



T.C.
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

PROJE ADI

Bilecik İlinde Yetiştirilen Şerbetçiotu'nun (*Humulus Lupulus L.*) Bazı Kimyasal Özellikleri, Ekstraksiyonu ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Yrd.Doç.Dr. Alev AKPINAR BORAZAN

ARAŞTIRMACILAR : Doç.Dr. Çağlayan AÇIKGÖZ, Uzm.Veli ŞİMŞEK

BAŞLAMA TARİHİ : 15.09.2010

BİTİŞ TARİHİ : 15.12.2012

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

BİLECİK, 2012

Bilecik İlinde Yetiştirilen Şerbetçiotu'nun (*Humulus Lupulus L.*) Bazı Kimyasal Özellikleri, Ekstraksiyonu ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

ÖZET

Bu çalışmada Bilecik ili Pazaryeri ilçesinde yetiştirilen farklı iki çeşit (E ve G kodu verildi) şerbetçiotu (*Humulus lupulus L.*) kullanıldı. Araştırma konusu şerbetçiotu çeşitlerinde % nem, % kül, % protein değeri gibi kimyasal analizler yanında farklı sokshlet ekstraksiyon koşullarının şerbetçiotu ekstraksiyon verimlerine etkisi incelendi ve elde edilen ekstrelerin DPPH yöntemi kullanılarak antioksidan aktivitesi ve Folin-Ciocalteu'nun fenol reaksiyonuna göre toplam fenol miktarı tayin edildi. Ekstraksiyon verimlerinin belirlenmesinde farklı çözücüler (n-hekzan ve dietileter) ve farklı ekstraksiyon süreleri (4 ve 6 saat) denendi.

Yapılan çalışmalarda sırasıyla E ve G şerbetçiotu % nem $11,58 \pm 0,02 - 10,72 \pm 0,25$; % kül $7,49 \pm 0,04 - 9,79 \pm 0,03$ ve % protein $15,13 \pm 0,15 - 17,06 \pm 0,03$ olarak elde edildi. Karbonhidrat ve selüloz içeriği diğer bileşenlerin farkından hesaplanmıştır. Farklı çözücülerle, farklı sürelerde iki çeşit şerbetçiotuna uygulanan sokshlet ekstraksiyonundaki ekstraksiyon verimi ile yağ verimi sırasıyla $\%81,15 \pm 0,31 - 93,99 \pm 0,26$; $\%16,20 \pm 0,43 - 31,06 \pm 0,31$ değerleri arasında bulundu. Ayrıca elde edilen her bir şerbetçiotu yağının refraktif indisi ve çözünür kurumaddesi de ($^{\circ}$ Briks) belirlendi.

E ve G kodlu şerbetçiotu peletlerinin metanolik ekstrelerinde en yüksek toplam fenol miktarı $112,76 \pm 6,02$ ve $134,01 \pm 5,59$ mg GAE/g olarak belirlendi. Şerbetçiotu metanolik ekstrelerinde belirlenen EC_{50} değeri $33,07 \pm 4,57$ ve $39,9 \pm 0,4$ μ g/ml arasında değişmektedir. Buna göre, G kodlu şerbetçiotunun en düşük EC_{50} değeriyle en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Şerbetçiotu, *Humulus lupulus L.*, Ekstraksiyon, DPPH, Toplam Fenol

Evaluation of Chemical Properties, Extraction Conditions and Antioxidant Activities of Hop (*Humulus Lupulus L.*) Cultivated From Bilecik Region

ABSTRACT

In this study, two different hops (*Humulus lupulus L.*) varieties (code E and G), cultivated from Bilecik region in Turkey, were investigated. Composition analyses were applied to the samples; moisture content, ash value and crude protein (N*6.25). Carbohydrate and fiber content was estimated by difference of the other components. Effect of Soxhlet extraction condition on extraction yield of each hops varieties were determined. For determination of total phenolic content Folin-Ciocalteu method and for evaluating antioxidant activities; DPPH radical scavenging activity assay was used. Different extraction solvents (n-hexane and diethyl ether) and time (4 and 6 h.) were used for the determination of the highest extraction yield was selected for the analysis.

Moisture content, ash value and crude protein of hops (with E and G code) were ranged from 11.58 ± 0.02 - $10.72\pm 0.25\%$, 7.49 ± 0.04 - $9.79\pm 0.03\%$, 15.13 ± 0.15 - $17.06\pm 0.03\%$ respectively. The highest extraction yield was determined $93.99\% \pm 0.29$ on E which was extracted with hexane for 6 hours and the highest oil yield was determined $31.06\% \pm 0.39$ on E which was extracted with diethyl ether for 4 hours. The highest total phenolic content for E and G hops were 112.76 ± 6.02 and 134.01 ± 5.59 mg GAE/g methanol extracts of hops. The EC₅₀ values were in the ranged from 33.07 ± 4.57 to 39.9 ± 0.4 µg/ml. The code G of hops had higher antioxidant activities and the lowest EC₅₀ values.

Key words: Hops, *Humulus lupulus L.*, Extraction, DPPH, Total phenolic content

TEŞEKKÜR

Hayata yaklaşımıyla bana örnek olan, bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe paylaşan, her aşamada sunduğu değerli fikirleriyle çalışmamı kolaylaştıran Sayın Doç. Dr. Çağlayan AÇIKGÖZ'e, teşekkür ederim.

Proje süresince analizlerin uygulanmasında harcadığı zaman ve emek için Arş.Gör.Ecem Müge ANDOĞLU'na ve çalışmam boyunca bana destek veren diğer herkese teşekkür ederim.

Projemizi destekleyen Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi BAP teşvik fonuna teşekkürlerimi sunarım.

