde edilen uçucu yağların yüksek antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin olduğu bilinmektedir (Akgül ve Kıvanç, 1988; Akgül ve Kıvanç, 1989; Baratta ve ark., 1998; Miura ve Nakatani, 1989; Pintore ve ark., 2002; Sacchetti ve ark., 2005). Bu nedenle, ekstraksiyon için ekonomik ve güvenli bir metodun kullanılması önemlidir. Uçucu yağların ekstraksiyonunda konvansiyonel metodlar kullanıldığında bazı aroma bileşenlerinde kayıplar, düşük ekstraksiyon verimi, ısıl etkilerle bazı bileşenlerin bozulması veya üründe çözgen kalıntısı gibi problemler görülmektedir. Mikrodalga ekstraksiyonu ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu, çözgen ekstraksiyonu ve hidrodistilasyon metodlarının dezavantajlarını azaltan iki yeni ekstraksiyon metodudur.

Mikrodalga ekstraksiyonu iki şekilde olabilmektedir: çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon. Çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu yakın bir zamanda geliştirilmiştir. Bu methodda mikrodalga atmosferik basınçta distilasyon ile birleştirilmiştir. Çözgen kullanılmadığı için çevre dostu bir teknoloji olarak kabul edilir. Mikrodalga yardımcı hidrodistilasyonda çözgen olarak hidrodistilasyonda olduğu gibi su kullanılmaktadır. Bu metodların, konvansiyonel metodlarla karşılaştırıldığında değerli uçucu yağ eldesi ve enerji tasarrufu gibi avantajları vardır.

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu baharatların ekstraksiyonunda bir başka alternatif methoddur. Düşük çözgen gereksinimi nedeniyle verimli, güvenli ve ucuz bir methoddur. Süperkritik akışkanların hem sıvıların çözgenlik hem de gazların aktarım özelliklerine birarada sahip olmaları, bitkiler gibi difüzyon kontrollü matrislerin ekstraksiyonu için uygun olmasını sağlamaktadır.

Bu çalışmada, bu iki ekstraksiyon metodu; Mikrodalga ekstraksiyonu ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu kullanılmıştır. Ekstraksiyon aynı zamanda karşılaştırma amaçlı olarak hidrodistilasyonla da yapılmıştır. Farklı ekstraksiyon metodları ve çalışma şartları yağ verimi, kompozisyonu ve antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri açısından karşılaştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

BAHARATLAR

Baharatlar gıdalara lezzet verici, antimikrobiyal özelliklerinden dolayı koruyucu ve ayrıca antioksidan olarak katılabildikleri gibi insanlar tarafından, tedavi edici özelliklerinden dolayı da yaygın olarak tüketilmektedir (Aktuğ ve Karapınar, 1986).

Baharatların gerek patojen, gerekse gıdalarda bozulma yapan mikroorganizmaları da kapsamak üzere birçok mikroorganizma grubunun üremesine, spor jermantasyonuna ve toksin

sentezlemeleri üzerine etkilerini içeren çeşitli araştırmalar yapılmıştır (Akgül ve Kıvanç, 1988; Akgül ve Kıvanç, 1989; Aktuğ ve Karapınar, 1986).

Baharatların antimikrobiyal etkileri baharat uçucu yağlarında bulunan etken maddelerinden kaynaklanmaktadır. Bitki ve baharatların doğal antioksidan kaynaklar olarak kullanılmalarını araştıran çalışmaların sayısı da gün geçtikçe artmaktadır (Dorman ve ark.,1995, Tomaino ve ark., 2005). Bu araştırma alanına yönelik artan ilgi ise bitki ve baharatların gıdalara eklenmesinin insan sağlığı açısından daha güvenilir olarak değerlendirilmesinden kaynaklanmaktadır (El-Massry ve ark., 2002, Tomaino ve ark., 2005). Bitki ve baharatlardaki antioksidan bileşiklerin önemli bir kısmını terpenoid yapıdaki bileşiklerin yanı sıra fenolik bileşikler de oluşturmaktadır. Fenolik bileşikler terimi, bitkilerin ikincil metabolizma ürünlerinin önemli bir kısmını oluşturan ve çok sayıda değişik bileşeni içeren bir grubu temsil eder. Bu bileşikler bitkilerde oluşabilecek çeşitli hasarlara karşı savunma sisteminin bir yanıtı olarak üretilirler. Kimyasal olarak fenolik bileşikler bir ya da birden fazla OH grubu içeren aromatik halkaya sahip olan bileşikler ve bunların fonksiyonel özellik gösteren türevleri olarak tanımlanır. Ancak bu tanımlama, bazı fenolik bileşiklerin, östron gibi terpenoid orjinli cinsiyet hormonu içermesi nedeniyle tam olarak geçerli olmamaktadır. Bu nedenle tanımlamanın metabolik orijin temel alınarak yapılması önerilmektedir (Shahidi ve Nacz, 1995; Robards ve ark., 1999).

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler antimutajenik, antikarsinojenik, antioksidan, antienflamatuar ve antiallerjik özellikleri ile insan sağlığı üzerine olumlu etkileri, tat ve doku oluşumu, renk oluşumu ve değişimi üzerine etkileri, antimikrobiyal aktiviteleri ve bazı enzimleri (o-difenil oksidaz ve β -galaktosidaz vb.) inhibe edici etkileri açısından önem taşımaktadır (Shahidi ve Nacz,1995; Karakaya ve El, 1997; Karakaya ve El, 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalar fenolik bileşiklerin antioksidan etkisi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Antioksidan etkinin fenol halkasındaki –OH grubu sayısı arttıkça arttığı ve aynı bileşik için bu etkinin meta-, orto- ve para- sırası ile yükseldiği belirtilmiştir (Acar,1998).

Uçucu yağlar ve oleoresinler baharatlara aromasını veren maddelerdir ve aromanın gücü alkaloid miktarıyla ilgilidir. Baharatın antioksidan miktarı, bitkinin hasat zamanına, çeşidine ve iklim koşullarına bağlıdır. Baharatlardan elde edilen yağlar gıda endüstrisinin yanı sıra kozmetik, eczacılık ve bunlarla ilgili diğer endüstrilerde de kullanılan önemli bir maddedir.

Baharatlardan elde edilen uçucu yağlar çok miktarda aroma bileşiği içermektedir. Bileşenler 3 ana grupta toplanmaktadır (Karger ve ark., 1973): (a) $(C_5H_8)_n$ genel formülüne sahip olan hidrokarbonlar; n=2, terpenler; n=3, seskiterpenler; n=4 diterpenler. (b) Hidrokarbonlardan oluşan oksijenli bileşikler, alkoller, aldehitler, ketonlar, fenoller, esterler, eterler. (c) Kükürt yada azot içeren diğer özel bileşikler.

Türkiye’de yaygın olarak yetişmesi ve gıda, kozmetik ve medikal endüstrilerinde önemli olmaları sebebiyle bu çalışmada kekik, defne ve biberiye ile çalışılmıştır.

Kekik

Kekikte (*Origanum vulgare*) bulunan en önemli aroma bileşenleri timol, karvakrol, linalol, borneol, kamfen, α -pinen, geraniol ve γ -terpinendir. Kekikten elde edilen uçucu yağın lipid sistemleri üzerindeki koruyucu etkisi üzerine literatürde çalışmalar vardır (Frag ve ark., 1989). Kekik yağındaki en önemli fenolik bileşenler karvakrol ve timol olarak tespit edilmiştir (Rhyu, 1979; Bestmann ve ark., 1985; Stahl-Biskup, 1986). Bunlara ilaveten *p*-simeon-2,3-diol’un de önemli derecede antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir (Schwarz ve Ernst, 1996). Ayrıca, kekikteki ana bileşenler antioksidan aktiviteleri açısından incelenmiş ve çoğu bileşenin α -tokoferol’den bile daha güçlü bir etkisinin olduğu ortaya çıkmıştır (Miura ve Nakatani, 1989). Türkiye’de yetişen 6 çeşit kekik benzeri bitkinin antimikrobiyal özellikleri çalışılmıştır (Akgül ve Kıvanç, 1988).

Türkiye florasında, endemik 16 türü bilinmektedir (Güner ve ark., 2000). Oregano bitkisi ziraat, eczacılık ve kozmetik endüstrilerinde, gıda ürünleri ve alkollü içkilerde lezzet verici olarak kullanılmaktadır (Şahin ve ark., 2004). *Origanum vulgare* L. uçucu yağının yüksek derecede antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir (Burt ve Reinders, 2003; Sartoratto ve ark., 2004; Capecka ve ark., 2005).

Defne

Defne (*Laurus nobilis* L), Akdeniz ülkelerinde özellikle kıyı kesimlerde yetişen ağaçsı bir bitkidir. Defnenin uçucu yağı yüksek miktarda oksijenli bileşenler içerir. Uçucu yağının kompozisyonu birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. İçeriğinde miktar olarak en çok 1,8-sineol daha sonra sırasıyla linalol, α -terpinil asetat ve β -pinen ve sabinen gibi birçok monoterpen hidrokarbon bulunmaktadır. Baharat tadını veren benzen bileşenleri (öjenol, metil öjenol ve elemisin) uçucu yağda %1-%12 arasında bulunmaktadır ve defne yapraklarına duysal özellikleri veren en önemli maddelerdir (Borges ve ark., 1992; Biondi ve ark, 1993; Pino ve ark., 1993) . Defne taze ve kurutulmuş olarak ve uçucu yağ olarak et ve balık ürünleri ve çorbalarda lezzet verici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal özelliklerinden dolayı gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılmaktadır (Hammer ve ark., 1999).

Laurus nobilis L. (*Lauraceae*), Akdeniz bölgesi ve Türkiye’de yetişmektedir (Kosar ve ark., 2005a). Uçucu yağ içeriğinden dolayı yaprakları eski çağlardan beri baharat olarak kullanılan bu bitki ülkemizde yabani olarak yetişmektedir (Akgül ve Kıvanç, 1989). Kuru defne yaprakları ve bunların uçucu yağları et, çorba, sos, şekerleme (Diaz-Maroto ve ark., 2002) ve

balıkta (Bouzouita ve ark., 2001) lezzet arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, parfümeri ve sabun endüstrisinde (Kosar ve ark., 2005a) ve tıpta kullanılmaktadır (Kılıç ve ark., 2004).

Defne uçucu yağının antimikrobiyal aktivitesi (Bouzouita ve ark., 2003; Dadaloğlu ve Evrendilek, 2004) ve ayrıca antioksidan aktivitesi (Simic ve ark., 2003; Skerget ve ark., 2005) üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu nedenle defne, gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılır (Kılıç ve ark., 2004).

Biberiye

Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.), Ege ve Akdeniz bölgelerinde yetişen yapraklarından uçucu yağ elde edilen bir bitkidir. Biberiye ayrıca taze veya kurutulmuş olarak tüketilmektedir. Biberiye yağının ana bileşenleri α -pinen, kamfen, 1,8-sineol, kamfor, borneol ve α -terpineol'dur. Bu maddelerin çok güçlü antimikrobiyal özellikleri olduğu bilinmektedir (Tepe ve ark., 2005). Süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile ekstrakt edilen biberiye, zencefil ve curcuma ekstraktları karşılaştırıldığında biberiyenin en yüksek antioksidan özelliğe sahip olmasına rağmen en düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Leal ve ark., 2003). Gıda endüstrisinde kullanılan doğal antioksidanlar içinde biberiye ve adaçayı en yüksek antioksidan özelliğe sahiptir (Chipault ve ark., 1952).

Rosmarinus officinalis L. (Lamiaceae), kozmetik, geleneksel ilaç yapımı ve gıdalara lezzet verici olarak kullanılmaktadır (Ramirez ve ark., 2006). *Rosmarinus* cinsinin en yaygın olarak bulunan (Pintore ve ark., 2002) ve Akdeniz bölgesinde doğal olarak büyüyen tek türüdür (Angioni ve ark., 2004). En önemli üreticileri Türkiye, İtalya, Dalmaçya, İspanya, Yunanistan, Mısır, Fransa, Portekiz ve Kuzey Afrika'dır (Atti-Santos ve ark., 2005). İthalat yapan en önemli ülkeler ise ABD, Japonya ve bazı AB ülkeleridir (Flamini ve ark., 2002). Biberiye'den en yüksek kalitede uçucu yağ yapraklarından elde edilir ve bu yağ et, salam ve soslar gibi çeşitli gıdalarda çeşni olarak kullanılır (Lo Presti ve ark., 2005). Aromatik özelliğinden dolayı, uçucu yağ parfümeride ve ayrıca dezenfektan ve böcek öldürücü bileşen olarak kullanılmaktadır (Lo Presti ve ark., 2005). Biberiye uçucu yağı antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahiptir (Baratta ve ark., 1998; Pintore ve ark., 2002; Sacchetti ve ark., 2005).

UÇUCU YAĞ ELDESİ

Bitkilerden uçucu yağları elde etmek için kullanılan konvansiyonel metodlar hidrodistilasyon, buhar distilasyonu ve çözgen ekstraksiyonudur. Buhar distilasyonu oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Distilasyon, sıvı karışım ve bundan oluşan buhar arasındaki kompozisyon farkına dayanan bir ayırma yöntemidir. Bu kompozisyon farkı etkin buhar basıncı ya da sıvı bileşenlerinin uçuculuk farkından kaynaklanmaktadır. Buhar distilasyonu kaynama noktası yüksek olan karışımları ayırmada ya da uçucu olmayan kısımlardan uçucu

maddeleri ayırmada kullanılan özel bir yöntemdir. Bu yöntemde buharlaşma sıcaklığı buhar enjeksiyonu ile düşürülmektedir (Teranishi ve ark., 1977). Buhar kullanılmasının en önemli avantajı uçucu maddelerin suda kolaylıkla yoğunlaştırılabilmesidir (Krell, 1963). Ayrıca buhar atmosferik oksijenin yerine geçerek oksidasyonu engellemektedir (Ellerbe, 1979). Fakat bu metodda bitki yüksek sıcaklığa tabii tutulduğundan ısıya karşı hassas bileşenlerin bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca önemli miktarda uçucu bileşenlerin kaybı görülmektedir. Buhar distilasyonu ile kekikten uçucu yağ eldesinde öğütmenin, distilasyon süresinin ve buhar akış hızının yağ verimi ve bileşimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Hancı ve ark., 2003). Klasik çözgen-ekstraksiyon metodunda uçucu olmayan uçucu yağlar da ekstrakt edilmektedir. Çözgen ekstraksiyon metodu çok uzun sürmektedir. Ayrıca, büyük miktarda organik çözgen kullanılması pahalı olmaktadır, çevrenin kirlenmesine sebep olmaktadır ve toksik çözgenin daha sonra tam olarak ortamdaki uzaklaştırılmaması gıda endüstrisinde problem olmaktadır.

Konvansiyonel metodların uçucu bileşenlerin büyük ölçüde kaybolması, doymamış veya ester bileşenlerin ısıl ve hidrolitik etkilerle kaybolması, ekstraksiyon veriminin düşük olması ve toksik çözgen kullanılması gibi dezavantajları vardır (Ferhat ve ark., 2007). Ayrıca, bu metodlarda işlem süresi çok uzundur. Bu nedenle son yıllarda mikrodalga ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu gibi çevre dostu metodlar geliştirilmeye başlanmıştır.

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu çözgen ekstraksiyonuna göre daha etkin, güvenli ve çözgen tüketimi açısından daha ucuzdur. Kritik sıcaklıklarının üzerindeki bir sabit sıcaklıkta, kritik basınçlarının üzerinde bir basınca sıkıştırılarak elde edilen süperkritik akışkanların gaz benzeri aktarım özellikleri, basınç ve sıcaklığa bağlı olarak değişen güçlü (sıvı benzeri) ve seçici çözgen özellikleri, kalıntı bırakmamaları, onları sıvı çözgenlere göre daha avantajlı kılar. Işık, hava ve ısıdan etkilenen gıdaların ve biyolojik maddelerin ekstraksiyonunda, akışkan olarak düşük kritik sıcaklığı (31.2°C) ve basıncı (7.38 MPa), kalıntı düzeyinde toksik olmayışı, ucuz ve kolaylıkla elde edilebilmesi, ve yanıcı olmayışı nedeni ile daha çok karbon dioksit (SC-CO₂) tercih edilmektedir. Çözünenlerin SC-CO₂ içerisindeki çözünürlükleri molekül yapılarına bağlı olduğundan, her çözünenin belli sıcaklık ve basınçtaki çözünürlüğü farklıdır. Bunun sağladığı seçici ekstraksiyon yapabilme özelliği ile, kademeli azalan veya artan basınç (veya sıcaklık) altında ekstraksiyon yapılarak, toplam ekstraksiyondan sonra azalan basınçlarda birden fazla ayırıcı kullanılarak veya sabit sıcaklık ve basınçta yapılan ekstraksiyon süresince zamana bağlı olarak ürün toplanarak, değişik içerikli ve fonksiyonel özellikleri olan (antioksidan aktivitesi vb.) fraksiyonlar elde edilebilir. SC-CO₂ daha çok yağ ve yağda çözünen apolar bileşenlerin ekstraksiyonunda başarı ile kullanılmaktadır. Suda çözünen polar bileşenlerin SC-CO₂ ile ekstraksiyonu ise, SC-CO₂ in çözgen gücü ve/veya seçiciliği polar organik sıvı çözgenler (%5-10 oranında etanol, vb.) eklenip artırılarak mümkün olmaktadır (King ve Bott, 1993).

SC-CO₂ ekstraksiyonunun en yaygın olarak kullanıldığı alanlardan biri bitkilerdir. Bu çalışmalar arasında nane (Özer ve ark., 1996; Ammann ve ark., 1999), kekik -*Thymbra spicata* (Sonsuzer ve ark., 2004) –*Origanum vulgare* L. (Simandi ve ark., 1998; Diaz-Marato ve ark., 2002; Rodrigues ve ark., 2004; Gaspar ve Leeke, 2004), biberiye (Ibanez ve ark., 1999; Leal ve ark., 2003), zencefil, curcuma (Leal ve ark., 2003), adaçayı, kişniş (Catchpole ve Grey, 1996), fesleğen (Reverchon ve ark., 1994) ekstraksiyonu vardır.

Uçucu bileşenleri uçucu olmayanlara göre seçici olarak elde etmek için genellikle düşük SC-CO₂ yoğunluğu tercih edilmektedir. Düşük yoğunlukta (40-50°C, 80-90 bar) terpenler parafinlere ve yağ asitlerine göre SC-CO₂ içerisinde çok daha iyi çözünürdür. Diğer gruplar belirgin bir çözünürlük göstermezler. Yüksek yoğunlukta (40-50°C, 100-200 bar) terpenler ve oksijenli terpenler, SC-CO₂ içerisinde tamamen çözünürken diğer istenmeyen bileşiklerin içeriği de artmaktadır (Reverchon, 1997). Kekik yağının SC-CO₂ ekstraksiyonu sırasında basınç kademeli olarak (80-120-200-300 bar) artırılarak elde edilen fraksiyonların uçucu yağ oranları düşmüştür (Simandi ve ark.,1998). Bununla beraber, biberiyenin iki kademeli ekstraksiyonu sırasında ilk fraksiyonun (40°C, 100 bar, 30 dak.) uçucu yağlarca zengin, andioksidan aktivitesinin düşük, ikinci fraksiyonun (60°C, 400 bar, 30-60 dak) ise uçucu yağ içeriğinin düşük ama antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Ibanez ve ark., 1999). SC-CO₂ ekstraksiyonu ile elde edilen antioksidanların aktivitelerinin çözgen ekstraksiyonu ile elde edilenlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Ibanez ve ark., 1999)

Buhar distilasyonu ile karşılaştırıldığında SFE metodunda verim (Simandi ve ark.,1998) ve hızın (Ammann ve ark., 1999) düşük olmasına karşın, sıcaklığa hassas bileşenlerin bozulmasının, suda çözünür veya suya hasas bileşenlerin hidrolizinin önlenmesi tespit edilmiştir. SC-CO₂ ekstraksiyonunu ile elde edilen biberiye (Reverchon, 1997) ve kekik yağlarının (Ondarze ve Sanchez, 1990) buhar distilasyonu ile elde edilene göre daha çok oksijenli bileşik içerdiği görülmüştür.

Konvansiyonel metodlara bir başka alternatif, çözgen ekstraksiyon yöntemi ile mikrodalga enerjisinin birleştirilmesidir. Bu metodun en önemli avantajı ekstraksiyon süresinin kısılmasıdır. Konvansiyonel ısıtmada önce çözgenin içinde bulunduğu kap ısıtılmakta ve daha sonra bu ısı çözeltiyi ısıtmaktadır. Ancak mikrodalga kullanıldığında çözelti doğrudan ısınmaktadır ve ısınma çok hızlı olmaktadır. Ayrıca, bu yöntem ile daha az miktarda çözgen kullanılmaktadır (Eskilsson ve Björklund, 2000). Çözgen ekstraksiyonunda işlem süresi 3-48 saat sürmekte ve 100-500 ml çözelti kullanılmakta iken mikrodalga kullanıldığında ise işlem süresi 3-30 dakika sürmekte ve 10-40 ml çözgen kullanılmaktadır. Mikrodalga maddeleri etkili bir şekilde ısınma özelliği olmasına rağmen mikrodalga fırınlar ancak son yıllarda ekstraksiyon amaçlı kullanılmaya başlanmışlardır. Magnetron yardımıyla mikrodalga fırının içinde bir elektrik alanı oluşmaktadır. Polar ve iyonik moleküller bu elektrik alanıyla karşılaştığında hareketlenmekte ve bu moleküllerin elektrik alanı boyunca dizilmeye

çalışırken birbirleriyle de çarpışmaları sonucu olarak ısı oluşmaktadır (Buffler, 1993). Bir çözgenin mikrodalgayı absorplaması dielektrik özelliklerine bağlıdır. Polar moleküllerin ve iyon çözeltilerin dielektrik kayıp faktörü yüksek olduğu için mikrodalgayı güçlü bir şekilde absorplamakta ve hızlı bir şekilde ısınmaktadırlar. Mikrodalga-çözgen ekstraksiyonu kapalı ve açık sistemlerde gerçekleştirilebilir. Kapalı sistemler kullanıldığında çözgen basınç altında kaynama noktasının çok üstünde ısıtılmakta ve ekstraksiyon verimi ve hızı artmaktadır.