Yrd.Doç.Dr. Alev AKPINAR BORAZAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	4
2.1. Şerbetçiotu (<i>Humulus lupulus L.</i>).....	4
2.2. Antioksidanlar ve Polifenolik Bileşikler	6
2.3. Şerbetçiotunun Antioksidan ve Polifenolik Karakterizasyonu.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Nem miktarı tayini	12
3.2.2. Kül miktarı tayini	12
3.2.3. Protein analizi	12
3.2.4. Çözücü ekstraksiyonu ile yağ miktarı ve verim tayini.....	13
3.2.5. Kırılma indisi ve briks derecesi tayini	13
3.2.6. Antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde tayini için ekstraksiyon yöntemi.....	14
3.2.6.1. Ham fenolik ekstresinin hazırlanması.....	14
3.2.6.2. Fenolik maddelerin hidrolizi.....	14
3.2.7. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması.....	14
3.2.8. Toplam fenol miktar tayini	14
3.2.9. DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini.....	15
4. ANALİZ VE BULGULAR.....	17
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	22
KAYNAKLAR	23
EKLER	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>SEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
Şekil 3.1. Şerbetçiotu kozalaklarının, pelete işlenme aşamaları.....	11
Şekil 3.2. Gallik asit konsantrasyon-absorbans kalibrasyon eğrisi.....	15
Şekil 3.3. DPPH konsantrasyon-absorbans kalibrasyon eğrisi	16
Şekil 4.1. Farklı çözücülerin farklı ekstraksiyon sürelerinde Şerbetçiotu ekstraksiyon verimine etkisi.....	18
Şekil 4.2. Farklı çözücülerle 4saat ekstre edilen şerbetçiotu % yağ verimleri	19
Şekil 4.3 Farklı çözücülerle 6saat ekstre edilen şerbetçiotu % yağ verimleri	19

TABLolar DİZİNİ

<u>TABLO</u>	<u>SAYFA</u>
Tablo 4.1. E ve G kodlu şerbetçiotu çeşitleri analiz sonuçları	17
Tablo 4.2. Farklı ekstraksiyon süresine göre Şerbetçiotu çeşitlerinin % ekstraksiyon verimleri	17
Tablo 4.3. Şerbetçiotu çeşitlerine ait toplam fenol miktarları (mg GAE/g ekstre)	20
Tablo 4.4. Şerbetçiotu metanolik ekstrelerinin DPPH üzerinden hesaplanan EC ₅₀ değerleri.....	20

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

nm	: nanometre
µg	: mikrogram
ml	: mililitre
L	: litre
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
DPPH	: 2,2- difenil-1-pikrilhidrazil
EC ₅₀	: %50 bozunmanın engellendiği antioksidan konsantrasyonu
A	: Absorbans
a	: Ağırlık-kütle
h	: Hacim
MeOH	: Metanol
E	: Şerbetçiotu çeşidi E
G	: Şerbetçiotu çeşidi G
KM	: Kuru madde
E4H	: Hekzan çözücüsü ile 4 saat ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi E
E6H	: Hekzan çözücüsü ile 6 saat ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi E
E4DEE	: Dietil eter çözücüsü ile 4 saat ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi E
E6DEE	: Dietil eter çözücüsü ile 6 saat ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi E
G4H	: Hekzan çözücüsü ile 4 saat ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi G
G6H	: Hekzan çözücüsü ile 6 saat ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi G
G4DEE	: Dietil eter çözücüsü ile 4 saat ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi G
G6DEE	: Dietil eter çözücüsü ile 6 saat ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi G
EM	: %70 metanol ile ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi G
GM	: %70 metanol ile ekstrakte edilen şerbetçiotu çeşidi E

1. GİRİŞ

2008 yılında yaklaşık 144 458 ton olarak gerçekleşen dünya şerbetçiotu üretiminde birinci sırayı, % 41,8'lik payıyla (%27.5Almanya) Avrupa Birliği almıştır. AB'nin ardından diğer en önemli şerbetçiotu üreticileri ise, %25,6'lık payıyla ABD ve % 6,5'lik payıyla Çin'dir (Anonim 2008).

Yetiştirilen türler açısından bakıldığında, AB'nin toplam şerbetçiotu alanının % 55'inde (12.000 ha) aromatik türler, geri kalan % 45'inde (10.000 ha) acı türlerin yetiştirildiği görülmektedir. Son zamanlarda, geleneksel acı türler olan Brewer's Gold ve Northern Gold'dan uzaklaşarak, süper alfa türlerine yönelim başlamıştır. İkinci büyük şerbetçiotu üreticisi olan ABD'de ise şerbetçiotu ekilen alanların ve şerbetçiotu üretimin yıllar içinde giderek azaldığı görülmektedir (Yücer ve ark. 2006; Ekmen 2006).

Şerbetçiotları, son derece dayanıklı ve uzun ömürlüdür. Ülkemizde şerbetçiotu tarımına 1965 yılında Bilecik ilinde başlanmış ve bira sanayinin gelişmesine paralel olarak bu bitkiye olan gereksinim hızla artmıştır. Bugün Pazaryeri ve Merkez ilçede lokalize olmuş üretim 308 ha alanda sürdürülmekte ve 931 ton yaş ürün elde edilmektedir. Bu üretimin %75'ini Pazaryeri, %25'ini de Merkez ilçe karşılamaktadır (Türker ve ark. 2001; Çakıcı ve ark. 2005). Şerbetçiotu ülkemizin bütün kuzey bölgelerinde yetiştirilebilir. Ancak, şerbetçiotu tarımı son yıllarda ağırlıklı olarak Bilecik ili ve ilçelerinde yapılmaktadır.

Flavonoidler meyvelerde, sebzelerde, fındık ve ceviz gibi sert kabuklu yemişlerde, tohumlarda, bitkilerin sap kısmında, çiçeklerinde, çayda, şarapta, propoliste ve balda yaygınca bulunmaktadır. Gıdalarda doğal olarak bulunan flavonoidler, antifugal, antiviral ve antibakterial aktiviteye sahiptir (Cowan 1999; Coşkun 2006). Polifenoller (fenolik asitler, flavonoidler ve prosiyanidinler-kondense tanenler) yenilebilir ya da gıda olarak tüketilmeye uygun olmayan bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir (Huang ve ark.1992; Saldamlı 1998; Shahidi ve Nacz. 2003; Bilaloğlu ve Harmandar 1999; Makris ve ark. 2006). Bulunan sekonder metabolitler meyveler, sebzeler, içkiler ve tahıllarda; antioksidan aktiviteye, duyuusal kalite özelliklerine ve beslenme kalitesine olumlu katkıda bulunurlar.

Fenolik bileşiklerin sahip oldukları antioksidan özelliklerinden dolayı pek çok dejeneratif ve yaşlanmaya bağlı hastalıkları koruyucu veya tedavi edici etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu hastalıklar içinde kanser ve kalp-damar hastalıkları başta gelmektedir (Huang ve ark.1992; Rice-Evans ve Packer 1998; Kahkonen 1999; Shahidi ve Naczki. 2003; Dell'Agli 2004; Philpott ve Lynnette 2004; Wrolstad ve ark. 2005; Pour Nikfardjam ve ark. 2006).

Gıdalardaki fenolik madde dağılımının belirlenmesi için uygulanan yöntemlerin zamanla değiştiği görülmektedir. 1978 yılından sonra ise fenollerin YBSK ile analizi yaygınlaşmaktadır. Bu yöntemlerin duyarlılığı fenolik bileşenin yapısına göre $\pm 5-10$ arasında değişmektedir (Karadeniz ve Ekşi 2002). Bulguların yorumlanmasında analiz yöntemi ile birlikte serbest veya bağlı formdaki fenolikler açısından analiz örneğine hidroliz uygulanıp uygulanmadığının da dikkate alınması gereklidir (Karadeniz ve Ekşi 2002; Gil-Munoz ve ark. 1999).

Antioksidanların serbest radikal süpürücü aktivitelerini ölçebilmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler kullanılarak antioksidanların kapasiteleri belirlenir. Yaygın olarak kullanılan serbest radikal yakalama yöntemleri DPPH, TRAP, FRAP ve süperoksit anyon süpürücüsüdür (Frankel ve Meyer 2002).

Şerbetçiotu (*Humulus Lupulus*) büyük oranda bira üretiminde kullanılır. Biranın acı tadı ve aromasını sağlamak için yalnız dişi çiçekler kullanılır (Türker ve ark 2001).

Biracılığın yanı sıra ilaç yapımında da şerbetçiotundan yararlanılmaktadır. Bitkinin diğer kısımlarından da farklı amaçlar ile faydalanmak mümkündür. Örneğin şerbetçiotu toplanırken geride kalan kısımları organik gübre olarak kullanılabilir; bazı kısımları ise baharat özelliğine sahiptir. Şerbetçiotunun kurutulmuş çiçekleri dövülüp elenirse, salgı tüylerinden oluşan ve lupulin denilen sarı renkli toz elde edilir. Lupulinin %1-3 olan reçinesinde anti bakteriyel etkili ve acı lezzetli etken maddeler olan lupulon ve humulon, ayrıca laktarik asit, serotik asit, seril alkol bulunur. Şerbetçiotu bazı diğer alkollü ve alkolsüz içeceklerde, fırın ürünleri, dondurma, şekerleme gibi ürünlerde kullanılır. Gram (+) bakteriler şerbetçi otunun uçucu yağındaki asitlere karşı gram (-) bakterilerden daha duyarlıdır. Son yıllarda ilaç ve kozmetik sanayinde de kullanılmaya başlanmıştır. (Akgül 1993; Ova. 2001; Çakıcı ve ark.2005; Coşkun 2006, Heyerick 2009, Shapouri 2011, Leiteve ark.2013).

Bu alışmada Türkiye'deki şerbetçiotu üretiminin %90'nının yapıldığı Bilecik ilinde yetiştirilen şerbetçiotunun bazı kimyasal özellikleri deneysel olarak tayin edilmiş, şerbetçiotu peletlerinde yağ ve ekstraksiyon veriminin belirlenmesi için sokshlet çözücü ekstraksiyonu farklı çözücüler kullanılarak ve farklı sürelerde uygulanmıştır. Sokshlet zc ekstraksiyonu ile elde edilen ekstratlarda toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivite belirlenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1. Şerbetçiotu (*Humulus lupulus L.*)

Ogu ve ark. (1995) Şerbetçiotunun ve tropikal tohum, *Garcinia kolanin* bazı kimyasal özelliklerini karşılaştırmıştır. Metanol ve Kloloroformla muamele edilen ekstratlar kurşun asetat testinde pozitif sonuç vermiştir. *Garcinia kola*, şerbetçiotu ince tabaka kromatografisinde benzer sonuçlar vermişler ve maksimum UV absorbansı da 325 nm göstermişlerdir.

Lie'geois ve ark. 2000'de sulu sistemlerde antioksidan etkinliğinin belirlenmesi için uygun metodu araştırırken arpa mayası, malt ve şerbetçiotu ortamlarını kullanmış ve en iyi sonucu şerbetçiotunda almışlar bira üretimi süresince kayba uğradığını belirlemişlerdir.

Canbaş ve ark. (2001), Brewers Gold, Efes Aroma, Galena, Northern Brewer ve Saaz çeşitlerinin şerbetçiotu peletlerinin yapısına saklama sıcaklığının etkileri üzerine çalışmalar yapmışlardır. Oda sıcaklığında saklanan peletlerde tüm çeşitlerde alfa- ve beta- asitlerinde reçine yumuşaklığında ve şerbetçiotu yağında önemli kayıpların olduğu kimyasal analizlerle saptanmış, 3°C'de saklanan çeşitlerde ise bu zararlı değişiklikler durmasa da yavaşlamıştır.

Lermusieau ve ark. 2001'de yaptıkları araştırmayla şerbetçiotu türlerinin arpa mayasında indirgeme gücünün iyileştirilmesinde tadın stabilizesinin sağlanmasında anahtar rol oynadığını belirlemişlerdir.

Gardea-Torresdey ve ark. (2002), şerbetçiotu bitkisi (*Humulus lupulus L.*) tarımsal atıklarının, kirli sulardan sulu kurşun (II) iyonlarının uzaklaştırılması veya geri kazanılması için alternatif bir seçenek olduğunu belirtmektedir

Şerbetçiotuna yönelik yöresel araştırmalar da yapılmıştır. Şerbetçiotu Slovenya'da 100 yılı aşkın süredir yetiştirilmekte ve ihracata yönelik önemli bir tarımsal üretim yapılmaktadır. Şerbetçiotu genetik çalışmaları, genetik değişkenliği değerlendirilmiş ve yeni geliştirilen mikrosatellit markörler ile saptanan şerbetçiotu çeşitleri ile coğrafik

olarak yabancı çoğalmaları arasındaki ilişki gösterilmiştir (Javornik ve ark. 2004; Stajner ve ark. 2005).

Biendl ve ark. (2004) izomerize şerbetçiotu peletleri için şerbetçiotu tozları bir katalist ile karıştırılmış, peletleme ve ambalaj sonrasında bu karışım inert gaz atmosferi altında 50°C'ye ısıtılıp ve 8-12 gün bekletilmiştir. Bu çalışma sonucunda beta-asitler etkilenmemiş, alfa-asitleri ise izo-alfa-asite dönüşmüştür.