Çözgen çeşidi, çözgen miktarı, sıcaklık, fırın gücü, ekstraksiyon süresi, gıdanın su miktarı ve matris özellikleri mikrodalga-çözgen ekstraksiyonda düşünülmesi gereken parametrelerdir (Eskilsson ve Björklund, 2000). Mikrodalga çözgen ekstraksiyonu son yıllarda yağlı tohumların, peynir, süt, kızartılmış ürünlerin (Garcia-Ayuso ve ark., 1999a; 1999b; 2000; Luque-Garcia ve ark., 2002), biberiye ve nanenin ekstraksiyonunda (Chen ve Spiro, 1994) kullanılmıştır.

2004 yılında çözgensiz mikrodalga ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiştir (Lucchesi ve ark., 2004a; 2004b). Çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu (ÇME), atmosferik basınçta distilasyonun mikrodalga ısıtma ile gerçekleştirilmesidir. Bu yöntemde bitki çözgen içermeyen mikrodalga reaktörüne yerleştirilir. Mikrodalga ile ısıtma ile bitkinin içerisindeki uçucu yağ serbest kalmakta ve buharlaşmaktadır. Ayrılan uçucu bileşenler mikrodalga fırının dışındaki soğutma sistemi ile yoğunlaşmaktadırlar. Bu method, işlem süresinin kısa olması, enerjiden tasarruf edilmesi, çözgen gerektirmemesi ve çevreye zarar vermemesi nedeniyle aroma bitkilerinden uçucu yağın ekstraksiyonu için mükemmel bir alternatiftir. Konvansiyonel metodlarla karşılaştırıldığında değerli uçucu yağ eldesi ve enerji tasarrufu gibi avantajları vardır. Bu yeni yöntem ile değişik bitkilerden uçucu yağlar ekstrakt edildiğinde oksijenli bileşenler hidrodistilasyona göre yüksek miktarda ve yağ içinde bulunması istenmeyen monoterpenler düşük miktarda elde edilmiştir (Lucchesi ve ark., 2004a; 2004b).

ÇME metodu ile uçucu yağ eldesinde Lucchesi ve ark., (2004a) ajowan, kimyon ve star anise bitkileri; Lucchesi ve ark., (2004b) fesleğen, bahçe nanesi ve kekik; (Lucchesi ve ark., 2007) kakule üzerinde çalışmıştır.

Mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon (MYH) (Stashenko ve ark., 2004a ve 2004b) ısıya karşı hassas bileşenlerin ekstraksiyonunu için geliştirilmiş bir başka yeni teknolojidir. Bu methodda, kuru bitki belirli bir miktarda su ile birlikte Clevenger düzeneğine konular, ısıtma mikrodalga enerjisi ile yapılır. Bu nedenle işlem süresi çok kısadır. ÇME metodunda, kullanılan su miktarı sınırlıdır, taze bitki kullanılırsa herhangi bir çözgen ya da su eklenmesine gerek yoktur. Kuru numune kullanıldığında ise işlem öncesi numune suda bekletilerek suyu emmesi sağlanır, daha sonra suyun fazlası süzülür.

Literatürde MYH'nin uçucu yağ eldesinde kullanıldığı çalışmalara örnekler şu şekilde sıralanabilir: *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Stashenko ve ark., 2004a), *Columbian Xylopi aromaticum* (Lamarck) (Stashenko ve ark., 2004b), *Salvia triloba* L. ve *Laurus nobilis* L. (Kosar

ve ark., 2005a), *Anethum graveolens* L. ve *Coriandrum sativum* L. (Kosar ve ark., 2005b), *Lavandula angustifolia* (Iriti ve ark., 2006) ve *Heracleum crenatifolium* Boiss., *H. platytaenium* Boiss., ve *H. sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummit (Özek ve ark., 2005).

Daha güvenli ve doğal gıdalara olan ilgi gün geçtikçe arttığı için uçucu ya da eterik yağ olarak da bilinen uçucu yağların kullanımının artması beklenmektedir. Genel olarak uçucu yağlar antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteye sahiptir ve ayrıca içerdikleri bileşenlere bağlı olarak antifungal, antiviral, antimikotik, antiparasitik ve böcek öldürücü özellikler de taşıyabilirler. Bu kadar değerli olan uçucu yağların üretim teknolojisinin iyileştirilmesi ürün verimi ve kalitesinin artırılması için gereklidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇLER

Deneylerde kullanılan kuru haldeki baharatlar (*Origanum vulgare* L., *Laurus nobilis* L. ve *Rosmarinus officinalis* L.) Kütaş Tarım Ürünleri Dış Tic. San. A.Ş.'den elde edilmiştir.

Uçucu yağlardaki bileşenlerin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesinde kullanılan standart maddeler α -pinen, β -mirsen, γ -terpinen, metil öjenol, p-simen, kuminaldehid (Fluka, Ronkonkoma, NY, ABD), β -ödesmol, izopulegol, verbenon (Fluka, Tokyo, Japonya), α -humulen, 3-karen, 4-terpineol, bornil asetat, terpinolen, fenkol, öjenol (Fluka, Buchs, İsviçre), limonen, mirtenal, o-simen (Fluka, Neu-Ulm, Almanya), β -karyofilen (Fluka, Madrid, İspanya), borneol, α -terpineol, kamfor, β -pinen, 1,8-sineol, linalol, timol, karvakrol, metil jasmonat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) and kamfen (Supelco, Bellefonte, PA, ABD)'dir. Kekik yağındaki bileşenlerin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesinde ayrıca ise timol, karvakrol, p-simen, 4-terpineol, α -pinen, β -mirsen, α -terpinen, γ -terpinen, β -karyofilen ve 1-okten-3-ol içeren standart karışım kullanılmıştır (Supelco, Bellefonte, PA, ABD). Nonan (internal standard) Fluka'dan satın alınmıştır (Buchs, İsviçre). Susuz sodyum sülfat Riedel-de Haën (Seelze, Almanya)'den etilalkol ise Merck (Darmstadt, Almanya)'den alınmıştır.

Antioksidan aktivite tayini için kullanılan DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, D9132), linoleik asit (L1376), fosfat tamponu (P4417), hemoglobin (H2500), FeCl₂ (372870), metanol Sigma- Aldrich'den, ABTS [2-2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt (11557) Fluka'dan, amonyum tiyosiyanat Merck'ten satın alınmıştır.

Çalışmada antimikrobiyal aktivite tayini için patojen kültür olarak Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilen *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* Scott-A, *Salmonella typhimurium* NRRL E 4463 ve *Staphylococcus aureus* 6538P kültürleri kullanılmıştır.

YÖNTEM

Hidrodistilasyon

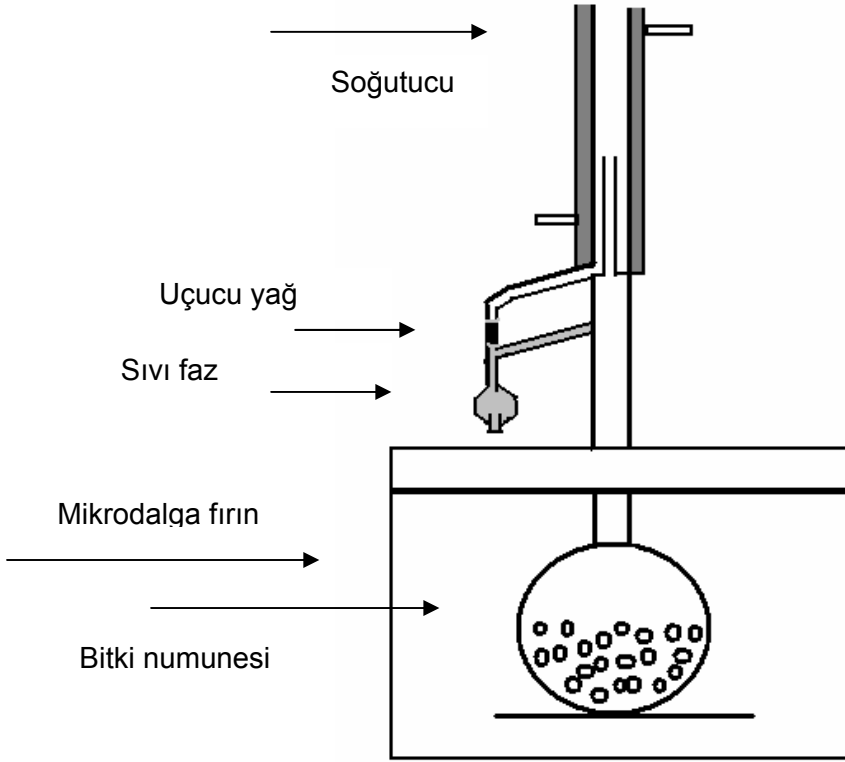
Konvansiyonel hidrodistilasyon Clevenger düzeneğinde yapılmıştır. Kekik ve defne ile yapılan deneylerde kuru bitki:su oranı 1:10 iken biberiye kullanıldığında bu oran 1:7 olmuştur. İşlem farklı sürelerde yapılmış ve işleme numunede uçucu yağ kalmayana kadar (kekikte 3 saat) devam edilmiştir. Her bir koşul için deneyler iki kez tekrarlanmıştır. Farklı sürelerin sonunda toplanan uçucu yağ amber renkli şişelere konulmuş, susuz sodyum sülfat ile suyu alınmış, nitrojen altında kapatılarak analiz edilene kadar 4°C'de saklanmıştır

Çözgensiz Mikrodalga Ekstraksiyonu (ÇME)

ÇME düzeneği için 2450 MHz'de çalışan mikrodalga fırın (White-Westinghouse, Pittsburg, ABD) kullanılmıştır. Fırının IMPI-2L testi ile ölçülen en yüksek gücü 622 W'dır (Buffer, 1993). Mikrodalga gücünün etkisini anlamak için kekik deneylerinde dört güç seviyesi kullanılmıştır: % 100 (622W), % 80 (498 W), % 60 (373 W) ve % 40 (249 W). Defne ile yapılan deneylerde iki farklı gücün (622W ve 249 W) etkisi çalışılmıştır.

Fırının iç boyutları 29 x 37 x 40 cm'dir. Düz tabanlı, 1000 mL kapasiteli cam balon fırının içerisine konularak fırının tepesinden açılmış olan delikten Clevenger düzeneğine bağlanmıştır. Deliğin etrafı polytetrafloraetilen (teflon) ile kapatılarak mikrodalğanın etrafa sızması önlenmiştir. Şekil 1'de kullanılan deney düzeneği görülmektedir.

ÇME için, 50 g kuru *Origanum vulgare* L. 700 mL saf su içinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiş ve böylece bitkinin suyu emmesi sağlanmıştır. *Laurus nobilis* L. kullanıldığında 150 g bitki 700 mL oda sıcaklığındaki saf su içerisinde 1 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda fazla su süzülerek nemlenmiş olan bitki cam balona konulmuş ve fırın istenilen güçte çalıştırılarak ekstraksiyon işlemi başlatılmıştır. Ekstraksiyon işlemi farklı sürelerde yapılmış ve işleme numunede hiç uçucu yağ kalmayana kadar devam edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda toplanan yağın hacmi ölçülmüştür. Her bir koşulda deneyler 3 kez tekrarlanmıştır. Uçucu yağlar amber renkli şişelere konulmuş, susuz sodyum sülfat ile suyu alınmış, nitrojen altında kapatılarak analiz edilene kadar 4°C'de saklanmıştır.



Şekil 1. ÇME ve MYH için deney düzeneği

Mikrodalga Yardımlı Hidrodistilasyon (MYH)

Biberiye kullanıldığında ÇME olumlu sonuç vermediği için bu bitkide MYH'nin etkisi çalışılmıştır. MYH için de aynı düzenek kullanılmış ve iki farklı mikrodalga gücünün (622W ve 249 W) etkisi çalışılmıştır. Biberiyenin konvansiyonel hidrodistilasyon deneylerinde olduğu gibi MYH deneylerinde de kuru bitki:su oranı 1:7 olmuştur (50 g kuru *Rosmarinus officinalis* L., 350 g saf su karışımı). Ekstraksiyon işlemi farklı sürelerde yapılmış ve işleme numunede hiç uçucu yağ kalmayana kadar devam edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda toplanan yağın hacmi ölçülmüştür. Her bir koşulda deneyler iki kez tekrarlanmıştır. Uçucu yağlar amber renkli şişelere konulmuş, susuz sodyum sülfat ile suyu alınmış, nitrojen altında kapatılarak analiz edilene kadar 4°C'de saklanmıştır.

Süperkritik Karbon Dioksit Ekstraksiyonu

Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonları ISCO firmasına ait SFX 5100 model süperkritik akışkan ekstraksiyon cihazı kullanılarak yapılmıştır. Cihaz 103.4-689.7 bar (1500-10000 psia), 25-150°C aralığında çalışmaktadır.

Ekstraksiyonlar sırasında, 0.3 gr numune 10 ml lik kartuşlara (ekstraktör) konulmuş, karbon dioksit akış hızı 2 gr/ml olarak sabit tutulmuştur. Restriktör sıcaklığı 100°C ve ekstrakt toplama sıcaklığı ise -5°C olarak belirlenmiştir. Ekstraktörün giriş ve çıkışında gözenek büyüklüğü 2 µm olan çelik filtreler kullanılmıştır.

Kekik, defne ve biberiye 105 bar, 40°C ve 30 dakika süre ile ekstraksiyona tabii tutulmuş, ekstraksiyon verimleri ve elde edilen yağların içerikleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra kekik yağının 103.4 bar, 40°C de 0-10, 10-20, 20-30 dakika aralıklarında toplanan fraksiyonlarının içerikleri, aynı basınç ve sıcaklıkta 30 dakikalık ekstraksiyon ile elde edilen yağın içeriği ile karşılaştırılmıştır. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile edilen defne yağındaki oksijenli bileşikler ve monoterpen hidrokarbonlarının basınç ve sıcaklık ile değişimi incelenmiştir.

Analiz

Parçacık boyut dağılımı

Parçacık boyut dağılımı elek analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bir grup elek otomatik çalkalayıcı üzerine yerleştirilmiştir. En geniş deliğe sahip elek (8 mm) en üste ve en dar deliğe sahip elek (425 mikron) en alta konulmuştur. Diğer elek delik boyutları, 4 mm, 2 mm, 1 mm ve 850 mikrondur. En alta tava konulmuştur.

Analiz için *Origanum vulgare* L. bitkisinde 50 g, *Laurus nobilis* L. ve *Rosmarinus officinalis* L. bitkilerinde 100 g numune kullanılmış, numune en üsteki eleğe yerleştirilmiş ve 30 dakika boyunca çalkalanmışlardır. İşlem bittikten sonra herbir elekte kalan parçacıklar tartılmış ve kütle fraksiyonları hesaplanmıştır.

Ortalama Sauter çapı aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\overline{D}_s = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{X_i^w}{D_{pi}}} \quad (1)$$

Burada X_i^w i eleği üzerinde kalan numunenein kütle fraksiyonu (\overline{D}_{pi}) ortalama parçacık çapıdır. Ortalama parçacık çapı (\overline{D}_{pi}) aşağıdaki formülle tanımlanmaktadır;

$$\overline{D}_{pi} = \frac{D_{pi} + D_{p(i-1)}}{2} \quad (2)$$

D_{pi} ve $D_{p(i-1)}$ i ve (i-1) elekleri üzerinde kalan parçacıkların çapıdır.

Verim

Uçucu yağ verimi toplanan yağın hacminin kullanılan bitkinin ağırlığına bölünmesiyle hesaplanmıştır ve mL yağ/g kuru bitki olarak ifade edilmiştir.

Uçucu yağ bileşenlerinin tanımlanması ve kantitatif olarak analizi

Farklı koşullarda elde edilen uçucu yağlar gaz kromatografi (Agilent Technologies 6890N Network GC System, Palo Alto, CA, US) ve gaz kromatografi-kütle spektrometre cihazı (Agilent Technologies 5973 Network Mass Selective Detector, Palo Alto, CA, US ile bağlanmış olan Agilent Technologies 6890N Network GC Sistemi) ile analiz edilmiştir. MSD ile bileşenlerin karakterizasyonu yapılırken aynı zamanda FID ile kantitatif analiz yapabilmek için iki kolon iki delikli ferrül ile bağlanmıştır. Bu şekilde enjeksiyon tek enjeksiyon bloğundan yapılmıştır. Analizlerde sabit fazı % 5 fenil metil silokzan olan HP-5MS (30m × 0.25mm × 0.25µm) iki adet kapiler kolon kullanılmıştır.

Kekik yağı için GC-MS şartları şu şekildedir:

Taşıyıcı gaz, He; akış modu sabit hız, akış hızı MSD'ye bağlı kolonda 1 mL/dak, FID'ye bağlı kolonda 0,6 ml/dak; splitless; enjeksiyon hacmi 1µm; enjeksiyon sıcaklığı 250°C; fırın sıcaklık programı: 50°C'den 150°C'e 3°C/dak ile çıkış, 150°C'da 10 dakika bekleme ve daha sonra 10°C/dakika hızda 250°C'a çıkış şeklindedir; MSD transfer hattı sıcaklığı, 250°C; MSD kuadrapol sıcaklığı, 150°C; iyonizasyon sıcaklığı, 230°C; MSD için iyonizasyon modu, 70 eV'de elektronik çarpışma; çözgen gecikmesi 4 dak.

Defne yağı için GC-MS şartları şu şekildedir:

Taşıyıcı gaz, He; akış modu sabit hız; akış hızı, MSD'ye bağlı kolonda 1.2 mL/dak; FID'ye bağlı kolonda 0.8 mL/dak; splitless; enjeksiyon hacmi, 1 µL; enjeksiyon sıcaklığı 250°C; fırın sıcaklık programı: 60°C'de 5 dakika tutma, 60°C'den 210°C'e 2°C/dak ile çıkış şeklindedir; MSD transfer hattı sıcaklığı, 230°C; MSD kuadrapol sıcaklığı, 150°C; iyonizasyon sıcaklığı, 230°C; iyonizasyon modu, 70 eV'de elektronik çarpışma; çözgen gecikmesi 4.5 dak.

Biberiye yağı için GC-MS şartları şu şekildedir:

Taşıyıcı gaz, He; akış modu sabit hız; akış hızı MSD'ye bağlı kolonda 0.8 mL/dak, FID'ye bağlı kolonda 0.4 mL/dak; splitless; enjeksiyon hacmi, 1 µL; enjeksiyon sıcaklığı 250°C; fırın sıcaklık programı, 50°C'de 2 dakika tutma, 50°C'den 225°C'e 3°C/dak ile çıkış şeklindedir; MSD transfer hattı sıcaklığı, 250°C; MSD kuadrapol sıcaklığı, 150°C;

iyonizasyon sıcaklığı, 230°C; iyonizasyon modu, 70 eV'de elektronik çarpışma; çözgen gecikmesi 4.5 dak.

Uçucu yağ bileşenleri, standartların kolonda alıkonma süreleri ile karşılaştırılarak ve kütle spektrometresinin kütüphanesi (NIST98, Wiley7n, Flavor2) ile eşleştirilerek tanımlanmıştır. Verilerin analizi için MSD ChemStation (G1701 DA D.02.00.275) yazılımı kullanılmıştır. Kantitatif analiz internal standart metodu ile GC-FID' de gerçekleştirilmiş, internal standart olarak nonan kullanılmıştır.

Origanum vulgare L. uçucu yağının kantitatif analizinde, eksternal standart olarak timol, karvakrol, p-simen, 4-terpineol, α -pinen, β -mirsen, α -terpinen, γ -terpinen, β -karyofilen ve 1-okten-3-ol kullanılmıştır. İnternal standardın konsantrasyonu sabit olmak üzere (229,668 ppm) 7 farklı konsantrasyonda eksternal standartlar kullanılarak hazırlanmış ve kekik uçucu yağlarının analizinde kullanılan metodla kolona enjekte edilmiştir. Meydana gelen kromatogramlardan yukarıda adı geçen her bileşen için bir kalibrasyon eğrisi çıkarılmış ve bu eğriler ait oldukları bileşenlerin kekik yağı içerisindeki konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Kekik yağında eksternal standartlar dışında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları ise Schoenmakers ve ark. (2000)'nin hipotezinden yola çıkılarak hesaplanmıştır. Schoenmakers ve ark. (2000) FID'nin belli bir bileşen sınıfı içinde çoğu bileşen için sabit bir hassasiyet faktörü gösterdiğini belirtmişlerdir. Buna göre her bir bileşen sınıfı için tek bir hassasiyet faktörü kullanarak o sınıf içerisindeki diğer bileşenlerin miktarları hesaplanabilir. Bu hipotezden yola çıkarak kekik yağında tespit edilen monoterpen hidrokarbonlar, fenoller, alkoller ve seskiterpenler için sırasıyla α -terpinen (~1.24), timol (~1.26), 1-okten-3-ol (~1.53) ve β -karyofillen (~1.26) nispi hassasiyet faktörleri kullanılmıştır. 3-oktanon (keton) ise hassasiyet faktörünün 1 olduğu varsayımı ile hesaplanmıştır.

Laurus nobilis L. uçucu yağının kantitatif analizinde eksternal standart olarak öjenol, γ -terpinen, kuminaldehid, 1,8-sineol, β -pinen, p-simen, β - karyofilen, bornil asetat, metil öjenol, α -pinen, linalol, α -terpineol, mirtenal, 4-terpineol, kamfor , β -ödesmol kullanılmış, bu bileşenleri içeren kalibrasyon çözeltilerinden 7 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. İnternal standart olarak yine nonan kullanılmıştır. Meydana gelen kromatogramlardan yukarıda adı geçen her bileşen için bir kalibrasyon eğrisi çıkarılmış ve bu eğriler ait oldukları bileşenlerin defne yağı içerisindeki konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanılmıştır. Diğer bileşenlerin kantitatif analizinde Schoenmakers ve ark. (2000)'nin yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşıma göre *Laurus nobilis* L. uçucu yağında bulunan monoterpen hidrokarbonlar, fenoller, alkoller, ketonlar, aldehydler, esterler, eterler ve seskiterpenler, göreceli olarak β -pinen (~1.23), öjenol (~1.48), 4-terpineol (~1.43), kamfor (~1.34), mirtenal (~1,18), bornil asetat (~1.6), 1,8-sineol (~1.46) and β - karyofillen (~1.26), nispi hassasiyet faktörleri kullanılarak hesaplanmıştır. Laktonlarda β -karyofillen (seskiterpen)'in nispi hassasiyet faktörü kullanılmıştır.

Rosmarinus officinalis L. uçucu yağının kantitatif analizinde eksternal standart olarak γ -terpinen, metil jasmonat, verbenon, 1,8-sineol, β -pinen, p-simen, β -karyofillen, bornil asetat, metil öjenol, karvakrol, 4-terpineol, kamfor and fenkol kullanılmıştır. Diğer bileşenlerin kantitatif analizinde yine Schoenmakers ve ark. (2000)'nin yaklaşımı kullanılmıştır. Bu yaklaşıma göre *Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağında bulunan monoterpen hidrokarbonlar, fenoller, alkoller, ketonlar, esterler, eterler ve seskiterpenler, göreceli olarak β -pinen (~0.943), karvakrol (~1.073), 4-terpineol (~1.092), kamfor (~1.059), bornil asetat (~1.245), 1,8-sineol (~1.068) and β -karyofillen (~0.935) nispi hassasiyet faktörleri kullanılarak hesaplanmıştır. Zhu ve ark. (2005) aldehidlerin nispi hassasiyet faktörlerinin ketonlarınkine çok yakın olduğunu bulduklarından aldehidlerde kamfor'un nispi hassasiyet faktörü kullanılmıştır.

Antioksidan aktivite

Antioksidan aktivite iki farklı radikal ve linoleik asit oksidasyonu yöntemi kullanılarak saptanmıştır.

a) Güçlendirilmiş ABTS Radikal Katyonu Yöntemi: Yöntem, güçlü bir radikal olan ABTS^{•+} katyonu (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ile oluşturulan oksidasyonun ortamdaki antioksidan bileşikler tarafından inhibisyonuna ve buna bağlı olarak gelişen renkteki açılmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Re ve ark. 1999). ABTS radikal katyonu, 2.45 mM potasyum persülfat çözeltisi ile ABTS stok çözeltisinin reaksiyona sokulması ve oda sıcaklığında 12-16 s bekletilmesi ile elde edilmiştir. Bu çözelti uygun konsantrasyon elde edilecek şekilde etanolla seyreltilmiştir. Örneğin ABTS radikalini inhibisyon kapasitesi elde edilen çözelti ile reaksiyona sokulduktan sonra 734 nm'de 5. dakikada absorbans ölçülerek saptanmıştır. % İnhibisyon aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 1 - (A_{\text{örnek}} / A_{100}) \times 100 \quad (3)$$

$A_{\text{örnek}}$: Örnek için okunan absorbans

A_{100} : Etanolla seyreltilmiş ABTS çözeltisi için okunan absorbans

b) DPPH Radikaline Karşı Antiradikal Aktivite Ölçümü: DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) stabil serbest bir radikaldir. Etanol veya metanolde çözünerek, mavi-viyolet renk verir. Ortamda radikal tutucu olduğunda DPPH sarı renkli 1,1-difenil-2-pikrilhidrazine dönüşür. Örneklerin DPPH radikalini inhibe etme kapasiteleri Braca ve ark. (2001)'nin yöntemine göre çalışılmıştır. Örnekten alınan 50 μ L üzerine 950 μ L DPPH (0.030 mg DPPH/mL metanolde çözünmüş) eklendikten sonra oda sıcaklığında gerçekleşen

reaksiyonun 5. dakikasında 515 nm de absorbans okunur. Metanol ile sıfırlanan spektrofotometre de DPPH çözeltilisinin absorbansı kontrol absorbans olarak kayıt edilir. Radikal aktivitenin inhibisyon yüzdesi şu şekilde hesaplanır;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 1 - (A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100 \quad (4)$$

$A_{\text{örnek}}$: Örnek için okunan absorbans

A_{kontrol} : DPPH çözeltilisi için okunan absorbans

c) Linoleik Asit Oksidasyonu Yöntemi: Linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonu Kuo ve ark. (1999) tarafından önerilen yöntemle saptanmıştır. Yöntem hemoglobin ile katalizlenen linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyon derecesinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. 10 µl örnek, % 0.05 Tween 20 ve 4 mM linoleik asit içeren 0.05 M fosfat tamponuna (pH 7.0) eklenmiş ve karışımın 37°C'de 3 dak. dengeye gelmesi beklenmiştir. Linoleik asidin peroksidasyonu karışıma % 0.035'lik hemoglobin çözeltilisinden 20 µl eklenerek başlatılmıştır. Karışım daha sonra 37°C'de çalkalamalı su banyosunda (100 rpm) 10 dak. inkübe edilmiş ve 10 dakikanın sonunda reaksiyon % 0.6 HCl (etanolde) çözeltilisi ile durdurulmuştur. Reaksiyon sonunda oluşan hidroperoksitler ferik tiyosiyanat yöntemi ile saptanmıştır. Örneklerin inhibisyon kapasiteleri aşağıdaki formülle hesaplanmıştır;

$$\text{İnhibisyon (\%)} = [1 - (A_{\text{örnek}} - A_0) / (A_{100} - A_0)] \times 100 \quad (5)$$

A_0 : Hemoglobin eklenmemiş örnek için okunan absorbans (480 nm)

A_{100} : Örnek eklenmemiş çözelti için okunan absorbans (480 nm)

$A_{\text{örnek}}$: Örnek için okunan absorbans (480 nm)

Antimikrobiyal aktivite

Antimikrobiyal aktivitenin saptanması amacıyla kullanılan patojen kültürlerin geliştirilmesi için Trypton Soya Broth (TSB, Oxoid CM 129), kültürlerin sayımı için ise Plate Count Agar (Oxoid CM 325) kullanılmıştır.

Analiz öncesinde patojen kültürler TSB besiyerlerine öze ile inokule edilmiş ve 35°C'de 24 saat inkübe edilerek taze kültürler hazırlanmıştır.

TSB'de hazırlanan 18-24 saatlik taze patojen kültürlerden 0.1 ml inokulum alınarak steril petri kaplarına aktarılmış ve üzerine 45-50°C'deki su banyosunda tutulan Nutrient Agar (NA, Oxoid CM0003) besiyerinden yaklaşık 20 ml dökülüp inokulum ve besiyerinin karışması

sağlanmış ve katılaşmaları için oda sıcaklığında beklenmiştir (Harris ve ark., 1989; Özbaş ve Aytaç, 1996).

Antimikrobiyal aktivitenin saptanması amacıyla “kağıt disk” yöntemi uygulanmış ve bu amaçla 6mm çapında steril kurutma kağıtları kullanılmıştır. Steril kurutma kağıtlarına aseptik olarak 10 µl uçucu yağ emdirilmiş ve yukarıda anlatıldığı şekilde patojen bakterilerle inokule edilen NA besiyerine eşit aralıklarla ve her bir petride üç filtre kağıdı olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kontrol amaçlı olarak steril saf su kullanılmıştır. Petriler oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda inhibisyon zonlarının oluşumu gözlenmiştir (Özbaş ve Aytaç, 1996). Tüm denemeler paralel petrilerle ve üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

İstatiksel analiz

Verim ve oksijenli bileşenler, monoterpen hidrokarbonlar ve seskiterpenler şeklinde gruplandırılan uçucu yağ bileşenleri istatistiksel olarak varyans analizi kullanılarak analiz edilmiştir. Verilerin normallik ve sabit varyans varsayımlarına uyup uymadığı kontrol edilmiştir. Normallik varsayımı Anderson-Darling testi kullanılarak kontrol edilmiştir. Eğer veriler varsayımları sağlamıyorsa Box-Cox transformasyonu uygulanmıştır. Değişik işlem şartları arasında fark bulunduğu zaman Tukey karşılaştırma metodu kullanılarak MINITAB yazılım programında veriler analiz edilmiştir.

ÇME/ MYH ve hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağların ABTS, DPPH ve linoleik asit peroksidasyonu yöntemleri için belirlenen antioksidan kapasiteleri ve *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* Scott-A, *Salmonella typhimurium* NRRL E 4463 ve *Staphylococcus aureus* 6538P üzerine antimikrobiyal etkileri SPSS yazılım programında tek-yollu varyans analizi (One-Way Anova) ile kontrol edilmiştir. Farklılıklar Tukey karşılaştırma metodu ile belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

PARÇACIK BOYUT ANALİZİ

Kekik, defne ve biberiye yaprakları için parçacık boyut analizleri yapılmıştır. Sauter ortalama çapı kekik yaprakları için 1727.5 µm, defne yaprakları için 2103.4 µm, biberiye yaprakları için 1392.4 µm olarak hesaplanmıştır.

ÇÖZGENSİZ MİKRODALGA EKSTRAKSİYONU (ÇME) DENEYLERİ

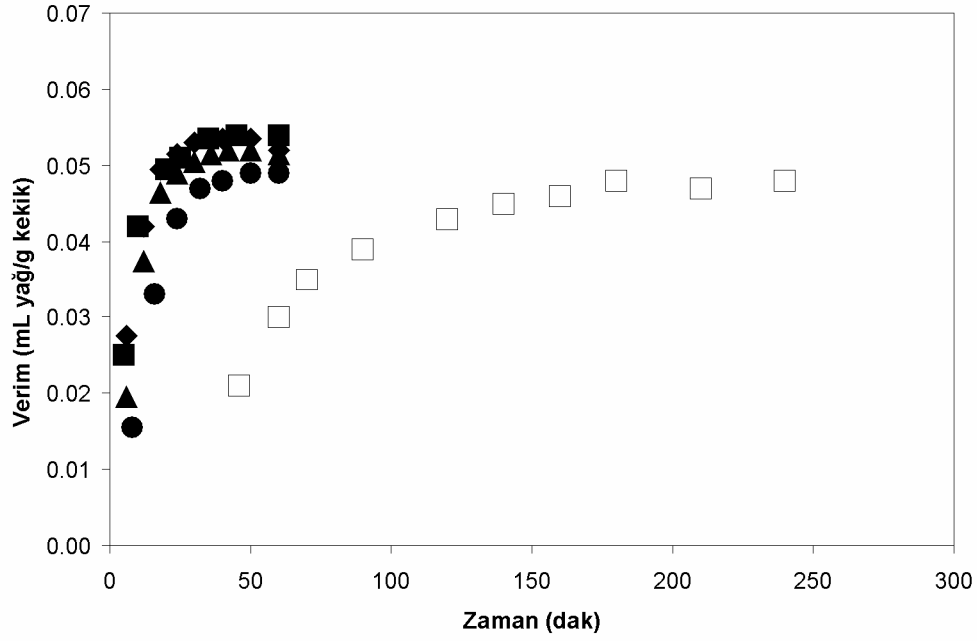
Kekik

Uçucu yağ verimi

Oregano yaprakları ÇME işlemi öncesinde saf su içerisinde 1 saat bekletilmiş ve bu sürenin sonunda fazla su süzülerek atılmıştır. Bu işlem sırasında kuru kekik tarafından emilen su miktarı kekiğin ilk ağırlığının yaklaşık olarak % 290'ı kadardır.

Şekil 2'de zamana göre geleneksel hidrodistilasyon metodu ve farklı güçlerde mikrodalga ekstraksiyonu ile elde edilen yağ verimi değerleri gösterilmiştir. Verimin zamana bağlı değişimini gösteren grafikten de anlaşıldığı gibi mikrodalga gücü arttıkça yağ ekstraksiyon hızı artmaktadır. Bu durum, yüksek mikrodalga gücünde çalışıldığında ekstraksiyona tabii tutulan bitki maddesinin içerisinde daha yüksek basınç farkı oluşması, buna bağlı olarak da bitkinin içerisinde uçucu yağ bulunan keseciklerden yağın dışarı çıkışının daha hızlı gerçekleşiyor olmasıyla açıklanabilir. Farklı metodlar arasında en yüksek verime ulaşılma süreleri arasında farklılık vardır: bu süre konvansiyonel hidrodistilasyonda 3 saat iken ÇME'de 35 dakikaya kadar inebilmektedir. ÇME'de bu sürenin mikrodalga gücü azaldıkça arttığı gözlenmiştir (622 W da 35 dakika, 249 W'da 50 dakika). Bu gözlem, azalan mikrodalga gücü ile doğru orantılı olarak basınç farkının da azalacağı göz önünde bulundurulduğunda, yağın tamamının ekstraksiyonu için gerekli zamandaki artış beklentisini doğrulamaktadır.

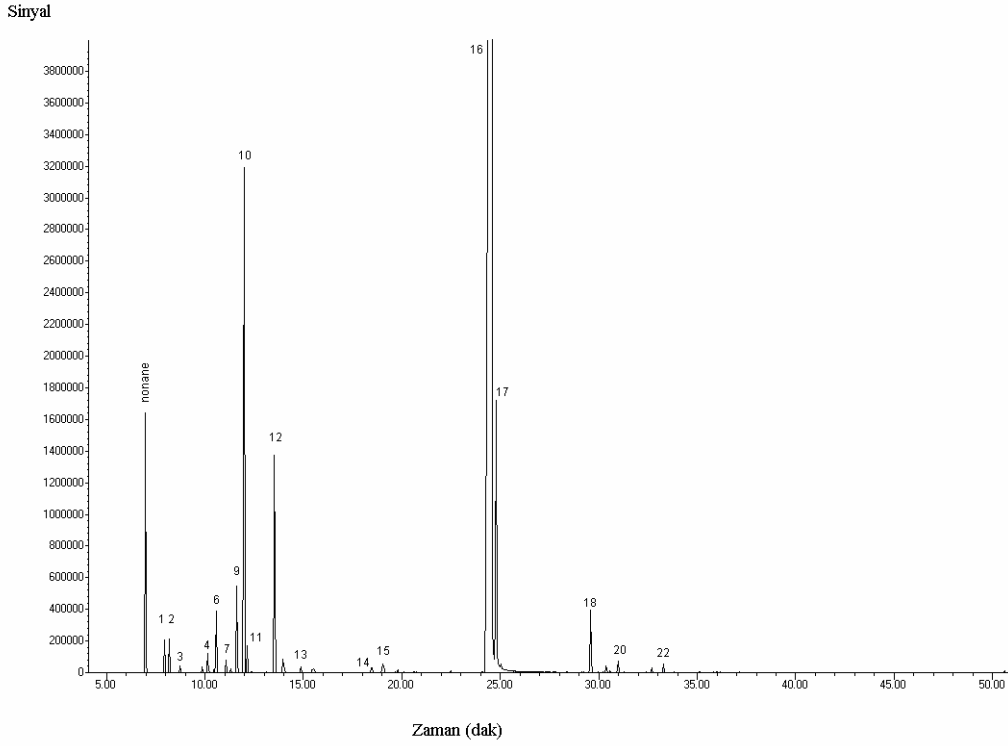
İşlem sonunda elde edilen en yüksek verim, %100 (622 W), % 80 (498 W), % 60 (373 W) ve % 40 (249 W) mikrodalga güçleri kullanıldığında sırasıyla 0.054, 0.053, 0.052 ve 0.049 mL yağ/g kekik, olmuştur. Hidrodistilasyonda ise yağ verimi 0.048 mL yağ/g kekiktir. Elde edilen en yüksek verim sonuçları karşılaştırıldığında işlemler arasında istatistiksel olarak fark olduğu görülmüştür ($p \leq 0.05$). *Origanum vulgare* L. bitkisinde ÇME metodu ile konvansiyonel hidrodistilasyon metoduna göre daha yüksek uçucu yağ verimi elde edildiği sonucuna varılabilir. Düşük mikrodalga güçlerinde ve hidrodistilasyon metodunda daha düşük verim elde edilmesi işlemin bu şartlarda daha uzun sürmesi ve bu nedenle uçucu maddelerin kaybolması ile açıklanabilir.



Şekil 2. Kekikte hidrodistilasyon ve farklı güçler kullanılarak mikrodalga ile yapılan ekstraksiyon işleminin uçucu yağ verimi üzerine etkisi (■ % 100 mikrodalga gücü^{a*}, ◆ % 80 mikrodalga gücü^a, ▲ % 60 mikrodalga gücü^{ab}, ● % 40 mikrodalga gücü^{bc}, □ konvansiyonel^c) * farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$

Uçucu yağ kompozisyonu

Bileşenlerin zamana bağlı değişimini görmek amacıyla, her iki yöntemde de (hidrodistilasyon ve çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu) ilk, orta ve son zamana denk gelen uçucu yağlar analize tabi tutulmuştur. Orta zamandan kasıt, maksimum verimin yaklaşık olarak yarısına ulaşıldığı zamandır. Şekil 3'de % 100 mikrodalga gücünde çalışılarak elde edilmiş kekik yağının GC-MS analizi sonucunda elde edilen toplam iyon kromatogramı görülmektedir.



Şekil 3. Çözgensiz mikrodalga ekstraksiyon metodu ile % 100 mikrodalga gücü kullanılarak elde edilen kekik yağı numunesinin GC-MS analizi sonucu elde edilen toplam iyon kromatogramı

(1) α -tujen, (2) α -pinen, (3) kampen, (4) 1-okten-3-ol, (6) β -mirsen, (7) α -fellandren, (9) α -terpinen, (10) p-simen, (11) β -fellandren, (12) γ -terpinen, (13) terpinolen, (14) borneol, (15) 4-terpineol, (16) timol, (17) karvakrol, (18) β -karyofilen, (20) α -humulen, (22) β -bisabolen.

Tablo 1 ve 2'de konvansiyonel hidrodistilasyon ve ÇME metodları ile elde edilen *Origanum vulgare* L. uçucu yağlarının kompozisyonu verilmiştir. Her iki tabloda da görüldüğü gibi iki metolla da elde edilen yağların kompozisyonları birbirlerine yakındır. *Origanum vulgare* L. uçucu yağında bulunan ana bileşenler timol (650-750 mg/mL), p-simen (60-85 mg/mL), karvakrol (40-60 mg/mL), γ -terpinen (35-50 mg/mL), β -mirsen (~15 mg/mL) and α -terpinen (10-15 mg/mL)'dir. Uçucu yağ içerisinde % 80-85 oranında oksijenli bileşenler, % 13-16 oranında monoterpen hidrokarbonlar ve % 1.0-1.6 oranında seskiterpenler bulunmaktadır. *Origanum vulgare* L.'nin keskin aroması, uçucu yağa karakteristik aromasını veren oksijenli bileşenlerin çok olması ile açıklanabilir. Uçucu yağlara tadını ve aromasını büyük ölçüde veren oksijenli bileşiklerdir, terpenlerin aromaya katkısının çok düşük olduğu bilinmektedir.

Hem hidrodistilasyon hem de ÇME metodunda, zaman ilerledikçe kekikteki seskiterpenlerin miktarlarında genel olarak artma, monoterpenlerin miktarlarında ise azalma dikkati çekmektedir (Tablo 1 ve 2). Monoterpen hidrokarbonlar çok uçucudur ve ilk önce

onlar ekstrakt edilirler. Öte yandan daha yüksek moleköl ağırlıklı bileşenler daha sonra ekstrakt edilirler. Seskiterpenlerin konsantrasyonundaki artış bu bileşenlerin diğer bileşenlere göre daha yüksek moleköl ağırlık, daha düşük uçuculuk ve suda daha düşük çözünürlük değerlerine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Uçucu yağda maksimum seviyelere ulaşmaları için daha uzun süreye ihtiyaçları vardır. Ekstraksiyon süresi arttıkça monoterpen hidrokarbon konsantrasyonundaki azalış özütlemesi daha zor olan bileşenlerin (oksijenli bileşenler ve seskiterpenler) ortaya çıkmasından dolayı olabilir. Özütlemesi daha zor olan bileşenler monoterpenler için seyreltme etkisi göstermiş olabilir. Yani ilerleyen işlem süresi boyunca toplam monoterpen miktarı azalmamakta fakat bu bileşenlerin konsantrasyonu oksijenli bileşenler ve seskiterpen konsantrasyonlarındaki artış sebebiyle azalmaktadır.

Tablo 1. Hidrodistilasyonla elde edilen *Origanum vulgare* L. uçucu yağında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları

No	Bileşenler	RT 1 (dak) ^a	RT 2 (dak) ^b	Hidrodistilasyon		
				46 dak	90 dak	180 dak
				Konsantrasyon (mg/mL)		
1	α -tujen	7.949	12.275	8.572	2.460	3.921
2	α -pinen	8.184	12.579	12.212	6.093	6.515
3	kamfen	8.744	13.221	2.542	1.318	1.225
4	1-Okten-3-ol	10.123	14.527	27.108	13.778	10.747
5	3-Oktanon	10.421	14.903	7.064	3.375	-
6	β -mirsen	10.570	15.082	26.373	14.559	13.581
7	α -fellandren	11.068	15.711	3.684	1.939	1.846
8	3-Karen	11.308	16.000	1.521	-	-
9	α -terpinen	11.617	16.277	25.122	14.212	12.010
10	p-simen	12.012	16.655	147.005	78.115	67.737
11	β -fellandren	12.149	16.844	9.105	5.302	4.831
12	γ -terpinen	13.539	18.242	65.756	37.832	33.041
13	Terpinolen	14.867	19.617	2.426	1.714	1.368
14	borneol	18.466	23.228	5.795	3.586	2.690
15	4-terpineol	19.027	23.753	10.940	6.369	4.834
16	timol	24.549	28.92	581.286	684.230	702.017
17	karvakrol	24.795	29.201	46.160	46.931	44.608
18	β -karyofilen	29.59	34.204	7.281	8.003	9.493
19	aromadendren	30.385	34.973	-	1.342	1.634
20	α -humulen	30.980	35.559	1.510	1.713	1.883
21	leden	32.691	37.214	-	-	-
22	β -bisabolen	33.286	37.706	-	-	1.242
Toplamın yüzdesi (%)				99.060	99.585	99.381
Monoterpen hidrokarbonlar				304.318	163.544	146.076
Oksijenli bileşenler				678.353	758.270	764.897
Seskitерpenler				8.790	11.058	14.251

^a: HP-5MS kolonunda MSD'de elde edilen dakika cinsinden alıkonma süresi;

^b: HP-5MS kolonunda FID'de elde edilen dakika cinsinden alıkonma süresi.