Türkiye'de yoğun bir şekilde şerbetçiotu tarımı yapılan Bilecik-Pazaryeri'nde de çalışmalar yapılmıştır. Çalışma otuz bir farklı tarladan alınan toprak ve yaprak örneği ile yapılmıştır. Toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri (pH, toplam çözünebilir tuz, CaCO₃, organik madde, tekstür, N, P, K, Ca, Mg) incelenmiş ve yapraktaki makro elementlere (N, P, K, Ca, Mg) bakılmıştır. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre tarlaların %19.4'ü azot, %35.5'i fosfor, %45.2'si potasyum ve %38.7'si kalsiyum açısından yetersizdir (Çakıcı ve ark. 2005).

2005–2006 ve 2006–2007 üretim yıllarında, Bilecik ilinin Pazaryeri ilçesinde, TARBES Tarım Ürünleri ve Besicilik Sanayii ve Ticaret A.Ş. arazisinde yapraktan gübre uygulamasına yönelik çalışma yürütülmüştür. Çalışmada, farklı şerbetçiotu çeşitlerine farklı zamanlarda ve dozlarda yaprak gübresi uygulanmıştır. Araştırmada yaprak gübresi uygulama zamanı ve dozlarının şerbetçiotu çeşitlerine, bitki boyu, yaş kozalak sayısı, 20 yaş kozalak ağırlığı, kozalak eni ve boyu, bitki yaş kozalak ağırlığı, yaş kozalak verimi (kg/da) kuru kozalak nem oranı, kuru kozalak alfa asit oranı ve alfa asit verimi (kg/da) üzerine etkileri incelenmiştir. İncelenen karakterler için en iyi çeşitler tespit edilmiştir (Bağcı 2007).

Şerbetçiotundan bileşenlerinden doğal yollarla elde edilmiş yedi ekstrat, Acne vulgaris'i etkileyen biyolojik faaliyetlerin değerlendirilmesi için test edilmiştir. Şerbetçiotu ekstraktları ksanthohumol ve lupulone tüm suşlara karşı inhibitör faaliyet göstermiştir. Ayrıca antioksidan kapasiteleri, farklı reaktif oksijen türlerine bağlı olarak yedi farklı yöntemle değerlendirilmiştir. Ksanthohumol, tekli oksijen absorbans kapasitesinin yanı sıra toplam oksijen radikal absorbans kapasitesinde de en yüksek etkinliği göstermiştir (Yamaguchi Ve ark. 2009).

Jelínek L ve ve ark. 2010 yerli farklı şerbetçiotu kültürlerinde farklılıkları ortaya koymak ve karakteristik kompozisyonu belirlemek amacıyla polifenoller, esansiyel yağları, alfa ve beta bitter asitleri araştırmışlardır.

Cascade, Hallertauer, Northern Brewer, Saaz, Sterling, Vanguard ve Willamette olmak üzere şerbetçiotunun yedi farklı türünden elde edilen esansiyel yağları gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi yöntemleri ile analiz edilmiştir. Toplam bileşikte myrcene ve α -humulene profillerinin hâkim olduğu tespit edilmiştir (Nance ve Setzer 2011).

2.2. Antioksidanlar ve Polifenolik Bileşikler

Antioksidanlar ortamdaki oksijeni alıkoyarak oksidasyon reaksiyonlarının başlamasını veya ilerlemesini engelleyen bileşiklerdir. Doğal olarak biyolojik sistemlerde yani canlılarda söz konusu olan, antioksidanların biyokimyasal etkileridir. Oksidasyon reaksiyonlarının ürünleri olan serbest radikaller hücre ve dokularda hasara yol açmakta ve sonuçta kalp damar hastalıkları başta olmak üzere bir dizi kronik hastalık oluşmaktadır (Okcu ve Keleş 2009; Buřičová ve ark. 2008).

Antioksidanların insan sağlığındaki başlıca etkisi serbest radikal süpürücü ve zincir kırıcı mekanizmalarla ortaya çıkar. Serbest radikaller bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanmaktadır (Akış, 2010). En önemli serbest radikaller oksijenden türemiş olanlardır. Bunlar süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijendir. Serbest oksijen radikalleri hücre membranı proteinlerini yıkarak hücreleri öldürebilmekte, çekirdek genetik maddesi olan DNA'ya zarar vererek mutasyonlara açık hale getirmekte, bağışıklık sistemi hücrelerini etkileyerek zayıflatmaktadır. Hücre ve doku hasarı sonucu hastalıklar ortaya çıkmaktadır. Serbest radikal ve AO sistemleri arasındaki dengesizliğin sonucu olarak damar sertliği (ateroskleroz), Parkinson ve Alzheimer gibi sinir hastalıkları, şeker hastalığı, astım, romatoid artrit, kanser, akciğer ve cilt hastalıkları meydana gelmektedir. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda serbest radikallerin kalp ve damar hastalıklarına zemin hazırladığı kaydedilmektedir (Dell'Agli ve ark. 2004; Okçu ve Keleş 2009). Vücutta çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan ve bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olması sebebiyle oldukça reaktif olan serbest radikallerin aşırı miktarları birçok doku, organ ve sistemlerde hasarlara neden olmaktadır. Bu hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir ve genellikle besinlerle alınan C ve E vitaminleri, selenyum, b-karoten, likopen, lutein ve diğer karotenoidler de bu savunmaya yardımcı antioksidanlar olarak rol almaktadır. Bunlara

ilave olarak flavonoidler gibi ikincil bitki metabolitleri ve terpenoidler de sayılabilir. Bu da antioksidan bileşikler içeren meyve ve sebzelerin yanı sıra geleneksel olarak tıbbi amaçla kullanılan ve antioksidan bileşikler bakımından zengin olan şifalı bitkilerin insan sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır (Yıldız 2007).

Antioksidanlar hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterirler ve zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türlere döndürürler. Bu şekilde oluşan antioksidan radikali, oksijen atomu ile aromatik halka üzerindeki çiftleşmemiş elektronun yer değiştirmesiyle stabilize olur. Bu nedenle antioksidan moleküller yapılarında genellikle fenolik fonksiyon taşırlar. Aromatik bir halka ve buna bağlı olarak fonksiyonel türevleri de dahil bir ya da birden fazla hidroksil gruplarını içeren maddeler, fenolik bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Akış 2010).

Antioksidanlar yapılarına göre fenolik antioksidanlar, aromatik antioksidanlar ve organik sülfür bileşikleri olarak; etki mekanizmalarına göre primer ve sekonder antioksidanlar olarak sınıflandırılırlar. Bunun dışında temel olarak antioksidanlar doğal antioksidanlar ve yapay antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. C vitamini, E vitaminleri (tokoferoller), polifenolik bileşikler, flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) ve karotenoidler doğal antioksidanlardır (Akış 2010).

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri, kullanılan kimyasal reaksiyon açısından hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayananlar (HAT) ve tek elektron transferi reaksiyonuna dayananlar (ET) olmak üzere temel olarak iki sınıfta toplanırlar (Ardağ, 2008). HAT temelli yöntemlerin birçoğu azobileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır. Bu yöntemler oksijen radikal absorban kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP), toplam oksiradikal söndürme kapasite (TOSC) yöntemi ve krosin beyazlatma yöntemlerini içermektedir. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile alakalıdır. ET temelli yöntemler toplam Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam fenolik yöntemi (FCR), Trolox eşiti antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidant olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemini içermektedir (Albayrak ve ark., 2010).

Demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemi, plazmanın demir (III)'ü indirgeme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan gücünü ölçmek için geliştirilen bir metottur. Bu metotta, demir(III)tripridiltriazin (Fe(III)-TPTZ) kompleksi antioksidan (indirgen) vasıtasıyla düşük pH ortamında demir(II) tripridiltriazin (Fe(II)-TPTZ) kompleksine indirgenir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi şiddetli mavidir ve 593 nm'de maksimum absorbans vermektedir (Akış 2010). Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam fenolik yöntemi (FCR)'nde, Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin-Fenol reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır. Yöntem test edilen materyalin reaktif oksidasyonunu inhibe etmesi için gerekli miktarını ölçer (Ardağ 2008). 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal söndürücü kapasite yöntemi bitkiler ve gıdalardan elde edilen ekstraktlar ya da bileşiklerdeki serbest radikal söndürücü aktiviteyi belirlemek için araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. 515 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Antioksidan (A-H) tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbansın azalmasına neden olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorbans sabitlenene kadar takip edilir (Albayrak ve ark. 2010). Troloks [(±)-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit], E vitamininin suda çözünür eşdeğeridir. Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan aktivite tayin yönteminde standart olarak kullanılır. Genellikle belli bir derişim aralığında Troloks antioksidan olarak kullanılarak bir çalışma grafiğı hazırlanır ve bilinmeyen antioksidanın aktivitesi bu grafikten Troloks eşdeğeri olarak okunur (Ardağ 2008). Oksidan olarak Cu (II) kullanılan toplam antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC), örnekte bulunan antioksidanlar (redüktan) tarafından Cu(II)'nin Cu (I)'e indirgenmesini temel almaktadır. Kromojenik ayıraç olan bathocuproin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-phenanthrolin), Cu (I) ile 2:1 oranında bir kompleks oluşturur. Bu kompleks 490 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Standart olarak Kersetin kullanılır (Albayrak ve ark. 2010).

Son yıllarda, şifalı bitkiler ve bunlardan elde edilen aktif maddeler üzerindeki çalışmalar yoğunlaşmıştır. Bu konuda Yıldız ve ark tarafından yapılan çalışmada spektrofotometrik olarak toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesinde CUPRAC

yöntemi, karşılaştırma yöntemi olarak ise ABTS/persülfat yöntemi kullanılmıştır. Yapılan bir başka çalışmada bir bitki ekstraktının mevcut antioksidanları belirlenip, bunların derişimleri deneysel olarak saptanmış TEAC katsayıları ile çarpılarak ve bu çarpımlar toplanarak ekstraktın kuramsal olarak beklenen toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmıştır. Eğer HPLC kromatogramından tüm antioksidanlar saptanmış ise bu yolla bulunan kapasite, deneysel olarak ölçülen antioksidan kapasite ile bağdaşmalıdır. Çalışılan bitki örneklerinin ekstraktlarında CUPRAC yöntemi ile belirlenmiş olan toplam antioksidan kapasitesi sıralaması; arslanpençesi > kekik > ıhlamur > mercanköşk > adaçayı > nane > civanperçemi > kereviz yaprağı > dereotu > ısırgan > maydanoz şeklindedir (Yıldız 2007).

Gıda kaynaklı antioksidanların büyük bir kısmını protein ve fenolik yapıdaki antioksidanlar oluşturmaktadır. Fakat bu maddeler birbirleriyle veya insan vücudundaki bir takım yapılarla (enzim, membran vs.) etkileşimde bulunabilmekte, dolayısıyla antioksidan aktivitelerinde ve etkileştikleri maddelerin biyolojik rollerinde önemli değişimlere yol açabilmektedirler. Sonuç olarak etkileşimler, mekanizmaları ve olası sonuçlarının antioksidanlar bazında irdelenmesi insan sağlığı açısından da büyük önem arz ettiği belirtilmiştir (Demirbüker Kavak 2010).

Akış (2010), Türkiye’de tıbbi amaçlı kullanımları olan ve çay olarak tüketilen çeşitli bitkilerin antioksidan aktiviteleri ile toplam fenol içerikleri ve fenolik yapılarını incelemiştir. Bitkilerin çeşitli kısımlarından hazırlanmış olan metanol ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri DPPH yöntemi ile belirlenirken, toplam fenolik madde içerikleri Folin-Ciocalteu yöntemiyle saptanmıştır. Genel olarak antioksidan tayininde çok kullanılan DPPH, FRAP, ABTS antioksidan, β -karoten beyazlatma ve Folin-Ciocalteu fenolik madde tayin metotlarının farklı bitki örnekleri için verdikleri sonuçların karşılaştırılması yapılmıştır.

2.3. Şerbetçiotunun Antioksidan ve Polifenolik Karakterizasyonu

Dokuz farklı Şerbetçiotu çeşidinde HPLC-APCI-MS/MS ile yapılan analizlerde trans-resveratrol ve piceid izomerleri belirlenmiştir (Jerkovic ve ark. 2005).

Şerbetçiotundan kaynaklanan ve bira içeriğinde bulunan ksanthohumol; başlıca prenylated flavonoiddir. Bu bileşiklerin insan sağlığına etkileri bira tüketimiyle karşılaştırılmıştır (Stevens ve ark. 2004).