Tablo 2. Farklı mikrodalga güçlerinde ÇME metodu ile elde edilen *Origanum vulgare* L. uçucu yağında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları

No	Bileşenler	RT 1 (dak) ^a	RT 2 (dak) ^b	ÇME-100% mikrodalga gücü			ÇME-80% mikrodalga gücü			ÇME-60% mikrodalga gücü			ÇME-40% mikrodalga gücü		
				5 dak	20 dak	45 dak	6 dak	18 dak	60 dak	6 dak	24 dak	60 dak	8 dak	24 dak	60 dak
				Konsantrasyon (mg/mL)			Konsantrasyon (mg/mL)			Konsantrasyon (mg/mL)			Konsantrasyon (mg/mL)		
1	α-tujen	7.949	12.27	6.406	2.058	5.533	8.388	8.090	4.160	10.751	9.555	4.645	9.945	-	2.800
2	α-pinen	8.184	12.57	7.299	3.519	6.844	8.363	8.262	4.477	11.372	10.488	5.608	10.095	1.332	3.059
3	kamfen	8.744	13.22	1.724	-	1.271	1.914	1.729	-	2.498	2.116	1.543	2.205	-	-
4	1-Okten-3-ol	10.12	14.52	27.481	11.489	11.915	29.077	15.631	8.997	34.910	20.416	13.090	32.248	10.067	13.450
5	3-Oktanone	10.42	14.90	6.924	-	1.776	7.272	2.519	-	8.681	4.946	2.200	8.383	-	2.291
6	β-mirsen	10.57	15.08	19.336	11.249	16.210	23.592	20.771	13.104	28.628	27.038	17.751	28.915	6.661	12.171
7	α-fellandren	11.06	15.71	2.916	1.661	2.293	3.390	2.911	1.877	4.047	3.712	2.493	4.099	-	1.704
8	3-Karen	11.30	16.00	1.248	-	1.089	1.310	1.494	-	1.565	1.487	1.300	1.523	-	-
9	α-terpinen	11.61	16.27	19.338	10.249	14.550	21.901	18.361	11.677	25.623	23.225	16.405	26.662	6.463	10.711
10	p-simen	12.01	16.65	125.27	64.052	76.658	144.500	96.310	59.754	166.00	126.263	84.797	157.99	44.970	66.858
11	β-fellandren	12.14	16.84	7.395	4.377	5.583	8.793	6.946	4.499	10.203	9.029	6.189	10.116	2.875	4.541
12	γ-terpinen	13.53	18.24	48.477	29.999	41.922	59.941	54.180	36.264	70.482	68.155	49.260	77.590	20.973	36.039
13	Terpinolen	14.86	19.61	1.781	-	1.602	1.909	1.897	-	2.193	1.934	1.956	2.225	-	1.566
14	borneol	18.46	23.22	5.837	2.968	3.192	6.426	4.167	2.553	5.872	5.346	3.724	5.116	2.895	3.791
15	4-terpineol	19.02	23.75	7.048	3.416	3.671	7.476	4.666	2.937	7.153	6.145	4.721	6.437	3.480	4.766
16	timol	24.54	732.25	0	879.728	715.837	543.897	9	753.692	526.76	651.44	427.25	427.25	832.878	672.858
17	karvakrol	24.79	29.20	51.775	47.234	54.368	53.173	60.511	42.780	40.407	77.114	63.038	31.992	44.409	59.751
18	β-karyofilen	29.59	34.20	4.643	10.277	13.566	6.178	11.400	10.215	6.129	15.288	16.015	6.788	9.273	13.093
19	aromadendren	30.38	34.97	-	3.012	3.013	-	2.405	2.485	-	2.313	3.175	-	2.398	2.624
20	α-humulen	30.98	35.55	1.226	2.039	2.680	1.351	2.336	1.996	1.419	3.139	3.206	1.395	1.848	2.669
21	leden	32.69	37.21	-	-	-	-	-	-	-	-	1.481	-	-	-
22	β-bisabolen	33.28	37.70	-	-	1.944	-	1.845	1.451	-	1.798	2.273	-	-	1.853
Toplamın yüzdesi (%)				97.977	98.369	98.624	97.555	98.574	98.944	97.723	97.715	98.327	97.759	98.676	98.699
Monoterpen hidrokarbonlar				208.79	127.164	132.317	310.782	151.17	135.812	390.65	272.652	132.10	350.62	83.274	102.502
Oksijenli bileşenler				979.12	944.835	778.248	639.328	860.33	810.959	642.48	552.147	820.21	466.78	893.729	815.857

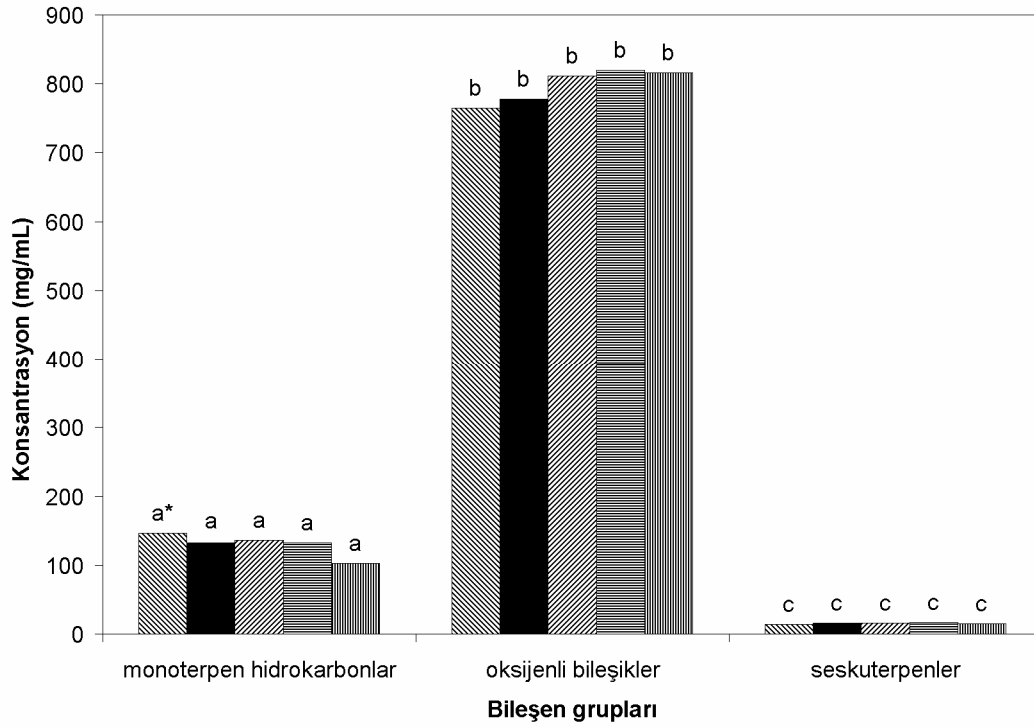
^a: HP-5MS kolonunda MSD'de elde edilen dakika cinsinden alıkonma süresi;

^b: HP-5MS kolonunda FID'de elde edilen dakika cinsinden alıkonma süresi

Bir başka ihtimal ise monoterpenlerin zaman ilerledikçe bozunmaları olabilir. Monoterpenler ısıya ve ışığa karşı çok hassas bileşenler olarak bilinmektedir. Bilindiği gibi uçucu yağ ekstraksiyonunda zaman ilerledikçe hidroliz ve oksidasyon reaksiyonlarının olması olasıdır. Uçucu yağların içerisindeki oksijenli bileşikler de hidroliz veya oksidasyon reaksiyonlarının sonucu olarak meydana gelmiş bileşikler olabilirler (Wang ve ark., 2006).

Oksijenli bileşenlerin konsantrasyonundaki değişim bütün şartlarda aynı eğilimi göstermemiştir (Tablo 1 ve 2). Genel olarak konsantrasyonları belirli bir oranda artmıştır. ÇME metodunda % 100 mikrodalga gücü kullanıldığında bitkinin içerisinde daha yüksek basınç farkı oluşması sebebiyle oksijenli bileşenlerin özütlemesi çok hızlı olmuştur. Bu nedenle zaman ilerledikçe seskiterpen konsantrasyonundaki artışla oksijenli bileşenlerin konsantrasyonunda çok az bir azalma görülmüştür (Tablo 2). *Origanum vulgare* L. uçucu yağındaki oksijenli bileşenlerin % 95'i fenollerden (timol ve karvakrol) oluşmaktadır. Geri kalanı ise alkol ve ketonlardır. Genel olarak zamana göre fenollerde bir artış alkol ve ketonlarda ise bir azalış gözlenmiştir (Tablo 1 ve 2). Oksijenli bileşenlerdeki artış ana bileşen olan fenollerdeki artıştan kaynaklanmaktadır. Ayrıca monoterpenlerin %70'i p-simen ve γ -terpinen'dir. Bu iki monoterpenin timol ve karvakrol'ün habercileri oldukları bilinmektedir (Burt, 2004). Bu nedenle zamana göre timol ve karvakrol konsantrasyonlarındaki artış p-simen ve γ -terpinen'in ısı veya hidrolitik etkilerle reaksiyona girmesiyle açıklanabilir (Nhu-Trang ve ark., 2006). Ayrıca bu durum zamana göre çoğunluğu p-simen ve γ -terpinen'den oluşan monoterpen konsantrasyonundaki azalmayı da açıklayabilir.

Kekik yağının içerisinde bulunan bileşenler oksijenli bileşenler, terpenler ve seskiterpenler şeklinde gruplandırılmış ve farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen uçucu yağların bileşimlerindeki değişim (son zamanlar dikkate alınarak) Şekil 4'de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak kompozisyon açısından metodlar ve mikrodalga güçleri arasında bir fark görülmemiştir ($p \leq 0.05$). Bu durum, çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu yönteminin kekik yağının yapısı üzerinde olumsuz bir etki yaratmadığını göstermiştir. İşlem süresini ise kaydadeğer bir miktarda azaltmıştır. Bu nedenle ÇME *Origanum vulgare* L.den esaniyel yağ eldesinde alternatif bir metod olabilir sonucuna varılmıştır. İşlem süresinin kısalığı yüksek sıcaklığa maruz kalan bitkilerin içerdiği uçucu yağların termik bozunmaya uğrama olasılığını azaltması açısından da önemlidir.



Şekil 4. *Origanum vulgare* L. uçucu yağı bileşen gruplarının hidrodistilasyon ve çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu metotlarına göre değişimi (▨, hidrodistilasyon-180 dak; ■, ÇME-100% mikrodalga gücü-45 dak; ▩, ÇME-80% mikrodalga gücü -60 dak; ▨, ÇME-60% mikrodalga gücü -60 dak; ▧, ÇME-40% mikrodalga gücü -60 dak)

* herbir bileşen grubunda farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$

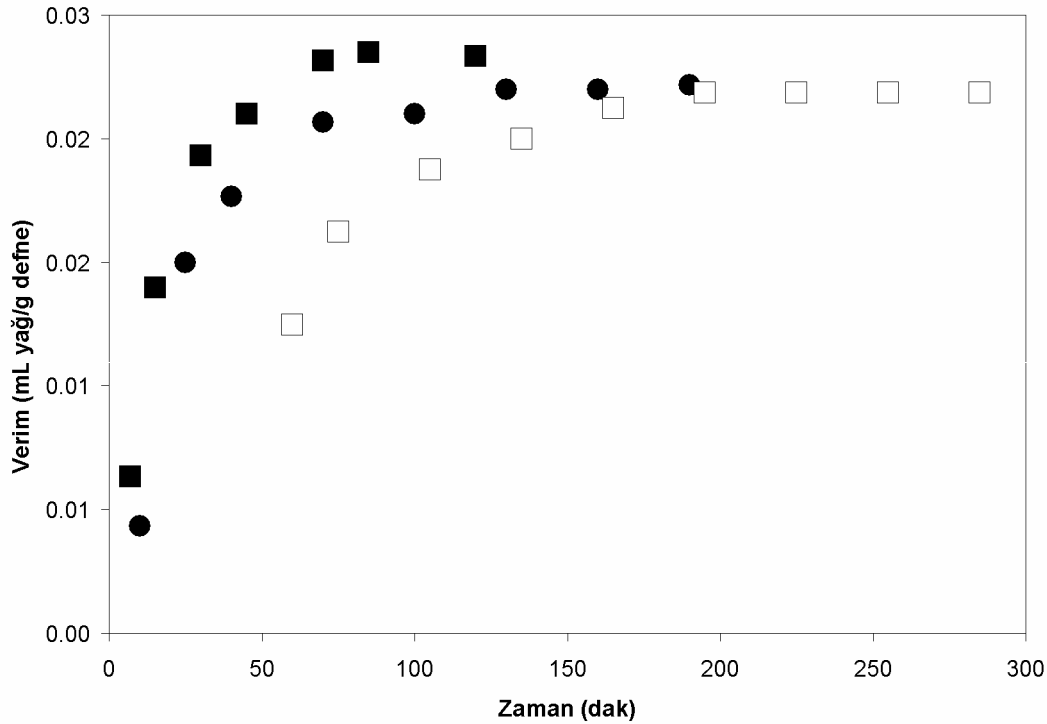
Defne

Uçucu yağ verimi

Defne ÇME işlemi öncesinde saf su içerisinde 1 saat bekletilmiş ve bu sürenin sonunda fazla su süzülerek atılmıştır. Bu işlem sırasında kuru defne tarafından emilen su miktarı yaklaşık olarak bitkinin ilk ağırlığının % 135'i kadardır.

Çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu yöntemiyle değişik güçlerde elde edilen kekik yağının veriminde önemli miktarda değişim olmamasının gözlenmesi sebebiyle defne ve biberiyede sadece iki mikrodalga gücünde (622 W ve 249 W) çalışılmıştır. Şekil 5'de zamana göre geleneksel hidrodistilasyon metodu ve % 40 (249 W) ve % 100 (622 W) mikrodalga güçlerinde ÇME ile elde edilen uçucu yağ verimi değerleri gösterilmiştir. Elde edilen en yüksek verim %100 (622 W), ve % 40 (249 W) mikrodalga güçleri kullanıldığında sırasıyla 0.0235 ve 0.022 mL yağ/g defne, hidrodistilasyonda ise yağ verimi 0.022 mL yağ/g defne olmuştur. Defnede maksimum verim değerleri açısından hidrodistilasyon ve farklı mikrodalga

güçleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı saptanmıştır ($p \leq 0.05$). Ancak mikrodalga ekstraksiyonu işlem süresini kaydadeğer bir miktarda azaltmaktadır. ÇME metodunda % 100 güçte (622 W) çalışıldığında, defnedeki yağın tamamının ekstraksiyonu için 85 dakika yeterli iken, % 40 güçte (249 W) çalışıldığında bu sürenin önemli derecede arttığı gözlenmiştir (130 dak). Mikrodalga gücündeki artış basınç farkını artırarak ekstraksiyonu kolaylaştırmakta ve işlem süresini kısaltmaktadır. Konvansiyonel hidrodistilasyonda işlem süresi 195 dakikadır. Yani, ÇME kullanıldığında işlem süresi % 55-60 oranında azalmaktadır. Bu durum, mikrodalga kullanıldığında ekstraksiyona tabi tutulan bitki maddesinin içerisinde daha yüksek basınç farkı oluşması, buna bağlı olarak da bitkinin içerisinde uçucu yağ bulunan keseciklerden yağın dışarı atılımının daha hızlı gerçekleşiyor olmasıyla açıklanabilir.

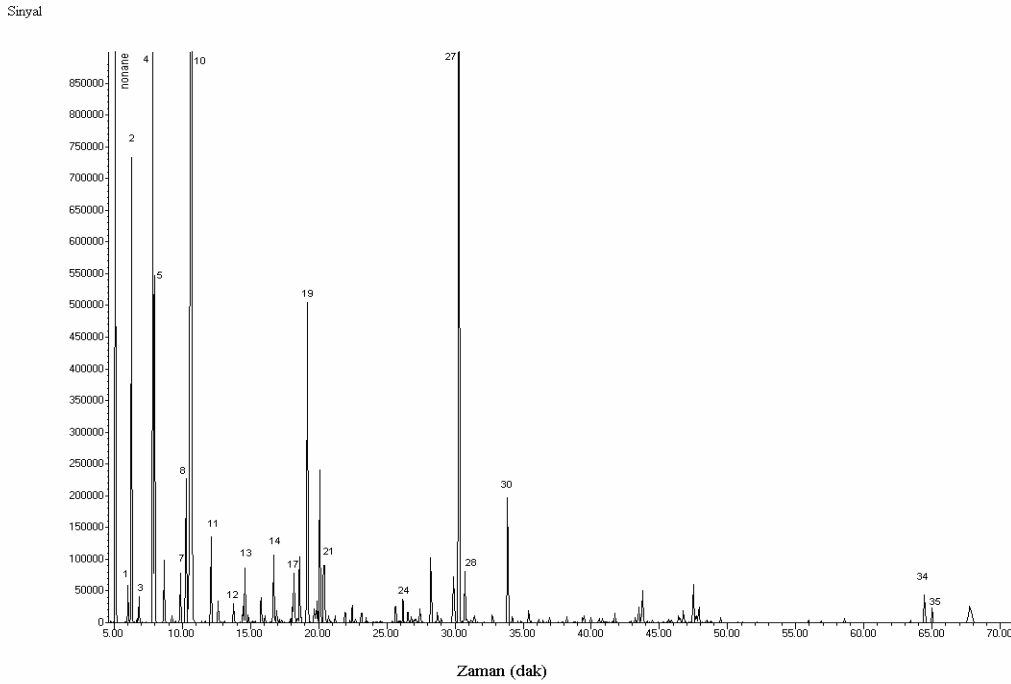


Şekil 5. Hidrodistilasyon ve farklı güçlerde çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu teknikleriyle *Laurus nobilis* L.'den elde edilen verimin zamana bağlı değişimi (■, ÇME-622 W mikrodalga gücü^a; ●, ÇME-249 W mikrodalga gücü^a; □, hidrodistilasyon^a)

* farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$

Uçucu yağ kompozisyonu

Mikrodalga gücü % 100 olduğunda elde edilmiş defne yağının GC-MS analizi sonucunda elde edilen toplam iyon kromatogramı Şekil 6'da görülmektedir. Tablo 3'de konvansiyonel hidrostilasyon ve ÇME metodları ile elde edilen *Laurus nobilis* L. uçucu yağlarının kompozisyonu verilmiştir. Kullanılan standartlardaki eksikliklerden dolayı uçucu yağın yaklaşık % 90'ı karakterize edilmiştir. Her iki tabloda da görüldüğü gibi iki metodla da elde edilen yağların kompozisyonları birbirlerine yakındır. *Laurus nobilis* L. uçucu yağının ana bileşenleri 1,8-sineol (630-730 mg/mL yağ), α -terpinil asetat (90-115 mg/mL yağ), sabinen (45-55 mg/mL yağ), α -pinen (30-40 mg/mL yağ), 4-terpineol (35-40 mg/mL yağ) ve β -pinen (~30 mg/mL yağ)'dir. Ayrıca defne uçucu yağının ağırlıklı olarak oksijenli bileşiklerden oluştuğu ($\geq\%75$), uçucu yağın yaklaşık olarak $\geq\%15$ ve $\geq\%0.15$ 'inin ise sırasıyla monoterpen hidrokarbonlar ve seskiterpenlerden oluştuğu görülmüştür. Bu, kekik yağının olduğu gibi defne yağının da keskin aromasını açıklamaktadır; çünkü uçucu yağlara tadını ve aromasını büyük ölçüde veren oksijenli bileşiklerdir, monoterpenlerin aromaya katkısının çok düşük olduğu bilinmektedir.

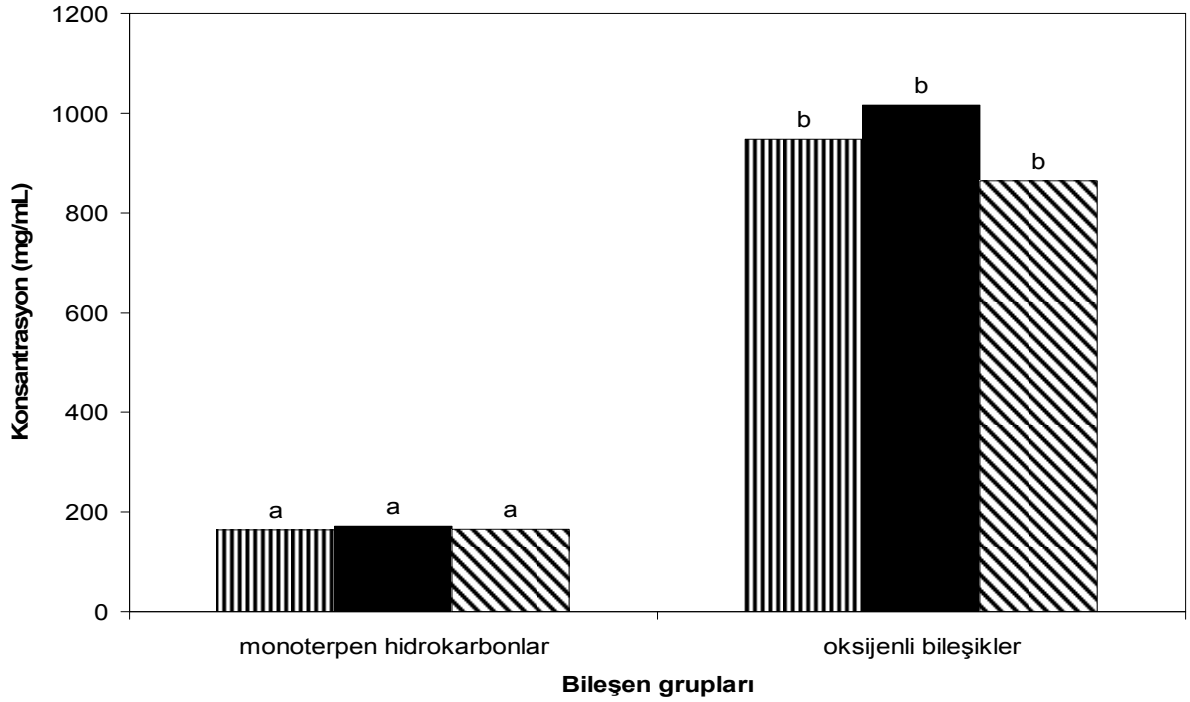


Şekil 6. Çözgensiz mikrodalga ekstraksiyon metodu ile % 100 mikrodalga gücü (622 W) kullanılarak elde edilen *Laurus nobilis* L. uçucu yağının GC-MS analizi sonucu elde edilen toplam iyon kromatogramı (1: α -tujen, 2: α -pinen, 3: kamfen, 4: sabinen, 5: β -pinen, 7: α -terpinen, 8: p-simen, 10: 1,8-sineol, 11: γ -terpinen, 12: terpinolen, 13: linalol, 14: pinokarveol/trans-pinokarveol, 17: pinokarvon, 19: 4-terpineol, 21: mirtenal, 24: bornil asetat, 27: α -terpinil asetat, 28: öjenol, 30: metil öjenol, 34: dehidrokostuslakton(?), 35: erementin(?))

Hem hidrodistilasyon hem de ÇME metodunda, zaman ilerledikçe genel olarak monoterpen hidrokarbonların konsantrasyonlarında artış, oksijenli bileşenlerin konsantrasyonunda ise çok az da olsa azalış gözlenmiştir. Hidrodistilasyon metodunda hiç seskiterpen görülmezken ÇME metodunda sadece son zamanda ortaya çıkmıştır (Tablo 3).

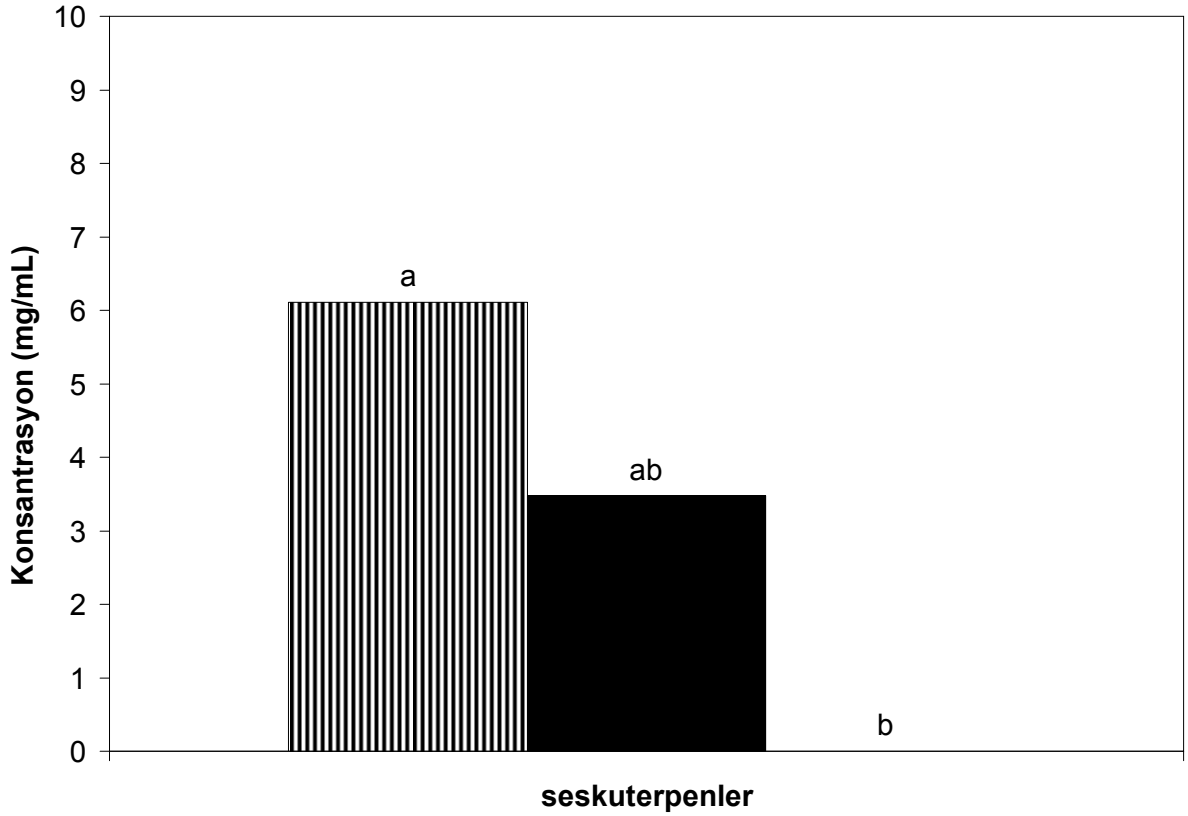
Defne uçucu yağındaki oksijenli bileşenler % 70-75 oranında eterlerden (yaklaşık % 70'i 1,8-sineol) oluşmaktadır. Geri kalanı ise alkol, aldehid, keton, ester, lakton ve fenollerdir (Tablo 3). Bunların arasında sadece eter ve ketonlar işlem sırasında çok az da olsa azalmıştır. Eterlerin oksijenli bileşenler arasında önemli bir yeri olduğundan işlem sırasında oksijenli bileşenlerin konsantrasyonundaki azalış eterlerdeki, özellikle 1,8-sineol'deki azalıştır. Bunlar yüksek sıcaklık ve/veya hidrolitik etkilerden dolayı kayba uğramış olabilir.

Şekil 7 ve 8, defne yağının farklı koşullarda ekstraksiyonu sonunda monoterpen hidrokarbon, oksijenli bileşen ve seskiterpen içeriklerinin değişimini göstermektedir. İstatistiksel olarak monoterpen hidrokarbon ve oksijenli bileşen kompozisyonları açısından metodlar ve mikrodalga güçleri arasında bir fark görülmemiştir ($p \leq 0.05$) (Şekil 7).



Şekil 7. *Laurus nobilis* L. uçucu yağında monoterpen hidrokarbon ve oksijenli bileşenlerin konsantrasyonlarının hidrodistilasyon ve çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu metodlarına göre değişimi (▨, ÇME-249 W mikrodalga gücü; ■, ÇME-622 W mikrodalga gücü; ▩, hidrodistilasyon)

*herbir bileşen grubunda farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$.



Şekil 8. *Laurus nobilis* L. uçucu yağında seskiterpenlerin konsantrasyonlarının hidrodistilasyon ve çözgensiz mikrodalga ekstraksiyonu metotlarına göre değişimi (▨, ÇME-249 W mikrodalga gücü; ■, ÇME-622 W mikrodalga gücü; ▨, hidrodistilasyon)
*herbir bileşen grubunda farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$.

Seskiterpenler diğer bileşenlere göre daha yüksek molekül ağırlık, daha düşük uçuculuk ve suda daha düşük çözünürlük değerlerine sahiptirler. Uçucu yağda maksimum seviyelere ulaşmaları için daha uzun süreye ihtiyaçları vardır. Bilindiği gibi hidrodistilasyonda bileşenlerin izolasyonu kaynama noktalarından çok polarlık derecelerine göre olmaktadır (ki bu sudaki çözünürlükleri ile ilgilidir). Bu nedenle hidrodistilasyon metodunda seskiterpenler özütlenememiştir (Şekil 8). ÇME metodunda ise sadece son zamanda ortaya çıkmışlardır. Bu durum, mikrodalga kullanıldığında bitki maddesinin içerisinde daha yüksek basınç farkı oluşması, buna bağlı olarak da özütlemenin daha kolay gerçekleşiyor olmasıyla açıklanabilir. Genel olarak antimikrobiyal ve antioksidan özellik taşıyan diğer bileşenlerle karşılaştırıldığında seskiterpenlerin gıdada bulunmaları çok avantajlı değildir. Bu nedenle hidrodistilasyon ÇME'ye göre daha avantajlı görünebilir fakat istenirse ÇME işlemi daha kısa sürede bitirilerek seskiterpenlerin özütlenmemesi sağlanabilir.

Tablo 3. Hidrodistilasyon ve farklı mikrodalga güçlerinde ÇME metodu ile elde edilen *Laurus nobilis* L. uçucu yağında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları

No	Bileşenler	RT 1 (dak) ^a	RT 2 (dak) ^b	Hidrodistilasyon			ÇME-622 W			ÇME-249 W		
				60 dak	75 dak	195 dak	7 dak	15 dak	85 dak	10 dak	25 dak	130 dak
				Konsantrasyon (mg/mL)			Konsantrasyon (mg/mL)			Konsantrasyon (mg/mL)		
1	α -tujen	6.043	9.852	2.447	2.189	3.448	1.697	1.840	3.289	2.004	2.555	2.665
2	α -pinen	6.287	10.179	19.517	24.243	38.981	9.729	19.977	38.889	9.716	20.036	32.622
3	kamfen	6.837	10.909	1.943	2.547	2.874	1.285	1.924	2.918	1.571	1.917	2.429
4	sabinen	7.875	12.186	39.496	43.163	47.032	25.591	41.582	53.446	26.364	41.023	46.693
5	β -pinen	7.986	12.348	20.397	24.263	32.354	11.106	20.339	33.284	12.165	20.882	30.212
6	α -fellandren	9.273	13.868	-	-	1.582	-	-	-	-	1.310	0.900
7	α -terpinen	9.882	14.580	3.050	3.258	4.915	1.604	2.184	4.459	2.078	2.152	4.246
8	p-simen	10.300	15.051	10.425	11.301	12.786	6.732	9.482	13.413	7.535	10.328	12.702
9	limonen		15.325	-	-	-	-	-	-	-	-	8.165
10	1,8-sineol	10.708	15.507	933.170	843.320	630.237	853.899	878.790	731.748	1011.908	874.094	653.048
11	γ -terpinen	12.133	17.120	5.769	6.495	8.885	3.207	3.981	8.181	2.684	4.460	8.742
12	terpinolen	13.795	18.953	1.571	1.628	2.915	-	1.084	2.301	-	1.187	2.603
13	linalol	14.627	19.878	2.219	2.691	2.399	2.469	2.994	2.172	2.273	2.969	2.478
	pinokarveol/trans											
14	-pinokarveol	16.729	22.116	10.259	11.441	9.828	11.118	13.460	11.296	9.088	13.042	12.072
15	kamfor	16.946	22.355	1.180	1.182	0.886	1.356	1.288	-	-	1.170	1.025
16	sabina keton	18.090	23.405	3.439	4.228	3.674	5.770	6.023	4.401	4.470	5.462	5.720
17	Pinokarvon	18.233	23.680	8.537	8.487	6.300	9.004	9.521	8.027	7.932	9.534	8.027
18	borneol	18.476	23.984	7.256	9.160	8.809	9.928	11.579	11.461	6.802	7.957	12.245

Tablo 3. (devamı)

19	4-terpineol	19.207	24.649	33.333	38.225	36.776	28.464	36.812	40.473	24.930	36.401	42.561
20	α -terpineol		25.756	1.850	2.148	2.222	2.266	2.831	2.899	1.349	2.485	3.060
21	mirtenal	20.430	25.877	10.103	10.916	10.091	9.633	12.342	12.500	8.346	11.552	12.494
22	kuminal	23.168	28.966	-	3.273	3.057	-	3.788	3.431	-	3.504	3.503
23	karvon	23.517	31.030	2.488	2.234	2.748	1.403	1.953	3.013	1.946	2.623	3.328
24	bornil asetat	26.197	31.656	3.560	4.238	4.536	3.000	4.305	4.830	3.201	4.050	4.365
25	kumik alkol	26.557	31.935	-	-	1.622	-	1.483	2.642	-	1.176	2.473
26	pseudolimonen	28.225	33.636	4.894	5.370	7.136	3.869	5.728	8.024	3.158	5.754	8.639
27	α -terpinil asetat	30.301	35.676	45.688	64.401	90.276	40.758	68.171	107.300	35.080	66.680	115.321
28	öjenol	30.719	36.107	5.840	8.012	12.153	7.491	11.084	16.364	5.405	8.517	17.321
29	elemen(?)	32.752	38.223	-	-	-	-	-	1.314	-	-	1.930
30	metil öjenol	33.864	39.078	5.316	9.228	12.075	6.795	10.080	14.757	5.054	8.087	14.933
31	β -karyofilen	34.214	39.793	-	-	-	-	-	2.283	-	-	3.101
	trans/sis-metil izo											
32	öjenol	39.382	44.690	-	-	-	-	-	1.631	-	-	0.996
33	β -ödesmol	47.696	53.238	-	3.258	4.043	-	-	4.838	-	-	3.893
	Dehidrokostuslakto											
34	n?	64.429	69.523	-	-	0.972	-	-	5.153	-	-	1.826
35	eremanthin(?)	64.990	70.082	-	-	-	-	-	3.052	-	-	-
	Toplamın yüzdesi (%)			95.028	93.550	91.264	92.907	92.212	88.685	93.350	91.860	88.749
	Monoterpen hidrokarbonlar			109.509	124.457	162.906	64.820	108.119	168.204	67.274	111.603	160.619
	Oksijenli bileşenler			1074.234	1026.438	842.704	993.355	1076.503	991.985	1127.782	1059.301	920.687
	Seskiterpenler			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3.597	0.000	0.000	5.030

^a: HP-5MS kolonunda MSD'de elde edilen dakika cinsinden alıkonma süresi;

^b: HP-5MS kolonunda FID'de elde edilen dakika cinsinden alıkonma süresi

MİKRODALGA YARDIMLI HİDRODİSTİLAYON (MYH) DENEYLERİ

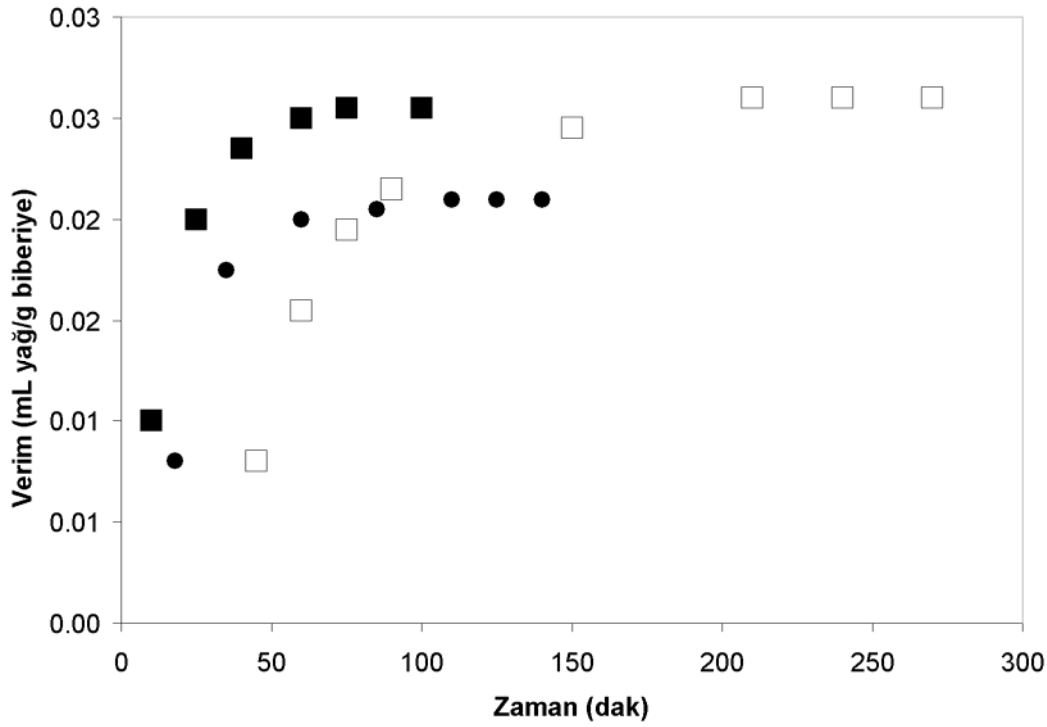
Biberiye

Uçucu yağ verimi

Su emme kapasitesi oldukça düşük olan biberiyede işlem sonunda bölgesel olarak yanmalar gözlenmesi üzerine bu bitkide çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu yöntemi yerine mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon yönteminin kullanılması uygun görülmüştür. Mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon yönteminin çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu yönteminden farkı, sisteme hidrodistilasyon yöntemindeki gibi oldukça büyük miktarda su eklenmesidir. Söz konusu sistemde, 50 g biberiyeye 350 mL distile su eklenmiştir. Hem mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon hem de geleneksel hidrodistilasyon yöntemlerinde biberiye:su oranı 1:7 olarak sabitlemiştir.

Şekil 9'da *Rosmarinus officinalis* L.'den farklı yöntemlerle elde edilen uçucu yağ miktarının zamana bağlı değişimi görülmektedir. Kekik ve defnede olduğu gibi mikrodalga gücü arttıkça yağ ekstraksiyon hızı artmaktadır. 622 W güçte çalışıldığında biberiyedeki yağın tamamının ekstraksiyonu için 75 dakika yeterli iken, 249 W güçte çalışıldığında bu sürenin 110 dakikaya çıktığı gözlenmiştir. Bu durum, azalan mikrodalga gücü ile doğru orantılı olarak basınç farkının azalması ve bu nedenle yağın ekstraksiyonunun yavaşlamasından kaynaklanmaktadır. Hidrodistilasyon işleminde ise maksimum verim için gerekli süre 210 dakikadır. Mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon yöntemi hidrodistilasyona nazaran işlem süresini % 65 oranında düşürmüş olmasından dolayı tercih edilebilir.

Elde edilen en yüksek verim MYH'de %100 (622 W) ve % 40 (249 W) mikrodalga güçleri kullanıldığında sırasıyla 0.026 ve 0.021 mL yağ/g biberiye, olmuştur. Hidrodistilasyonda ise yağ verimi 0.026 mL yağ/g biberiyedir. Elde edilen en yüksek verim sonuçları arasında hidrodistilasyon ve %100 güç kullanılarak yapılan MYH işlemleri arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($p \leq 0.05$). MYH işleminde % 40 güç kullanıldığında ise verim oldukça düşüktür. Bu durum, % 40 mikrodalga gücünde daha uzun süre devam eden ekstraksiyon işlemi sırasında uçucu yağda kayıp olmasından kaynaklanabilir.



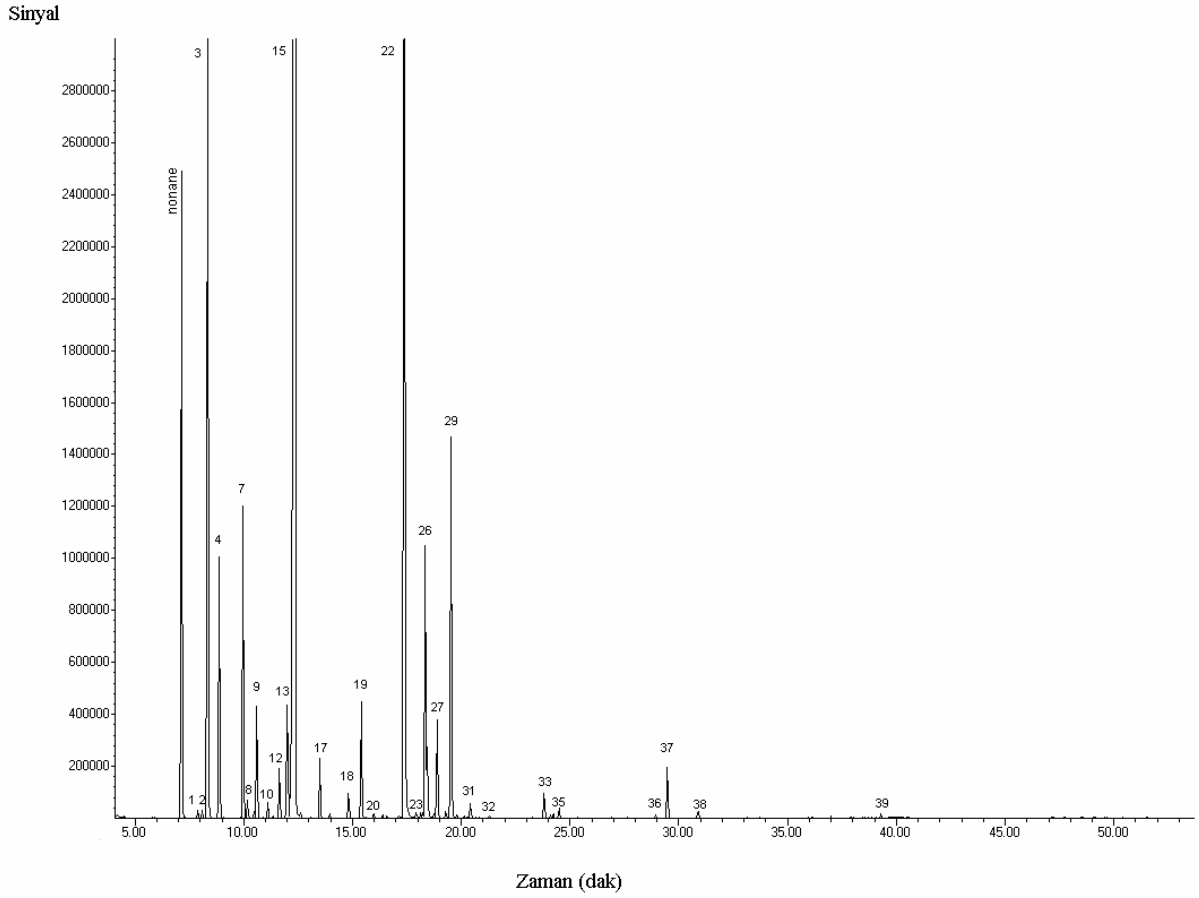
Şekil 9. Hidrodistilasyon ve mikrodalga yardımlı hidrodistilasyon teknikleriyle *Rosmarinus officinalis* L.'den elde edilen uçucu yağ veriminin zamana bağlı değişimi (■, MYH-622 W mikrodalga gücü^a; ●, MYH-249 W mikrodalga gücü^b; □, hidrodistilasyon^a)

* farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$.

Uçucu yağ kompozisyonu

Şekil 10'da % 100 mikrodalga gücünde çalışılarak elde edilmiş biberiye yağının GC-MS analizi sonucunda elde edilen toplam iyon kromatogramı görülmektedir. MYH ve hidrodistilasyon metodu ile elde edilen uçucu yağın bileşimleri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Farklı metodlarla elde edilen uçucu yağın kompozisyonları kalitatif olarak neredeyse aynıdır fakat kantitatif olarak farklılıklar vardır. *Rosmarinus officinalis* L uçucu yağında bulunan ana bileşenler 1,8-sineol (430-500 mg/mL), kamfor (150-210 mg/mL), α -pinen (65-85 mg/mL), α -terpineol (35-55 mg/mL), borneol (35-51 mg/mL), β -pinen (~33 mg/mL), ve kamfen (20-25 mg/mL) dir. Ayrıca uçucu yağın % 77-82'sinin oksijenli bileşiklerden, % 17-22'sinin monoterpen hidrokarbonlardan, % 0.5-0.7'sinin de seskiterpenlerden oluştuğu görülmüştür.