Şerbetçiotu çeşitli antioksidan özelliklere sahip polifenolik bileşikler içerir. Bu bileşikler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (HPLC / MS) yöntemleri kullanılarak şerbetçiotu özlerinde ve aynı zamanda birada tespit edilmiştir (Ceslova ve ark. 2009).

Bira mayası üretimi boyunca farklı aşamalarda mayaların oksidatif stabilizasyonu ve şerbetçiotu polifenol ekstraktı ile α -, β -iso- α -asitlerinin radikal süpürücü özellikleri ESR spektroskopisi ve DPPH radikal su verme ölçümleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Wietstock ve ark. 2010).

DPPH yöntemiyle şerbetçiotu ve şerbetçiotu ürünlerinin antioksidan aktiviteleri belirlenmiştir. En yüksek antioksidan kapasitesi olan %70-%80 aralığında Saaz ve Spalter ölçülmüştür. Çeşitlerin çoğunda antioksidan kapasitesi %40-%60 aralığında ölçülmüştür. Şerbetçiotu antioksidan aktivitesinin bir kısmı kurutma sırasında geri dönüşü olmayacak şekilde kaybolur. Kayıp genellikle orijinal RA_{DPPH} değerinin %5'ini aşmaz. Kurutma ayrıca polifenol bileşikleri içeriğinde bir azalma yaratır (Krofta ve ark. 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada kullanılan materyal, iki farklı çeşit şerbetçiotu (*Humulus lupulus L.*) 2010 yılı hasadından temin edilmiştir. Daha sonraki aşamada şerbetçiotundaki acı reçinelerin ve eteri yağların okside veya polimerize olarak şerbetçiotunun değerini düşürmemesi; kalite kaybına neden olmaması ve bozulmaması için uygun yöntemle (65°C’de 10sa) kurutulup, nem içeriğinin %8-12 düşürülmesi sağlanmıştır. Şerbetçiotu kozalakları karanlık ve serin ortamda 3-3,5 saat dinlendirilerek soğutulmuşlar ve sonra sıkıştırılarak balyalar haline getirilmiştir. Depoda 20-25 gün bekletilen balyalar değirmenden geçirilerek un haline ve sonrada pelet biçimine getirilmiştir (şekil 3.1). Özel torbalara konulmuş vakumlanıp ve bozulmanın önlenmesi için karbondioksit ve azot gazı verilerek paketlenmiştir. Ambalajlanan şerbetçiotu peletleri 4-5°C’de soğuk muhafaza edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan iki farklı çeşit şerbetçiotu peletlerine E ve G kodları verilmiştir.



Şekil 3.1. Şerbetçiotu kozalaklarının, pelete işleme aşamaları

3.2. Yöntem

3.2.1. Nem miktarı tayini

Önceden sabit tartıma getirilerek darası alınan saat camına 3 g öğütülmüş örnek hassas olarak tartılmıştır. 103-105°C sıcaklıkta etüvde (FN 400, Nüve) kurutulduktan sonra desikatöre alınmıştır. Oda sıcaklığına gelen numuneler tartılmış ve nem miktarı ağırlık kaybından % olarak hesaplanmıştır (AOAC 2002). Bu analiz her iki şerbetçiotu çeşidi (E ve G) için üç paralel olarak yapılmıştır. Nem miktarları her bir çeşit için üç paralelin ortalaması alınarak elde edilmiştir.

$$\% \text{ Nem} = \frac{\text{Nem miktarı (g)}}{\text{Başlangıçta alınan numune miktarı (g)}} \times 100 \quad (\text{E.3.1})$$

3.2.2. Kül miktarı tayini

Mermer havanda öğütülmüş numune önceden sabit ağırlığa getirilmiş ve darası alınmış krozelere hassas olarak 3 g tartılmıştır. 550°C sıcaklıkta kül fırınında (MF 120, Nüve) kademeli olarak yakılmıştır. Fırından alınan numune desikatörde oda sıcaklığına getirildikten sonra tartılmıştır. Ağırlık kaybından kül miktarı % olarak hesaplanmıştır (AOAC 2002). Bu analiz her iki şerbetçiotu çeşidi (E ve G) için üç paralel olarak yapılmıştır. Kül miktarları her bir çeşit için üç paralelin ortalaması alınarak elde edilmiştir.

$$\% \text{ Kül} = \frac{\text{Kül miktarı (g)}}{\text{Başlangıçta alınan numune miktarı (g)}} \times 100 \quad (\text{E.3.2})$$

3.2.3. Protein analizi

Protein analizi her iki şerbetçiotu çeşidi (E ve G) için iki paralel olmak üzere Kjeldahl metodu ile yapılmıştır. Öğütülmüş şerbetçiotu numunelerinden 2,2gr tartılmıştır. Yakma işlemi için 7049-05 Model, Lole-Parmer Instrument Company

yakma cihazı ve distilasyon içinde Rapidstill II, Labconco kullanılmıştır. Distilasyon sonunda kalan ürün 0,1 N HCl ile titre edilmiştir.

Numunedeki protein miktarı, kullanılan HCl miktarına paralel azot miktarından yola çıkılarak aşağıdaki formüllere göre bulunmuştur. Şerbetçiotu için protein hesabında kullanılan faktör 6,25 olarak belirlenmiştir (AOAC 2002).

$$\%N = N_{HCl} \times \frac{\text{Düzeltilmiş asit hacmi}}{\text{örnek kütlesi}} \times \frac{14 \text{ g N}}{\text{mol}} \times 100 \quad (\text{E.3.3})$$

$$\%protein = \%N \times 6,25 \quad (\text{E.3.4})$$

3.2.4. Çözücü ekstraksiyonu ile yağ miktarı ve verim tayini

E ve G kodlu şerbetçiotu çeşitlerine, hekzan (%95 PRS, Panreac) ve dietil eter (GC>%99,5, Merck) çözücüleri ile 4 ve 6 saat sokshlet ekstraksiyonu yapılmıştır. Numuneler mermer havanda öğütülmüş şerbetçiotu pelletlerinden 5'er gram olarak alınmıştır. Deneyler üç paralel olarak yapılmış ve üç paralel için hesaplanan yağ ve ekstraksiyon verimi sonuçlarının ortalaması alınarak elde edilmiştir.

Ekstraksiyon süresi sonunda kalan çözücü Rotary evaporatörde (Heidolph, Laborata 4003 Control) ayrılmıştır.

Numune içindeki % yağ ve % ekstraksiyon verimi aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\%yağ = \frac{\text{Ekstraksiyon sonunda bulunan yağ miktarı}}{\text{Ekstraksiyona giren numune miktarı}} \times 100 \quad (\text{E.3.5})$$

$$\%verim = \frac{\text{Ekstraksiyon sonunda elde edilen katı madde miktarı}}{\text{Ekstraksiyona giren numune miktarı}} \times 100 \quad (\text{E.3.6})$$

3.2.5. Kırılma indisi ve briks derecesi tayini

Numunelerin kırılma indisleri ve briks derecesi değerleri 20°C de Abbe refraktometresi (ATAGO IT) ile belirlenmiştir.

3.2.6. Antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde tayini için ekstraksiyon yöntemi

3.2.6.1.Ham fenolik ekstresinin hazırlanması

Antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde tayini için droglar Sokshlet apareyinde önce yağlarından kurtarılmak üzere petrol eteri ile 6 saat ekstre edilmiştir. Geride kalan drog, petrol eteri uzaklaştırıldıktan sonra (3 g) 40 ml %70'lik(h/h) sulu metanol ile 40°C de çalkalamalı su banyosunda 30 dakika süre ile ekstre edilmiş ve süzülmüştür. Bu işlem üç kez tekrarlanmış, süzüntüler birleştirilmiştir. Metanollü kısımlar döner buharlaştırıcıda yoğunlaştırıldıktan sonra geride kalan sulu ekstraleler liyofilizatörde kurutulmuştur. Ekstre verimleri kuru drog üzerinden hesaplanmıştır.

Aktivite tayinleri ve diğer deneylerde bu ekstraleler kullanılmıştır.

3.2.6.2. Fenolik maddelerin hidrolizi

Yağı uzaklaştırılmış 5 gram numuneye 150 ml 1,2M (%50 MeOH içinde) HCl çözeltisi eklenmiştir. Çalkalamalı su banyosunda 80°C'de 1 saat çalkalanarak masere edilmiştir. Ekstre soğutulduktan sonra filtre edilir, bu işlem üç kez tekrarlanılarak süzüntüler toplanmıştır. Metanol rotary evaporatörde ayrılmıştır. Kalan sulu faz 75ml etilasetat ile ayırma hunisi yardımıyla 3 kez ekstre edilmiştir. İşlem sonunda etil asetat çekildikten sonra balonda kalan liyofilizatörde kurutulmuş ve -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.7. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması

Kurutulmuş ekstraktların verimi (kuru ağırlık bazında) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

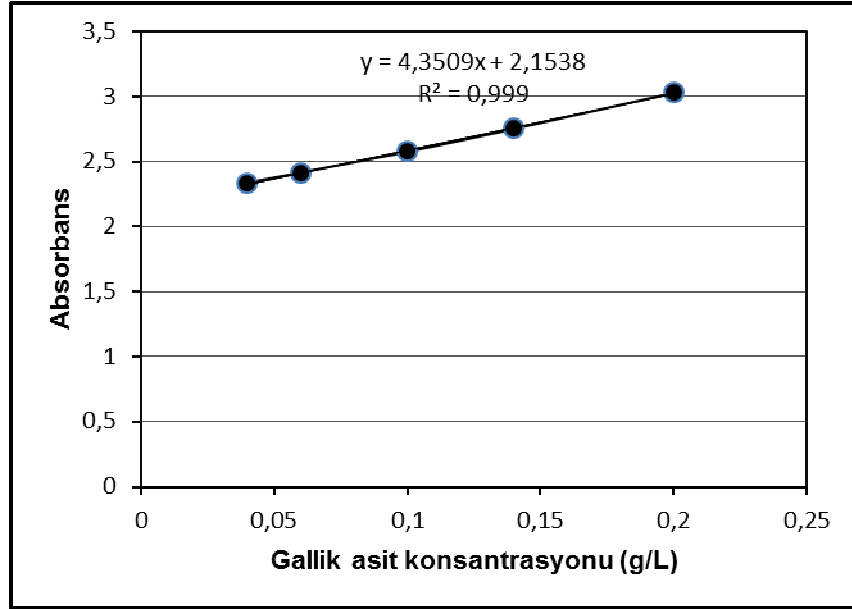
$$\% \text{ verim} = (W1 * 100) / W2$$

Formülde W1 çözücü uzaklaştırılarak kurutulmuş ekstraktın ağırlığını, W2 ise numunenin kuru ağırlığını göstermektedir.

3.2.8. Toplam fenol miktar tayini

Ekstreler içerisindeki toplam fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine (Gamez-Meza ve ark.1999) göre yapılmıştır. Standart olarak kullanılan gallik asit ve çalışılan bütün örnekler, %70'lik sulu metanol içinde hazırlanmıştır. 0,5 mg örneğe, 2,5 ml Folin Ciocaltaeu reaktifi (%10'luk, h/h, suda) ve 7,5 ml sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik,

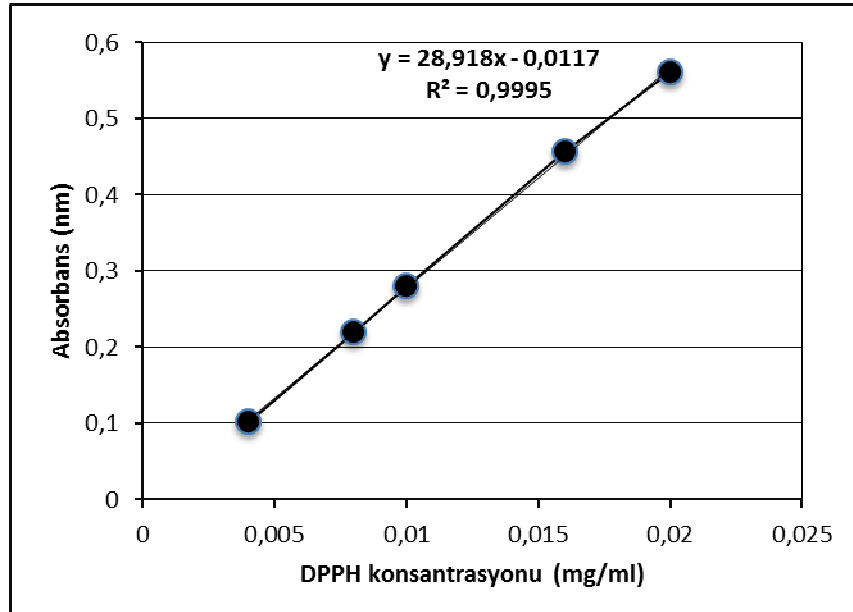
a/h, suda) ilave edilmiş, oda sıcaklığında 2 saat bekletildi. UVvis Spektrofotometre de (Jenway Marka 7315 Model) 750 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Gallik asit kalibrasyon eğrisi üzerinden (Şekil 3.2.) toplam fenol (mgGAE / gKM) miktarları hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. Gallik asit konsantrasyon-absorbans kalibrasyon eğrisi