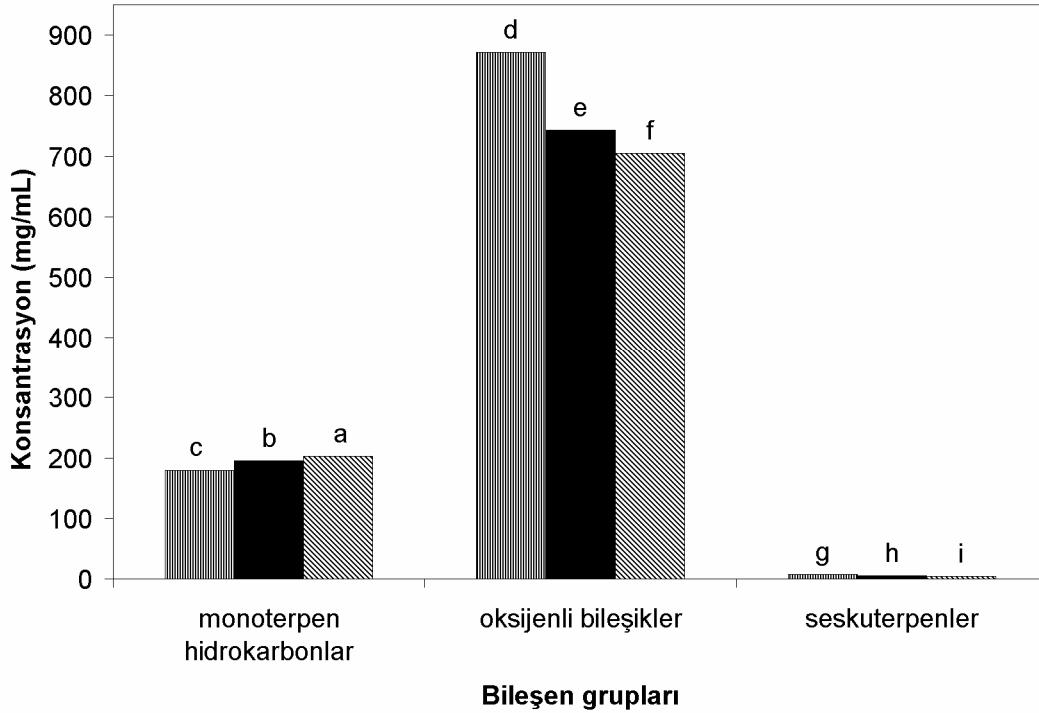


Şekil 10. Mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon metodu ile % 100 mikrodalga gücü kullanılarak elde edilen biberiye yağı numunesinin GC-MS analizi sonucu elde edilen toplam iyon kromatogramı

(1: trisiklen, 2: α -tujen, 3: α -pinen, 4: kamfen, 7: β -pinen, 8: 1-okten-3-ol, 9: β -mirsen, 10: α -felandren, 12: α -terpinen, 13: p-simen, 15: 1,8-sineol, 17: γ -terpinen, 18: terpinolen, 19: linalol, 20: fenkol, 22: kamfor, 23: izopulegol, 26: borneol, 27: 4-terpineol, 29: α -terpineol, 31: verbenon, 32: sitronello(?), 33: bornil asetat, 35: karvakrol, 36: methyl öjenol, 37: β -karyofilen, 38: α -humulen, 39: methyl jasmonat)

MYH sırasında oksijenli bileşenler zamanla artarken monotermen hidrokarbonlar azalmış, hidrodistilasyonda ise tam tersi bir durum gözlenmiştir (Tablo 4). Biberiyedeki oksijenli bileşenler başta eterler (~ %60), ketonlar (% 22-24) ve alkoller (%15-17)den oluşmaktadır. Eterlerin önemli bir kısmı 1,8-sineol'dür. Hem hidrodistilasyon hem de MYH metodunda, zaman ilerledikçe biberiyedeki seskiterpenlerin miktarlarında genel olarak artma gözlenmiştir. Bu durum bu bileşenlerin diğer bileşenlere göre daha yüksek molekül ağırlık, daha düşük uçuculuk ve suda daha az çözünürlük değerlerine sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Uçucu yağda maksimum seviyelere ulaşmaları için daha uzun süreye ihtiyaçları vardır.

Şekil 11’de biberiye yağının içerisinde bulunan oksijenli bileşenler, terpenler ve seskiterpenlerin farklı ekstraksiyon koşullarındaki konsantrasyonları görülmektedir. İstatistiksel olarak kompozisyon açısından metodlar arasında fark görülmüştür ($p \leq 0.05$). MYH ile elde edilen uçucu yağda bulunan oksijenli bileşenler istatistiksel olarak hidrodistilasyondakine göre yüksektir. Bu durum ekstraksiyon mekanizmalarındaki farklılık ile açıklanabilir. Hidrodistilasyonda ekstraksiyon uçucu yağ bileşenlerinin suda çözünmesi ve daha sonra buharlaşması ile olur. MYH’de ise içeride oluşan yüksek basınç ile keseciklerdeki uçucu yağ doğrudan buharlaşır. Sonuç olarak biberiye yağında hidrodistilasyon oksijenli bileşenlerin tamamının ekstraksiyonu için yetersiz kalmaktadır denilebilir.



Şekil 11. *Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağı bileşen gruplarının hidrodistilasyon ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon metodlarına göre değişimi (▨,hidrodistilasyon; ■, MYH-622 W mikrodalga gücü; ▮, MYH-249 W mikrodalga gücü)

* her bir bileşen grubunda farklı harflere karşılık gelen ekstraksiyon şartları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır, $p \leq 0.05$.

MYH ile elde edilen uçucu yağdaki monoterpen hidrokarbonlar hidrodistilasyonla elde edilenlere göre daha azdır ($p \leq 0.05$). MYH metoduyla elde edilen biberiyenin uçucu yağında konvansiyonel hidrodistilasyona göre daha fazla miktarda seskiterpen tespit edilmiştir. Bunun nedeni seskiterpenlerin yüksek molekül ağırlığına ve düşük polarlığa sahip bileşenler olmaları olabilir. Hidrodistilasyonda bileşenlerin ayrılması kaynama noktasına nazaran polarlık derecesine (su içindeki çözünürlük derecesini belirlemektedir) göre olmaktadır. Bu nedenle, suda tamamen çözünmedikleri için hidrodistilasyonda seskiterpenlerin tamamının eldesi mümkün olmamıştır. Ayrıca, 249 W mikrodalga gücünde elde edilen seskiterpen miktarı 622 W güçte elde edilene göre daha fazladır. Bunun nedeni, 249 W mikrodalga gücündeki uzun ekstraksiyon süresi olabilir.

Tablo 4. Hidrodistilasyon ve farklı mikrodalga güçlerinde MYH metodu ile elde edilen *Rosmarinus officinalis* L. uçucu yağında bulunan bileşenlerin konsantrasyonları

No	Bileşenler	RT 1 (dak)a	RT 2 (dak)b	Hidrodistilasyon			MYH-622 W mikrodalga gücü			MYH-249 W mikrodalga gücü		
				45 (dak)	75 (dak)	210 (dak)	10 (dak)	25 (dak)	75 (dak)	18 (dak)	35 (dak)	125 (dak)
				Konsantrasyon (mg/ml)			Konsantrasyon (mg/ml)			Konsantrasyon (mg/ml)		
1	trisiklen	7.910	13.401	0.903	0.649	0.837	1.177	1.170	1.523	1.481	0.813	0.659
2	alfa-tujen	8.095	13.549	0.841	0.489	0.718	0.991	0.981	0.868	1.324	0.542	0.922
3	alfa-pinen	8.350	13.889	79.625	53.477	85.710	120.695	78.877	84.323	100.176	55.743	66.427
4	kamfen	8.874	14.534	20.404	15.777	25.464	30.442	21.682	24.211	25.990	16.425	21.003
5	verbenen (?)	9.101	14.810	-	-	0.281	-	0.181	-	-	-	-
6	sabinen (?)	9.869	15.629	-	-	-	0.248	0.208	0.224	0.330	-	-
7	beta-pinen	9.970	15.760	27.696	21.647	32.847	41.549	31.049	33.161	37.266	25.532	32.859
8	1-okten-3-ol	10.176	16.096	2.118	1.435	1.423	1.787	1.537	1.332	2.345	1.406	1.637
9	beta-mirsen	10.605	16.291	9.108	6.786	11.579	14.622	10.272	11.234	13.003	9.581	12.416
10	alfa-fellandren	11.119	16.949	1.300	0.953	1.799	1.817	1.460	1.643	1.898	1.385	2.090
11	3-karen	11.378	17.213	0.000	0.000	0.742	0.661	0.235	0.000	0.260	-	0.319
12	alfa-terpinen	11.648	17.502	3.059	2.484	4.846	4.324	3.593	4.279	3.949	3.073	5.020
13	p-simen	12.014	17.875	7.556	7.277	11.010	9.536	8.160	10.046	8.372	8.352	11.651
14	limonen	-	18.080	4.138	7.131	15.151	16.454	11.683	14.826	6.270	5.438	15.654
15	1,8-sineol	12.363	18.234	538.797	461.529	436.875	409.754	441.957	450.188	461.570	461.844	498.831
16	sis-Okimen	12.644	18.909	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	gama-terpinen	13.502	19.407	3.521	3.284	6.219	4.764	4.529	5.582	4.457	4.449	6.810
18	terpinolen	14.826	20.771	1.763	1.728	5.332	2.447	2.592	3.081	2.209	2.275	3.723
19	linalol	15.413	21.214	13.520	13.385	14.352	12.248	15.251	13.583	14.756	16.750	17.438
20	fenkol	15.975	21.955	1.532	1.206	2.342	1.049	1.394	1.509	1.269	1.613	1.632
21	kamfolaldehid (?)	16.589	22.528	0.591	0.226	0.696	0.297	-	0.586	0.436	-	0.726

Tablo 4. (devamı)

22	kamfor	17.399	23.420	139.59	150.04	153.29	149.58	173.69	167.17	157.46	190.38	208.69
23	izopulegol	17.939	23.903	1.074	0.912	0.887	1.059	1.057	0.843	1.263	1.110	1.427
24	pinokamfon/izopinokamfon	18.146	24.140	1.030	0.784	0.727	0.843	0.724	0.764	0.907	0.917	1.118
25	pinokarvon/trans-pinokarvon	18.236	24.252	0.299	-	-	0.344	-	-	-	-	0.435
26	borneol	18.352	24.330	21.488	26.936	35.582	28.329	38.437	39.672	28.329	39.752	51.643
27	4-terpineol	18.892	24.837	7.568	8.820	10.497	8.153	10.727	11.294	8.444	12.081	14.928
28	p-simen-8-ol (?)	19.295	25.143	0.223	0.316	0.893	0.857	0.832	1.145	0.712	-	0.782
29	alfa-terpineol	19.539	25.401	18.104	25.886	36.869	26.356	40.711	41.003	25.611	41.425	54.200
30	mirtenol (?)	19.814	25.937	-	-	0.401	0.199	0.626	0.886	-	0.302	1.195
31	verbenon	20.418	26.315	1.389	1.787	2.939	2.133	2.876	3.273	1.769	2.370	3.713
32	sitronellol (?)	21.312	26.916	-	-	0.824	-	0.578	0.846	-	0.543	0.994
33	bornil asetat	23.812	29.552	2.241	2.253	3.212	2.991	3.006	3.261	2.987	3.204	4.619
34	timol	24.108	29.794	-	-	-	-	0.687	0.666	-	0.257	1.112
35	karvakrol	24.500	30.068	1.005	0.975	1.112	1.197	1.271	1.617	1.073	1.277	1.863
36	metil öjenol	28.964	34.339	-	-	1.040	-	0.978	1.169	-	0.578	1.458
37	beta-karyofilen	29.478	35.195	2.669	1.923	4.035	4.796	4.022	4.895	3.939	4.337	6.192
38	alfa-humulen	30.886	36.534	0.169	0.153	0.481	0.652	0.415	0.850	0.413	0.513	0.941
39	metil jasmonat	38.496	43.609	-	-	1.079	-	-	2.643	-	-	2.895
	Toplamın yüzdesi (%)			99.492	99.383	96.685	99.053	97.614	97.892	98.763	97.780	97.503
	hidrokarbonlar			159.91	121.68	202.53	249.72	176.67	194.99	206.98	133.60	179.55
	Monoterpen			3	0	5	7	2	9	5	8	4
	Oksijenli bileşenler			750.57	696.49	705.04	647.17	736.33	743.45	708.93	775.81	871.34
	Seskitерpenler			0	5	4	7	9	1	4	4	2
				2.838	2.076	4.516	5.447	4.436	5.745	4.352	4.850	7.133

^a: HP-5MS kolonunda MSD'de elde edilen dakika cinsinden alıkonma süresi;

^b: HP-5MS kolonunda FID'de elde edilen dakika cinsinden alıkonma süresi.

SÜPERKRİTİK KARBON DİOKSİT EKSTRAKSİYONU

Kekik yağı

Kekiğin 105 bar, 40°C da ve 30 dakikalık ekstraksiyonu sonucunda 0.055 mL yağ/g kekik ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Elde edilen kekik yağının içeriği Tablo 5'da verilmektedir. Bu değer hidrodistilasyonda elde edilen değere göre (0.048 mL yağ/g kekik) yüksektir. Ayrıca iki metodla elde edilen kekik yağının içeriği de farklılık göstermektedir. Hidrodistilasyonla elde edilen kekik yağında en çok sırası ile timol, p-simen, karvakrol, δ-terpinen, β-mirsen ve α-terpinen varken, süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen yağda en çok sırası ile timol, o-simen, karvakrol, δ-terpinen, α-terpinen ve β-mirsen tespit edilmiştir. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen *Origanum vulgare* L. yağının %73.16'sını oksijenli bileşikler, %24,57 sini monoterpen hidrokarbonları ve %0.75 ini seskiterpenler oluşturmaktadır. 40°C'ta ekstraksiyon basıncını kullanılan cihazın alt sınırı olan 103.5 bara düşürmek elde edilen kekik yağının oksijenli bileşik içeriğini %73.16'dan %78.63'e yükseltmiştir (Tablo 6). 30 dakikalık ekstraksiyon yerine 10'ar dakika aralıklar ile kekik yağı fraksiyonları toplandığında ilk 10 dakikalık fraksiyonda monoterpen hidrokarbonlarının, son 10 dakikalık fraksiyonda ise oksijenli bileşiklerin yüzdesinin 30 dakikalık ekstraksiyona göre daha fazla olduğu gözlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 5. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen kekik yağının içeriği (basınç=105 bar, sıcaklık=40°C, ekstraksiyon süresi=30 dakika)

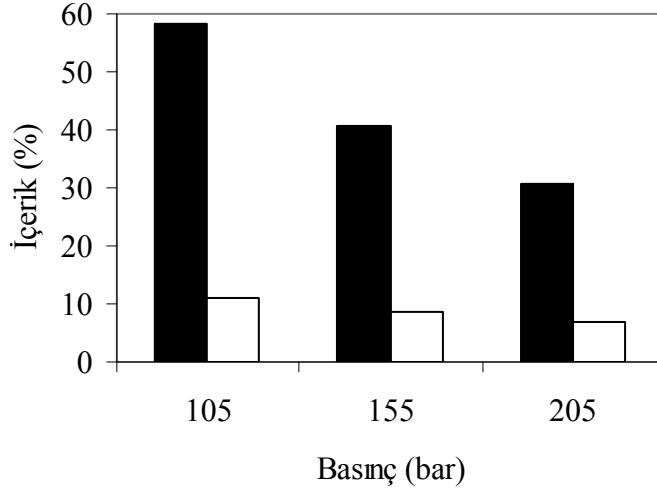
Bileşenler	% alan
α -tujen	0.33
α -pinen	0.59
kampen	0.10
β -terpinen	0.08
1-octen-3-ol	0.26
β -mirsen	1.26
α -fellandren	0.26
3-karen	0.09
α -terpinen	1.80
o-simen	14.45
limonen	0.63
γ -terpinen	4.90
δ -3-karen	0.08
α -terpinolen	0.18
isoborneol	0.04
4-terpineol	0.08
kuinon	0.39
timol	68.01
karvakrol	4.32
β -karyofilen	0.37
iso-karyofilen	0.06
α -humulen	0.07
β -bisabolen	0.07
metil- δ -ionon	0.06
tanımlanamayan	1.51
Toplam	99.99
Oksijenli bileşenler	73.16
Monoterpen hidrokarbonları	24.57
Sekuterpenler	0.75
Tanımlanamayan	1.51
Ekstraksiyon verimi (mL yağ/g kekik)	0.055

Tablo 6. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile kekik yağının ekstraksiyon süresine bağlı olarak ayrılan fraksiyonlarının ana bileşenleri (basınç=103.4 bar, sıcaklık=40°C)

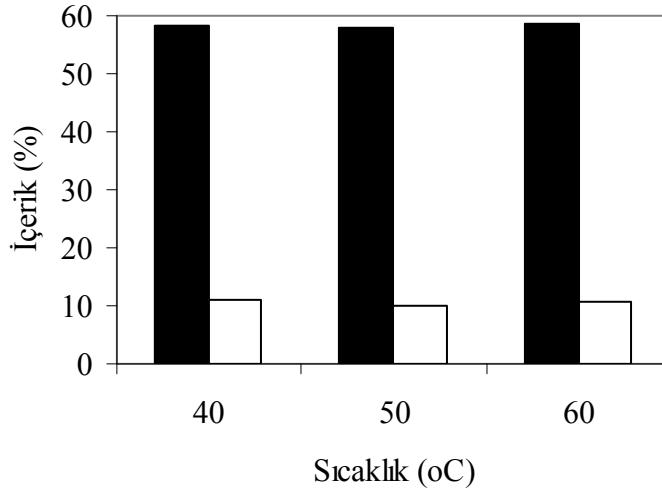
Bileşenler (% alan)	Toplam süre	Fraksiyon süreleri		
	(dakika)	(dakika)		
	30	0-10	10-20	20-30
α -tujen	0.42	0.52	0.38	0.32
α -pinen	0.43	0.59	0.44	0.39
kampen	0.08	0.12	0.07	-
1-Okten-3-ol	0.20	0.21	0.20	0.18
β -mirsen	1.03	1.31	0.95	0.83
α -felandren	0.23	0.28	0.21	0.18
α -terpinen	1.50	1.82	1.35	1.20
γ -terpinen	4.31	5.03	3.82	3.40
timol	73.74	68.40	73.92	77.52
karvakrol	4.69	4.62	4.94	5.02
Oksijenli bileşenler	78.63	73.23	79.06	82.72
Monoterpen hidrokarbonları	7.07	9.67	7.22	6.38

Defne yağı

Hidrodistilasyonda elde edilen verim 0.022 mL yağ/g defne iken süperkritik akışkan kullanılarak defnenin 105 bar, 40°C'da ve 30 dakikalık ekstraksiyonu sonucunda 1 g defneden 0.035 mL yağ elde edilmiştir. Elde edilen defne yağının içeriği Tablo 7'de verilmektedir. İki metodla elde edilen *Laurus nobilis* L. yağının içeriği farklılık göstermektedir. Hidrodistilasyonla elde edilen defne yağında en çok sırası ile 1,8-sineol, α -terpinil asetat, sabinen, α -pinen, 4-terpineol ve β -pinen varken, süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen defne yağında en çok sırası ile 1,8-sineol, α -limonen, sabinen, α -pinen, β -pinen, α -terpinolen, metil egunol ve 4-terpineol tespit edilmiştir. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen defne yağının %57.83 ünü oksijenli bileşikler, %24,77 sini monoterpen hidrokarbonları ve %2.33 ünü sekuterpenler oluşturmaktadır. 40°C ta 105, 155 ve 205 barda yapılan 30 dakikalık ekstraksiyonlar sonucunda; artan basınç ile defne yağındaki oksijenli bileşenler ve monoterpen hidrokarbonlarının yüzdesinin azaldığı görülmüştür (Şekil 12). 105 barda 40, 50 ve 60°C yapılan 30 dakikalık ekstraksiyon sonucunda ise sıcaklığın defne yağının içeriği üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı görülmüştür (Şekil 13).



Şekil 12. Basıncın süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen defne yağı içeriğine etkisi (sıcaklık=40°C, ekstraksiyon süresi=30 dakika, ■ oksijenli bileşikler, □ monoterpen hidrokarbonları)



Şekil 13. Sıcaklığın süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen defne yağı içeriğine etkisi (basınç=105 bar, ekstraksiyon süresi=30 dakika, ■ oksijenli bileşikler, □ monoterpen hidrokarbonları)

Tablo 7. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen defne yağının içeriği (basınç=105 bar, sıcaklık=40°C, ekstraksiyon süresi=30 dakika)

Bileşenler	% alan
α -pinen	3.8
sabinen	4.49
β -pinen	2.67
o-simen	0.87
limonen	1.31
1,8-sineol	50.71
γ -terpinen	0.57
δ -3-karen	0.07
m-kresol	0.46
4-terpineol	1.73
α -terpinolen	2.33
benzil alkoll	0.87
homofuranol	0.78
α -limonen	10.99
metil egunol	1.78
benzil butirat	0.55
benzoik asit	0.95
tanımlanamayan	15.05
Toplam	99.98
Oksijenli bileşenler	57.83
Monoterpen hidrokarbonları	24.77
Seskiterpenler	2.33
Tanımlanamayan	15.05
Ekstraksiyon verimi (mL yağ/g defne)	0.035

Biberiye yağı

Biberiyenin 105 bar, 40°C da ve 30 dakikalık ekstraksiyonu sonucunda 0.08 mL yağ/g biberiye ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. *Rosmarinus officinalis* L.'den elde edilen yağın içeriği Tablo 8'de verilmektedir. Elde edilen verim hidrodistilasyonda elde edilen verime göre (0.026 mL yağ/g biberiye) daha yüksektir. İki metodla elde edilen biberiye yağının içeriği de farklılık göstermektedir. Hidrodistilasyonla elde edilen biberiye yağında en çok sırası ile 1,8-sineol, komfor, α -pinen, α -terpineol, borneol, β -pinen ve kamfen varken, süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen biberiye yağında en çok sırası ile 1,8-sineol, α -pinen, konfor, benzil sinamat, kamfen, limonen, p-simen, β -pinen, ve α -terpineol tespit edilmiştir. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen biberiye yağının %63.75'ini oksijenli bileşikler, %33.17'sini monoterpen hidrokarbonları ve %2.35'ini seskiterpenler oluşturmaktadır.

Tablo 8. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edilen biberiye yağının içeriği (basınç=105 bar, sıcaklık=40°C, ekstraksiyon süresi=30 dakika)

Bileşenler	% alan
α -pinen	15.57
kampen	4.81
β -pinen	3.22
β -mirsen	1.45
α -terpinen	0.57
p-simen	3.23
limonen	3.57
1-8-sineol	35.94
o-simen	0.75
komfor	14.89
borneol	3.07
4-terpineol	0.61
α -terpineol	2.64
terpinil asetat	0.48
karvakrol	0.52
β -karyofilen	2.35
benzil sinamat	5.6
tanımlanamayan	0.71
Toplam	99.98
Oksijenli bileşenler	63.75
Monoterpen hidrokarbonları	33.17
Sekuterpenler	2.35
Tanımlanamayan	0.71
Ekstraksiyon verimi (mL yağ/g biberiye)	0.08

ANTIOKSİDAN AKTİVİTE

ABTS (2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radikalini inhibisyonu

Çalışmada kullanılan baharatlardan hidrodistilasyon ve farklı güçlerde ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların ABTS radikalini inhibisyon etkileri Tablo 9'da verilmektedir. Örnekler ABTS radikalini % 69.75 ile % 99.39 arasında değişen oranlarda inhibe etmiştir. *Origanum vulgare* L. için farklı mikrodalga güçlerinde ÇME ve hidrodistilasyon metodları ile elde edilen uçucu yağ ekstraktlarının ABTS radikali üzerine inhibisyon etkileri arasında farklılık saptanmamıştır. MYH ile elde edilen biberiye ekstraktının ABTS radikali üzerine inhibisyon etkisi defne ve kekik için elde edilen inhibisyon etkisinden daha düşüktür ($p \leq 0.05$). Hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağların antioksidan etkileri karşılaştırıldığında ise kekik yağının (% 97.45) biberiye yağına (% 81.99) göre daha yüksek antioksidan etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Her iki yöntemle elde edilen biberiye uçucu yağının ABTS radikali inhibisyonlarında farklılık saptanmaması, MYH ekstraktında daha yüksek konsantrasyonda bulunan oksijenli bileşiklerin antioksidan aktivitede belirgin etkisi olmadığını düşündürmektedir. Erkan ve ark., (2008) karnosik asit ve rosmarinik asidin TEAC (Troloksa eşdeğer antioksidan kapasitesi) değerlerini sırasıyla 5.9 ve 3.7 mM, biberiye ekstraktının TEAC değerini ise 15.7 mg/ml olarak saptamışlardır.

Tablo 9. Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların ABTS radikali üzerine antioksidan etkileri

Baharatlar	ABTS radikalini inhibisyonu* (%)				Hidrodistilasyon
	ÇME / MYH				
	%100 güç	%80 güç	%60 güç	% 40 güç	
<i>Origanum vulgare</i> L.	99.09 ± 0.28 ^a	97.96 ± 0.24 ^a	99.39 ± 0.54 ^a	94.77 ± 4.12 ^a	97.45 ± 2.82 ^a
<i>Laurus nobilis</i> L.	93.88 ± 1.12 ^{ab}	--	--	94.13 ± 3.15 ^{ab}	92.06 ± 2.31 ^{ab}
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	69.75 ± 5.73 ^c	--	--	70.50 ± 3.93 ^c	81.99 ± 14.63 ^{bc}

* Farklı harflere karşılık gelen inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ($p \leq 0.05$)

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini inhibisyonu

Çalışmada kullanılan baharatların DPPH radikalini inhibisyon kapasiteleri ile ABTS radikalini inhibisyon kapasiteleri benzerlik göstermektedir. Baharatlar DPPH radikalini % 51.04 ile % 92.74 arasında değişen oranlarda inhibe etmiştir (Tablo 10). En düşük inhibisyon biberiye ekstraktları ile elde edilmiştir ($p \leq 0.05$). Ancak tüm örneklerde mikrodalga ile elde edilen ekstraktlar ile hidrodistilasyon ile elde edilen ekstraktlar arasında antioksidan aktivite açısından bir farklılık saptanmamıştır. Erkan ve ark., (2008) karnosik asit ve rosmarinik asidin DPPH radikalini inhibisyon kapasitelerini karşılaştırmışlar ve karnosik asidin (IC_{50} 33.1 μ M)

rosmarinik aside göre (IC₅₀ 72.3 µM) daha kuvvetli antioksidan aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır. Biberiye ekstraktı için ise IC₅₀ 54 µM olarak belirlenmiştir.

Tablo 10. Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların DPPH radikali üzerine antioksidan etkileri

Baharatlar	DPPH radikalının inhibisyonu* (%)				Hidrodistilasyon
	ÇME / MYH				
	%100 güç	% 80 güç	% 60 güç	% 40 güç	
<i>Origanum vulgare</i> L.	91.97 ± 1.39 ^a	91.27 ± 1.02 ^a	89.15 ± 0.39 ^a	92.74 ± 0.16 ^a	87.09 ± 0.31 ^a
<i>Laurus nobilis</i> L.	91.10 ± 1.62 ^a	--	--	76.30 ± 14.82 ^{ab}	83.32 ± 6.63 ^{ab}
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	60.55 ± 10.68 ^{bcd}	--	--	53.17 ± 3.52 ^{cd}	51.04 ± 18.39 ^d

* Farklı harflere karşılık gelen inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p≤0.05).

Hinneburg ve ark., (2006) fesleğen ve defnenin DPPH radikalının inhibisyon kapasitelerinin benzer ve diğer örneklerden yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonu

Baharatların linoleik asit peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri Tablo 11’de görülmektedir. Uçucu yağların linoleik asit peroksidasyonunu inhibisyon kapasiteleri % 32.85 ile % 92.49 arasında değişmektedir. Linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonu için elde edilen sonuçlar, uçucu yağların ABTS ve DPPH radikalleri üzerine inhibisyon etkilerinden daha farklıdır. Baharatların mikrodalga ekstraktları arasında en yüksek inhibisyon etkisi % 100 güçte ekstrakte edilen biberiyede saptanmıştır. En yüksek antioksidan aktivite sırasıyla biberiye (% 92.49), defne (% 70.57) ve kekik (% 32.85) uçucu yağlarında bulunmuştur. Kekikten % 100 güçte elde edilen uçucu yağın antioksidan kapasitesi ile benzer koşullarda elde edilen defne ve biberiye uçucu yağlarının antioksidan kapasiteleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (p≤0.05). Benzer olarak Erkan ve ark. (2008) biberiye ekstraktının linoleik asit sistemindeki antioksidan aktivitesinin ABTS ve DPPH radikallerine karşı gösterdikleri antioksidan aktiviteden farklı olduğunu belirlemişlerdir.

Tablo 11. Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların linoleik asit peroksidasyonu üzerine antioksidan etkileri

Baharatlar	Linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonu* (%)				Hidrodistilasyon n
	ÇME / MYH				
	%100 güç	% 80 güç	% 60 güç	% 40 güç	
<i>Origanum vulgare</i> L.	32.85 ± 4.99 ^a	89.93 ± 8.25 ^{bc}	74.62 ± 23.5 ^{bc}	85.57 ± 5.81 ^{bc}	90.43 ± 3.2 ^{bc}
<i>Laurus nobilis</i> L.	70.57 ± 5.89 ^{bc}	--	--	63.53 ± 17.8 ^d	89.18 ± 1.02 ^{bc}
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	92.49 ± 4.9 ^c	--	--	83.26 ± 1.93 ^{bc}	91.53 ± 3.58 ^{bc}

* Farklı harflere karşılık gelen inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p≤0.05).

Hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağ ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri ise benzer bulunmuştur. Hinneburg ve ark. (2006) fesleğen ve defnenin, linoleik asit peroksidasyonunu çalışmada kullanılan diğer baharatlara kıyasla daha yüksek oranda inhibe ettiklerini belirlemişlerdir.

Kekiğin mikrodalga ile % 100 güçte elde edilen uçucu yağının antioksidan aktivitesinin diğer örneklerle göre oldukça düşük olmasını yağın bileşimiyle ilişkilendirebilmek oldukça güçtür. Bu, araştırmacılar tarafından kabul gören bir yaklaşımdır. Baharatların uçucu yağlarının antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada Avlesi ve ark. 2004'e atfen metil kavikol ve anetolün, bu bileşenleri içeren yağların antioksidan etkilerinden sorumlu bileşenler olduğu belirtilmiştir (Tepe ve ark., 2006). Tomaino ve ark. (2005) ise baharat ekstratlarının antioksidan aktivitesinde etkin bileşiklerin öjenol ve timol gibi fenolik yapıya sahip bileşenler olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar uçucu yağlarda bulunan bileşenler ile antioksidan aktivite arasında ilişki olup olmadığını araştırmanın oldukça güç olduğunu belirtmiştir. Bu nedenle uçucu yağların aktivitesi üzerine yayınlanan çalışmalarda antioksidan aktivite sıklıkla deneysel desteği az olan sinerjizm, antagonizm gibi kavramlarla açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu yaklaşım büyük oranda kuramsal olmakla birlikte gözlenen biyolojik aktiviteyi açıklamada yararlı olmaktadır. Bu yaklaşımlar arasında öjenol içeren yağların, öjenol molekülünde fenolik grup bulunması nedeniyle daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olması sayılabilir. Bu görüşü destekleyen çalışmalar mevcuttur (Dorman ve ark., 2000; Ruberto ve Barata 2000; Lee ve ark., 2005). Bu yaklaşıma bir diğer örnek ise 180°C'ye ısıtılan küçük hindistan cevizi yağının serbest radikal tutma kapasitesindeki artışı, buna paralel olarak α -pinen, β -pinen ve sabinen miktarlarında kayda değer azalma ve safrol ve mirisetin içeriğinde artma ile ilişkilendiren Tomaino ve ark. (2005)'in çalışmasıdır. Erkan ve ark. (2008) linoleik asit peroksidasyonunun inhibisyonunu 500 nm'de örneğin absorbansı ile kontrolün absorbansını oranlayarak değerlendirmiştir. Düşük değerler güçlü antioksidan aktiviteyi göstermektedir. 72

saat inkübasyon sonunda karnosik asit, rosmarinik asit ve biberiye ekstraktının $A_{\text{örnek}}/A_{\text{kontrol}}$ değerleri sırasıyla 0.27, 0.47 ve 0.29 olmuştur.

ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTE

Çalışmada kullanılan baharatların hidrodistilasyon ve farklı güçlerde ÇME veya MYH ile elde edilen ekstraktlarının *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* 6538P, *Salmonella typhimurium* NRRL E 4463 ve *Listeria monocytogenes* Scott-A, kültürleri üzerine antimikrobiyal etkileri ile ilgili sonuçlar sırasıyla Tablo 12-15'de verilmiştir.

Tablo 12. Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların *Escherichia coli* O157:H7 üzerine antimikrobiyal etkileri

Baharatlar	Kontrol	İnhibisyon zon çapı (mm)				Hidrodistilasyon
		ÇME / MYH				
		%100 güç	% 80 güç	% 60 güç	% 40 güç	
<i>Origanum vulgare</i> L.	0 ^c	10 ^{a*}	10 ^a	10 ^a	0 ^c	10 ^a
<i>Laurus nobilis</i> L.	0 ^c	3.5 ^b	--	--	3.5 ^b	3.5 ^b
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	0 ^c	3.5 ^b	--	--	3.5 ^b	3.5 ^b

* Farklı harflere karşılık gelen inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. $p \leq 0.05$

Tablo 13. Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların *Staphylococcus aureus* 6538P üzerine antimikrobiyal etkileri

Baharatlar	Kontrol	İnhibisyon zon çapı (mm)				Hidrodistilasyon
		ÇME / MYH				
		%100 güç	% 80 güç	% 60 güç	% 40 güç	
<i>Origanum vulgare</i> L.	0 ^c	0 ^{d*}	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d
<i>Laurus nobilis</i> L.	0 ^c	4.5 ^a	--	--	3.5 ^b	4.5 ^a
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	0 ^c	3.5 ^b	--	--	3.5 ^b	2.5 ^c

* Farklı harflere karşılık gelen inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır. $p \leq 0.05$

Tablo 14. Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların *Salmonella typhimurium* NRRL E 4463 üzerine antimikrobiyal etkileri

Baharatlar	Kontrol	İnhibisyon zon çapı (mm)				Hidrodistilasyon
		ÇME / MYH				
		%100 güç	% 80 güç	% 60 güç	% 40 güç	
<i>Origanum vulgare</i> L.	0 ^c	10 ^{a*}	10 ^a	10 ^a	10 ^a	10 ^a
<i>Laurus nobilis</i> L.	0 ^c	2.5 ^b	--	--	2.5 ^b	2.5 ^b
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	0 ^c	1.5 ^c	--	--	1.5 ^c	1.5 ^c

* Farklı harflere karşılık gelen inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p≤0.05).

Tablo 15. Hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH ile elde edilen uçucu yağların *Listeria monocytogenes* Scott-A üzerine antimikrobiyal etkileri

Baharatlar	Kontrol	İnhibisyon zon çapı (mm)				Hidrodistilasyon
		ÇME / MYH				
		%100 güç	% 80 güç	% 60 güç	% 40 güç	
<i>Origanum vulgare</i> L.	0 ^c	4.5 ^{a*}	4.5 ^a	4.5 ^a	4.5 ^a	4.5 ^a
<i>Laurus nobilis</i> L.	0 ^c	0 ^c	--	--	0 ^c	0 ^c
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	0 ^c	2.5 ^b	--	--	2.5 ^b	2.5 ^b

* Farklı harflere karşılık gelen inhibisyon değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır (p≤0.05).

Tablo 12-15'den de görüldüğü gibi *Origanum vulgare* L. *S.aureus* dışında çalışmada kullanılan tüm patojenler üzerine farklı inhibisyon zonlarında antimikrobiyal aktivite göstermiştir. En fazla inhibisyon çapı *E. coli* O157:H7 ve *S. typhimurium* NRRL E 4463 üzerinde 10 mm olarak ölçülmüştür.

Yine benzeri şekilde *Origanum vulgare* L.'den dört farklı mikrodalga gücü kullanılarak ÇME ve ayrıca hidrodistilasyonla elde edilen yağların arasında da antimikrobiyal etki açısından bir farklılık gözlenmemiştir (p≤0.05).

Laurus nobilis L.'den elde edilen uçucu yağlar *L. monocytogenes* Scott-A üzerinde herhangi bir inhibitif etki göstermezken; *S. typhimurium* NRRL E 4463 ve *E. coli* O157:H7 üzerinde, %100 ve %40 mikrodalga gücü kullanılarak ÇME ve hidrodistilasyon yöntemi uygulanarak elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkileri arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p≤0.05).

Rosmarinus officinalis L.'den %100 ve %40 mikrodalga gücü kullanılarak ve hidrodistilasyon yöntemi uygulanarak elde edilen uçucu yağların çalışmada test edilen tüm

patojenler üzerine antimikrobiyal etkileri incelendiğinde aralarında bir fark olmadığı saptanmıştır ($p \leq 0.05$).

Yapılan araştırmalar baharatların kendilerinin, etken maddelerinin ve uçucu yağlarının gıdalardaki bozulmaya neden olan mikroorganizmalar ve gıda kaynaklı patojenler üzerine antimikrobiyal etkilerinin olduğunu göstermektedir. Adaçayı, anason, defne, hardal, karabiber, kekik, kimyon, nane, sarımsak, tarçın gibi birçok baharatın *Bacillus cereus*, *B.subtilis*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* gibi çeşitli bakterilere ve ayrıca çeşitli funguslara karşı inhibitif etkisi olduğu bildirilmiştir (Beuchat, 1976; Moore ve Atkins,1977; Huhtanen, 1980; Aktuğ ve Karapınar, 1986; Smith-Palmer ve ark., 1998; Paster ve ark.,1995; Sağıdıç, 2003).

Yapılan bir çalışmada yedi baharat (kimyon, *Helichyrysum compactum* Boiss, defne, mersin, oregano türü kekik, adaçayı ve thymus türü kekik) ekstraktının *E.coli* 0157:H7 üzerine antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Sonuç olarak thymus ve oregano türü kekiklerin diğer baharatlara göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Sağıdıç ve ark., 2002). Bir başka çalışmada ise *Origanum vulgare* uçucu yağının çeşitli gram(+) ve gram(-) saprofit ve/veya gıda kaynaklı patojen bakteri üzerine antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir. Sonuçlar uçucu yağın kuvvetli bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (Leite de Souza ve ark., 2006).

İki farklı tipteki kekikden elde edilen uçucu yağların *Listeria monocytogenes*'in temel protoplazmik yapısında meydana getirdikleri değişikliklerin saptandığı bir çalışmada; kekik yağının antilisterial etkisinin, literatürde belirtilen nisin ve elektrik şokunun birlikte kullanımıyla oluşan etkiden daha kuvvetli olduğu gözlenmiştir (Rasooli ve ark., 2006).

Yapılan bir başka çalışmada beş farklı fesleğen (Anise, Bush, Cinnamon, Dark Opal ve kurutulmuş fesleğenin ticari bir örneği) çeşidinden hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağlarının antimikrobiyal etkileri; agar difüzyon metoduyla gıda kaynaklı gram(+) ve gram(-) bazı bakterilere, mayalara ve küflere karşı incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda fesleğen çeşitlerinin tümünün *Flavimonas oryzihabitans* ve *Pseudomonas* türleri dışında test edilen organizmaların çoğuna karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri gözlenmiştir (Lachowichz ve ark., 1998).

Fesleğen ve karabiber uçucu yağlarının *Stenotrophomonas maltophilia*' a karşı antimikrobiyal aktivitelerini saptamak amacıyla yapılan bir çalışmada; fesleğenden buhar destilasyonu ile elde edilen linalolün *S. maltophilia*'a karşı karabiber yağından daha fazla etki gösterdiği saptanmış (Driffield ve ark., 2006). Diğer yandan Lachowichz ve ark. (1998) da, saf linololün fesleğen yağıyla benzer geniş antimikrobiyal spektruma sahip olduğunu bildirmişlerdir.

İki thymus türü (*Thymus vulgaris* L. ve *Thymus serpyllum* L.) ve üç origanum türü (*Origanum vulgare* L., *Origanum onites* L. ve *Origanum majorana* L.) kekik hidrozollerinin,

dört patojen bakteriye (*Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7 ATCC 33150, *Staphylococcus aureus* ATCC 392 ve *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501) karşı inhibe edici etkileri açısından incelendikleri bir çalışmada; bakterilerin hepsinin, tüm baharat hidrozolleri tarafından inhibe edildikleri gözlenmiştir (Sağdıç, 2003).

Origanum sipyleum ekstraktının antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada bu ekstraktın *Yersinia enterocolitica* dışındaki test edilen tüm bakteri hücrelerine (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7965, *Bacillus cereus* FMC 19, *Enterobacter aerogenes* CCM 2531, *Escherichia coli* DM, *E. coli* O157:H7 KUEN 461, *Enterococcus faecalis* ATCC 15753, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Mycobacterium smegmatis* RUT, *Proteus vulgaris* FMC 1, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas fluorescens* EU, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* Cowan 1 ve *Yersinia enterocolitica* EU) karşı etkili olduğu bulunmuştur (Özkan ve ark., 2007).

Burt ve Reinders (2003) üç farklı sıcaklıkta *Escherichia coli* O157:H7 üzerine defne, karanfil, *Origanum vulgare*, iki *Thymus vulgaris* çeşidi baharatların uçucu yağlarının antibakteriyal özelliklerini inceledikleri bir çalışma sonucunda oregano türü kekiğin ve *Thymus vulgaris* uçucu yağlarının gıdalarda *E.coli* O157:H7'nin sayısını azaltmada veya gelişimini engellemede etki gösterebilecekleri saptanmıştır.

Portekiz'in farklı bölgelerinde yetiştirilen thymus türü kekiklerin (*Thymus mastichina* (L) *L. subsp. mastichina*, *T. camphoratus* and *T. Lotocephalus*) uçucu yağlarının *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Faleiro ve ark., 2003).

Farklı güç kullanılarak mikrodalgada elde edilen ekstraktlar ve hidrodistilasyon ile elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri, yapılan araştırmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında benzerlikler görülmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Oregano bitkisinde yüksek mikrodalga gücünde ÇME kullanıldığında konvansiyonel hidrodistilasyona göre hem işlem süresi çok kısalmıştır hem de daha yüksek verimde uçucu yağ elde etmek mümkün olmuştur. Ana aroma bileşeni *Origanum vulgare* L. bitkisi için timol olarak bulunmuştur. Her iki metod kullanıldığında elde edilen uçucu yağ kompozisyonu birbirinden farklı bulunmamıştır. Bu, ÇME'nin ürün kalitesini farklı bir şekilde etkilemediğini göstermektedir. Öte yandan, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile elde edilen kekik yağının kompozisyonu farklılık göstermektedir. Oksijenli bileşenlerin süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda daha düşük olduğu görülmüştür. Sonuç olarak basit ve hidrodistilasyona göre zamanı kısaltan bir metod olan ÇME, *Origanum vulgare* L bitkisinden uçucu yağ eldesi için alternatif bir metod olarak düşünülebilir. Antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde ise farklı mikrodalga güçleri ve ÇME ve hidrodistilasyon metodları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Laurus nobilis L. bitkisi için ana aroma bileşeni 1,8-sineol'dur. ÇME ve hidrodistilasyon kullanıldığında *Laurus nobilis* L. bitkisinin elde edilen uçucu yağ verimi birbirinden farklı bulunmamıştır. Her iki metodla elde edilen kompozisyonlar sekuterpenler dışında aynıdır. Hidrodistilasyonla defnede seskiterpenler elde edilmemiştir. Uçucu yağda seskiterpenlerin bulunması antimikrobiyal ve antioksidan özellik gösteren diğer bileşenlere göre avantajlı olmadığı için uçucu yağ içerisinde seskiterpenler istenmezse ÇME de ekstraksiyon süresi daha da kısa tutulabilir. Bu, ayrıca işlem süresinin daha da kısaltılması açısından avantajlıdır. Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonunda ise verim daha yüksek olduğu halde, oksijenli bileşenler daha düşük miktardadır. ÇME metodu ile elde edilen ürün kalitesi hidrodistilasyondaki ile neredeyse aynı olduğu için ÇME defneden uçucu yağ eldesi için alternatif bir metoddur. Ayrıca ÇME ve hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağların antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinde farklılık saptanmaması, süre avantajı nedeniyle mikrodalga ekstraksiyonunu ön plana çıkarmaktadır.

Biberiyenin uçucu yağ kompozisyonunda en önemli bileşenler 1,8-sineol ve kamfordur. Biberiyede çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu yöntemi yerine mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon yönteminin kullanılması uygun bulunmuştur. Yüksek mikrodalga gücünde MYH ile elde edilen uçucu yağ verimi ile hidrodistilasyonla elde edilen verim arasında önemli bir fark bulunmamıştır ancak MYH ile işlem süresi önemli derecede kısalmaktadır. MYH kullanıldığında hidrodistilasyona ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonuna göre daha fazla oksijenli bileşenler ve seskiterpenler ve düşük miktarda monoterpen hidrokarbonlar tespit edilmiş ve bu MYH metoduyla hidrodistilasyona göre daha kaliteli uçucu yağ elde edilebileceğini göstermektedir. Hem kaliteli uçucu yağ elde edilen, hem de işlem süresini önemli derecede kısaltan ve antioksidan ve antibakteriyel aktivite açısından hidrodistilasyon

yönteminden farklı olmayan MYH yöntemi biberiye için hidrodistilasyona alternatif olarak önerilebilir.

105 bar, 40°C da ve 30 dakikalık süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonları sonucunda hidrodistilasyondan daha yüksek verim elde edilmesine rağmen bütün yağların oksijenli bileşikleri hidrodistilasyon ve ÇME veya MYH metodlarındakine göre daha düşüktür. Bunun nedeninin çalışılan cihazın alt basınç sınırının 103.4 bar olduğu düşünülmektedir. Karbon dioksitin uçucu yağ seçiciliği 40°C, 80-100 bar arasında daha yüksektir (Reverchon, 1997). Mevcut sistemde süreye bağlı olarak, oksijenli bileşenlerce daha zengin yağ fraksiyonları elde etmek mümkündür. Ekstraksiyon basıncının artırılması, elde edilen yağların verimini az da olsa arttırsa da, oksijenli bileşik içeriğini azaltmaktadır. Ekstraksiyon sıcaklığının artırılmasının ise elde edilen yağların içerikleri üzerinde belirgin bir etkisi yoktur.

REFERANSLAR

- ACAR, J., Gıda Kimyası, ed: Saldamlı, İ., *Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, (1998) pp. 435-452.
- AKGÜL, A., Kıvanç, M. Inhibitory effects of 6 turkish thyme-like spices on some common foodborne bacteria *Nahrung-Food*, 32 (2), 201-203 (1988).
- AKGÜL, A., Kıvanç, M. Chemical composition and antimicrobial effect of Turkish laurel leaf oil. *Journal of Essential Oil Research*, 1 , 277-280 (1989).
- AKTUĞ Ş. E., Karapınar M. Sensivity of some common food-poisoning bacteria to thyme, mint and bay leaves. *Interernational Journal of Food Microbiology*, 3, 349-354 (1986).
- AMMANN, A., Hinz, D.C., Addleman, R.S., Wai, C.M., Wenclawiak, B.W. Superheated water extraction, steam distillation and SFE of peppermint oil. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 364 (7), 650-653 (1999).
- ANGIONI A., Barra A., Cereti E., Barile D., Coisson J.D., Arlorio M., Dessi S., Coroneo V., Cabras P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3530-3535 (2004).
- ATTI-SANTOS, A.C., Rossato, M., Pauletti, G.F., Rota, L.D., Rech, J.C., Pansera, M.R., Agostini, F., Serafini, L.A., & Moyne, P. Physico chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 48 (6), 1035-1039 (2005).
- BARATTA, M.T., Dorman, H.J.D., Deans, S.G., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., & Ruberto, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils, *Flavour and Fragrance Journal*, 13, 235-244 (1998).
- BESTMANN, H. J., Erlen, J., Vostrowsky, O. Extraktion von thymian mit flüssigem CO₂ im LabormaBstab. *European Food Research and Technology*, 180, 491-493 (1985).
- BEUCHAT, L. R. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to Spices and Organic Acids. *Journal of Food Science*, 41, 899-902 (1976).
- BIONDI, D., Cianci, P.; Geraci, C., Ruberto, G. Piattelli, M. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. *Flavour Fragrance Journal*, 8, 331-337 (1993).
- BORGES, P., Pino, J., Sanchez, E. Isolation and chemical characterization of laurel leaf oil. *Die Nahrung*, 36, 494-496 (1992).
- BOUZOUITA, N., Nafti, A., Chaabouni, M.M., Lognay, G.C., Marlier, M., Zghoulli, S., Thonart, P. Chemical composition of *Laurus nobilis* oil from Tunisia. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 116-117 (2001).

- BOUZOUITA, N., Kachouri, F., Hamdi, M., Chaabouni, M.M. Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 380–383 (2003).
- BRACA, A. Tommasi, N.D., Bari, L.D., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. *Journal of Natural Products*. 64, 892-895 (2001).
- BUFFLER, C. *Microwave cooking and processing: Engineering Fundamentals for the Food Scientist*. Avi Book, New York (1993).
- BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223-253. (2004).
- BURT, S.A., & Reinders, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36 (3), 162–167 (2003).
- CAPECKA, E., Mareczek, A., & Leja, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. *Food Chemistry*, 93 (2), 223-226. (2005).
- CATCHPOLE, O.J, Grey, J.B. Near-critical extraction of sage, celery and coriander seeds. *Journal of Supercritical Fluids*, 9: 273-279 (1996).
- CHEN, S. S., M. Spiro. Study of microwave extraction of essential oil constituents from plant materials. *Journal of Microwave Power Electromagnetic Energy*, 29, 231-241 (1994).
- CHIPAULT, J. R., Mizumo, G. R., Hawkins, J. M., Lundberg, W. O. The antioxidant properties of natural spices. *Food Research*, 17, 46-55 (1952).
- DADALIOGLU, I., Evrendilek, G.A. Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8255-8260 (2004).
- DIAZ-MAROTO, M.C., Perez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D. Effect of drying method on the volatiles in bay leaf (*Laurus nobilis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4520-4524 (2002).
- DRIFFIELD, K.L., Mooney, L., Kerr, K.G. Temperature- dependent changes in susceptibility of *Stenotrophomonas maltophilia* to the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum*) and black pepper (*Piper nigrum*). *Pharmaceutical Biology*, 44, 113-115. (2006).
- DORMAN, H.J.D., Deans, S.G., Noble, R.C. Evaluation in vitro plant essential oils as natural antioxidants, *Journal of Essential Oil Research*, 71, 645-651 (1995).
- ELLERBE, R. W. Steam Distillation/Stripping, In *Handbook of Separation Techniques for Chemical Engineers*, ed: Schweitzer P.A. McGraw Hill, New York (1979).
- EL-MASSRY, K.F., El-Ghorab, A.H., Farouk, A., Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica*, *Food Chemistry*, 79, 331-336 (2002).

- ERKAN, N., Ayrancı, G., Ayrancı, E., Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract black seed (*Nigella Sativa* L.) essential oil carnosic acid rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, 10.1016/j. foodchem.2008-01.058.
- ESKILSSON, C. S., Björklund, E. Analytical-scale microwave assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902, 227-250 (2000).
- FALEIRO, M.L., Miguel, M.G., Ladeiro, F., Venancio, F., Tavares, R., Brito, J.C., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 35- 40 (2003).
- FARAG, R.S., Badei, A.Z..M.A., Hewedi, F.M., El-Baroty, G.S.A. Antioxidant activity of some spice essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. *Journal of American Oil Chemists Society*, 66, 792-799 (1989).
- FERHAT, M.A., Tigrine-Kordjani, N.,Chemat, S., Meklati, B.Y., & Chemat, F. Rapid extraction of volatile compounds using a new simultaneous microwave distillation: Solvent extraction device. *Chromatographia*, 65 (3-4), 217-222 (2007).
- FLAMINI, G., Cioni, PL., Morelli, I., Macchia, M., & Ceccarini, L. Main agronomic-productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L. and chemical composition of their essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (12), 3512-3517 (2002).
- GASPAR, F, Leeke, G. Comparison between compressed CO2 extracts and hydrodistilled essential oil. *Journal of Essential Oil Research*,16, 64-68 (2004)
- GARCIA-AYUSO, L. E., Velasco, J., Dobarganes, M. C., Luque de Castro, M. D Accelerated extraction of fat content in cheese using focused microwave-assisted Soxhlet device. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2308-2315 (1999a).
- GARCIA-AYUSO, L. E., Velasco, J., Dobarganes, M. C., Luque de Castro, M. D Double use of focused microwave irradiation for accelerated matrix hydrolysis and lipid extraction in milk samples. *International Dairy Journal*, 9, 667-674 (1999b).
- GARCIA-AYUSO, L. E., Velasco, J., Dobarganes, M. C., Luque de Castro, M. D Determination of oil content of seeds by focused microwave-assisted soxhlet extraction. *Journal of Chromatographia*, 52, 103-108 (2000).
- GÜNER, A., Ozhatay, N., Ekim, T., & Baser, K. H. C. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 11 (supplement II)). Edinburgh: Edinburgh University Press (2000).
- HAMMER, K. A.; Carson, C. F.; Rley, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 985-990 (1999).
- HANCI, S.S., Sahin, S., Yilmaz, L. Isolation of volatile oil from thyme (*Thymbra spicata*) by steam distillation. *Nahrung-Food*, 47 (4), 252-255 (2003).

- HARRIS, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. Antimicrobial activity of Lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(6), 384-387 (1989).
- HINNEBURG, I., Dorman, H. J. D., Hiltunen, R., Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 89, 191-198 (2006).
- HUHTANEN, C. N. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. *Journal of Food Protection*, 43, 195-196, 200 (1980).
- IBANEZ, E., Oca, A., Murga G. Lopez-Sebastian S., Tabera, J., Reglero, G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different processed rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1400-1404 (1999)
- IRITI, M., Colnaghi, G, Chemat, F, Smadja, J., Faoro, F., & Visinoni, F.A. Histo-cytochemistry and scanning electron microscopy of lavender glandular trichomes following conventional and microwave-assisted hydrodistillation of essential oils: a comparative study. *Flavour And Fragrance Journal*, 21 (4), 704-712 (2006).
- KARAKAYA S., El S.N., Flavanoidler ve sađlık, *Beslenme ve Diyet Dergisi / J Nutr and Diet*, 26(2), 54-60 (1997).
- KARAKAYA S., El S.N., Quercetin, luteolin, apigenin, and kaempferol contents of some foods, *Food Chemistry*, 66, 289-292 (1999).
- KARGER B. L., Snyder L. R., Horvath C. *An Introduction to Separation Science*. John Wiley and Sons, pp. 181-209 (1973).
- KILIÇ, A., Hafizoglu, H., Kollmannsberger, H., Nitz, S. Volatile constituents and key odorants in leaves, buds, flowers and fruits of *Laurus nobilis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1601-1606 (2004).
- KING, M.B., Bott T.R. *Extraction of Natural Products using Near Critical Solvents*. Chapman and Hall, Glasgow, U.K. (1993).
- KOSAR, M., Tunalier, Z., Özek, T., Kurkcuoglu, M., & Baser, K.H.C. A simple method to obtain essential oils from *Salvia Triloba* L. and *Laurus nobilis* L. by using microwave-assisted hydrodistillation. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal Of Biosciences*, 60 (5-6), 501-504 (2005a).
- KOSAR, M., Özek, T., Goger, F., Kurkcuoglu, M., & Baser, K.H.C., Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the analysis of volatile secondary metabolites . *Pharmaceutical Biology*, 43 (6), 491-495 (2005b).
- KRELL E. *Handbook of Laboratory Distillation*. Elsevier Publishing Company, New York. (1963).
- KUO, J. M., Yeh, D. B., Pan, B. S. Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3206-3209 (1999).

- LACHOWICHZ, K.J., Jones, G.P., Briggs, D.R., Bienvenu, F.E., Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M.J. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 209-214 (1998).
- LEAL., P. F, Braga, M. E. M., Sato, D. N., Carvalho, J. E., Marques, O. M., Meireles, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2520-2525 (2003).
- LEITE DE SOUZA, E., Montenegro Stamford T. L., de Oliveira Lima E. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:527-532 (2006).
- LO PRESTI, M., Ragusa, S., Trozzi, A., Dugo, P., Visinoni, F., Fazio, A., Dugo, G., & Mondello, L. A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil. *Journal of Separation Science*, 28 (3), 273-280 (2005).
- LUCCHESI, ME., Chemat, F., Smadja, J., An original solvent free microwave extraction of essential oils from spices. *Flavour And Fragrance Journal*, 19 (2), 134-138 (2004a).
- LUCCHESI, M.E., Chemat F., & Smadja, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043 (2), 323-327 (2004b).
- LUCCHESI, M.E., Smadja, J., & Bradshaw, S. Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *Journal of Food Engineering*, 79 (3), 1079-1086 (2007).
- LUQUE-GARCIA, J L., Velasco, J., Dobarganes, M. C., Luque de Castro, M. D Fast quality monitoring of oil from prefried and fried foods by focused microwave-assisted Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 76, 241-248 (2002).
- MIURA, K., Nakatani, N. Antioxidative activity of flavonoids from thyme. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 3043-3045 (1989).
- MOORE, G., Atkins. R. The fungicidal and fungistatic effects of an aqueous garlic extract on medically important yeast-like fungi. *Mycologia*, 69, 341-348 (1977).
- NHU-TRANG, T.T., Casabianca, H., & Grenier-Loustalot, M.F. Deuterium/hydrogen ratio analysis of timol, karvakrol, gamma-terpinen and p-simen in thyme, savory and oregano essential oils by gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1132 (1-2), 219-227 (2006).
- ONDARZE, M., Sanchez, A. Steam distillation and supercritical fluid extraction of some Mexican spices. *Chromatographia*, 30,16-18 (1990)
- ÖZBAŞ, Z.Y., Aytaç, S.A. Çeşitli Laktobasil türlerinin yağsız süt ortamında *Escherichia coli* O157:H7 ve *Listeria monocytogenes* üzerine etkilerinin incelenmesi. *Kükem*, 19(1), 45-57 (1996).

- ÖZEK, T., Özek, G., & Baser, K.H.C. Comparison of the essential oils of three endemic Turkish *Heracleum* species obtained by different isolation techniques. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 605-610 (2005).
- ÖZER, E.Ö., Platin, S., Akman, U., Hortaçsu, Ö. Supercritical carbon dioxide extraction of spearmint oil from mint-plant leaves. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 74, 920-928 (1996).
- ÖZKAN, G., Sağdıç, O., Ekici, L., Öztürk, İ., Özcan, M.M. Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract, and its antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Food Lipids*, 14, 157-169 (2007).
- PASTER, N., Menasherov, M., Ravid, U., and Juven, B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection*, 58:81-85 (1995).
- PINO, J.; Borges, P.; Roncal, E. The chemical composition of laurel leaf oil from various origins. *Die Nahrung*, 37, 592-595 (1993).
- PINTORE, G., Usai, M., Bradesi, P., Juliano, C., Boatto, G., Tomi, F., Chessa, M., Cerri, R., & Casanova, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 15–19 (2002).
- RAMIREZ, P., Garcia-Risco, M.R., Santoyo, S. , Senorans, F.J., Ibanez, E., & Reglero, G. Isolation of functional ingredients from rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (5), 1606-1613 (2006).
- RASOOLI, I., Rezaei, M.B., Allameh, A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficiency of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, 10, 236- 241 (2006).
- RE, R., Pelegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237 (1999).
- REVERCHON, E., Osseo, L.S., Gorgoglione, D. Supercritical CO₂ extraction of basil oil: characterization of products and process modelling. *Journal of Supercritical Fluids*, 7, 185 (1994).
- REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *Journal of Supercritical Fluids*, 10, 1-37 (1997).
- RHYU, 1979; Rhyu, H.Y., Gas chromatographic characterization of oregano and other selected spices of the Labiatae family. *Journal of Food Science*, 44, 1373-1378 (1979).
- ROBARDS K., Prenzler P.D., Tucker G., Swaitsitang P., Glover W., Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, 401-436 (1999).

- RODRIGUES, M.R.A., Krause, L.C., Caramao, E.B., Dos Santos, J.G., Dariva, C., De Oliveira, J.V. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3042-3047 (2004).
- SACCHETI, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91, 621-632 (2005).
- SAĞDIÇ, O., Kuşçu, A., Özcan, M., Özçelik, S. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* 0157:H7. *Food Microbiology*, 19, 473-480 (2002).
- SAĞDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 36, 467- 473 (2003).
- ŞAHİN, F., Gulluce, M. Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M., Agar, G., & Ozer, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15, 549-557 (2004).
- SARTORATTO, A., Machado, A.L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., & Rehder, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275-280 (2004).
- SCHOENMAKERS, P.J., Oomen, J.L.M.M., Blomberg, J., Genuit, W., & Van Velzen, G. Comparison of comprehensive two-dimensional gas chromatography and gas chromatography – mass spectrometry for the characterization of complex hydrocarbon mixtures. *Journal of Chromatography A*, 892, 29-46 (2000).
- SCHWARZ, K., Ernst, H. Evaluation of antioxidative constituents from thyme. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 217-223 (1996).
- SHAHIDI F., Naczki M., *Food Phenolic Sources Chemistry Effects Applications*, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster-Basel, (1995) pp: 331.
- SIMANDI B., Oszagyan, M., Lemberkovcs, E., Kery, A., Kaszacs, J., Thyrion, F., Matyas, T. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. *Food Research International*, 31, 723-728 (1998).
- SIMIC, M., Kundakovic, T., Kovacevic, N. Preliminary assay on the antioxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia* 74, 613–616 (2003).
- SKERGET M., Kotnik P., Hadolin M., Hras, A.R., Simoncic, M., Knez, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191–198 (2005).

- SMITH-PALMER, A., Stewart, J., Fyfe, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 26, 118-122 (1998).
- SONSUZER, S., S. Şahin ve L. Yılmaz, Optimization of supercritical CO₂ extraction of *Thymbra spicata* oil, *The Journal of Supercritical Fluids*, 30, 189-199 (2004).
- STAHL-BISKUP, E. Essential oils of norwegian thyme species; II. *Thymus pulegioides*. *Planta Medica*, 52, 233-235 (1986).
- STASHENKO, E.E., Jaramillo, B.E., & Martinez, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025 (1), 93-103 (2004a).
- STASHENKO, E.E., Jaramillo, B.E., & Martinez, J.R. Analysis of volatile secondary metabolites from Columbian *Xylopiia aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1025 (1), 105-113 (2004b).
- TEPE, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., Polissiou, M. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae) *Food Chemistry*, 90, 333-340 (2005).
- TEPE, B., Akpulat, H. A., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutaş, O., Aydın, E., Polissiou, M., Sokmen, A. Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97, 719-724 (2006).
- TERANISHI R., Murphy E. L., Mon R. T. Steam Distillation- Solvent Extraction Recovery of Volatiles from Fats and Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25 (3), 464-470 (1977).
- TOMAINO, A., Cimino, F., Zimbalatti, V., Venuti, V., Sulfaro, V., De Pasquale, A., Saija, A., Influence of heating on antioxidant activity and the chemical comparison of some spice essential oils. *Food Chemistry*, 89, 549-554 (2005).
- WANG, Z.M., Ding, L., Wang, L., Feng, J., Li, T.C., Zhou, X., & Zhang, H.Q. Fast determination of essential oil from dried menthol mint and orange peel by solvent free microwave extraction using carbonyl iron powder as the microwave absorption medium. *Chinese Journal of Chemistry*, 24 (5), 649-652 (2006).
- ZHU, S.K., Lu, X., Dong, L., Xing, J., Su, X.L., Kong, H.W., Xu, G.W., & Wu, C.Y. Quantitative determination of compounds in tobacco essential oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1086 (1-2): 107-114 (2005).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 104O265
Proje Başlığı: Yeni Teknolojilerle Baharatlardan Esansiyel Yağ Ekstraksiyonu ve Bu Yağların Fiziksel, Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yürütücü: Prof.Dr. Serpil ŞAHİN Araştırmacılar: Prof.Dr. Servet Gülüm ŞÜMNÜ Doç.Dr. Esra YENER Prof.Dr. Sibel KARAKAYA Prof.Dr. Sedef NEHİR EL Y. Doç.Dr. Nural KARAGÖZLÜ
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: EGE ÜNİVERSİTESİ GIDA MÜH. BÖL. İZMİR CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ GIDA MÜH. BÖL. MANİSA KÜTAŞ TARIM ÜRÜNLERİ DIŞ TİC. A.Ş. İZMİR
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.06.2005-01.12.2007
Öz (en çok 70 kelime) <p>Bu çalışmada kekik, defne ve biberiye bitkileri ile çalışılmış ve farklı ekstraksiyon metodları ile elde edilen ürün, verim ve kompozisyon açısından karşılaştırılmıştır. Ayrıca, ürünün antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri tespit edilmiştir.</p> <p>Esansiyel (uçucu) yağlar çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon yöntemleri ile hidrodistilasyona göre daha kısa sürede elde edilebilmiştir. Genel olarak süperkritik karbondioksit metodu kullanıldığında verim daha yüksek olmuş ancak elde edilen yağın kompozisyonu diğer metodlardan elde edilenlere göre farklılık göstermiştir.</p>
Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite; antioksidan aktivite; ekstraksiyon; uçucu yağ; hidrodistilasyon; mikrodalga; <i>Laurus nobilis</i> L.; <i>Origanum vulgare</i> L.; <i>Rosmarinus officinalis</i> L.; süperkritik akışkan.
Projeden Yapılan Yayınlar: Proje kapsamında elde edilen sonuçlar kullanılarak Uluslararası dergilere 2 adet yayın hazırlanmıştır. Bir tanesi hala inceleme aşamasında, diğeri ise basılmıştır. Yayın bilgileri: Bayramoğlu, B., Sahin, S., Sumnu, G. 2008. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano, Journal of Food Engineering, 88: 535-540.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 104O265
Proje Başlığı: Yeni Teknolojilerle Baharatlardan Esansiyel Yağ Ekstraksiyonu ve Bu Yağların Fiziksel, Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yürütücü: Prof.Dr. Serpil ŞAHİN Araştırmacılar: Prof.Dr. Servet Gülüm ŞÜMNÜ Doç.Dr. Esra YENER Prof.Dr. Sibel KARAKAYA Prof.Dr. Sedef NEHİR EL Y. Doç.Dr. Nural KARAGÖZLÜ
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: ODTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü 06531 Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: EGE ÜNİVERSİTESİ GIDA MÜH. BÖL. İZMİR CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ GIDA MÜH. BÖL. MANİSA KÜTAŞ TARIM ÜRÜNLERİ DIŞ TİC. A.Ş. İZMİR
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.06.2005-01.12.2007
Öz (en çok 70 kelime) Bu çalışmada kekik, defne ve biberiye bitkileri ile çalışılmış ve farklı ekstraksiyon metodları ile elde edilen ürün, verim ve kompozisyon açısından karşılaştırılmıştır. Ayrıca, ürünün antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri tespit edilmiştir. Esansiyel (uçucu) yağlar çözümsüz mikrodalga ekstraksiyonu ve mikrodalga yardımcı hidrodistilasyon yöntemleri ile hidrodistilasyona göre daha kısa sürede elde edilebilmiştir. Genel olarak süperkritik karbondioksit metodu kullanıldığında verim daha yüksek olmuş ancak elde edilen yağın kompozisyonu diğer metodlardan elde edilenlere göre farklılık göstermiştir.
Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite; antioksidan aktivite; ekstraksiyon; uçucu yağ; hidrodistilasyon; mikrodalga; <i>Laurus nobilis</i> L.; <i>Origanum vulgare</i> L.; <i>Rosmarinus officinalis</i> L.; süperkritik akışkan.
Projeden Yapılan Yayınlar: Proje kapsamında elde edilen sonuçlar kullanılarak Uluslararası dergilere 2 adet yayın hazırlanmıştır. Bir tanesi hala inceleme aşamasında, diğeri ise basılmıştır. Yayın bilgileri: Bayramoğlu, B., Sahin, S., Sumnu, G. 2008. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano, Journal of Food Engineering, 88: 535-540.