3.2.9. DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etki tayini

Ekstrelerin serbest radikal süpürücü etkileri 30 dakika içerisinde DPPH’ın(1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) %50 sini süpürdüğü konsantrasyon olarak (EC_{50}) hesaplanmıştır (Sanchez-Moreno ve ark. 1998). % 70 metanol içerisinde hazırlanmış örnek çözeltisi (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonu 4×10^{-3} mg/ml) üzerine DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek vorteks de karıştırılmış ve oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517nm de absorbans değerleri okunmuştur. $4,0 \times 10^{-3}$ ve $2,0 \times 10^{-2}$ g/L konsantrasyon aralığında DPPH standardı kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisinden (Şekil 3.3) elde edilen aşağıdaki kalibrasyon denklemleri ile reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu (mg/ml) hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. DPPH konsantrasyon-absorbans kalibrasyon eğrisi

$$A_{517\text{nm}} = 28,91(\text{DPPH})_t - 0,011 \quad (R^2 = 0,9995)$$

30 dakika sonucunda reaksiyon ortamında kalan DPPH miktarı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{DPPH}_{\text{kalan}} = (\text{DPPH})_{t=30} / (\text{DPPH})_{t=0} \times 100$$

Sonuçlar DPPH'ın %50'sinin süpürüldüğü (inhibe edildiği) konsantrasyon (EC_{50} $\mu\text{g/ml}$) cinsinden verilmiştir.

4. ANALİZ VE BULGULAR

Her iki şerbetçiotu çeşidine ait bileşim kompozisyonu analiz sonuçları ve ayrıca Abbe refraktometresi ile 20°C’de okunmuş olan iki çeşit şerbetçiotu bitkisinden ekstre edilen yağın refraktif indeksi, °Briks değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. E ve G kodlu şerbetçiotu çeşitleri analiz sonuçları

Analizler	E kodlu Ş.otu Peleti	G kodlu Ş.otu Peleti
Ham Yağ(%)	31.06±0.31	23.47±0.44
Ham Protein(%)	15.13±0.15	17.06±0.03
Nem (%)	11.58±0.02	10.72±0.25
Kül (%)	7.49±0.04	9.79±0.03
Karbonhidrat + lif(%)	34.74	38.96
Refraktif indeks	1.381±0.001	1.365±0.002
Briks°	30±0.71	21±1.06

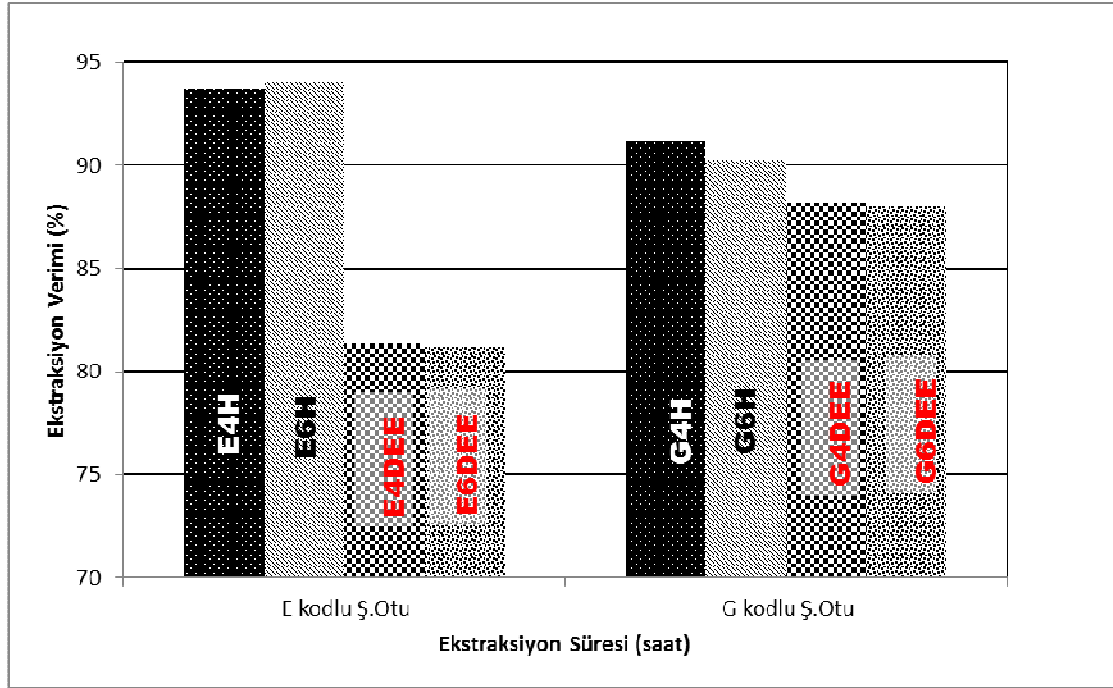
İki şerbetçiotu çeşidine ayrı ayrı n-hekzan ve dietileter çözücüsü ile 4 ve 6 saat olarak farklı sürelerde sokshlet ekstraksiyonu uygulanmıştır. Deney sonunda elde edilen ekstraksiyon verimleri Tablo 4. 2 a ve b’de görülmektedir.

Tablo 4.2.Farklı ekstraksiyon süresine göre Şerbetçiotu çeşitlerinin % ekstraksiyon verimleri

(a) Çözücü; n-hekzan	% Ekstraksiyon verimi	(b) Çözücü; dietileter	% Ekstraksiyon verimi
E4H	93,71±0,21	E4DEE	81,32±0,15
E6H	93,99±0,29	E6DEE	81,15±0,35
G4H	91,15±0,06	G4DEE	88,18±0,15
G6H	90,26±0,32	G6DEE	88,04±0,08

Tablo 4. 2’den görüldüğü gibi ekstraksiyon zamanı olarak belirlenen 4 ve 6 saatlik uygulamaların her iki şerbetçiotu çeşidinde de önemli bir fark oluşturmazken seçilen

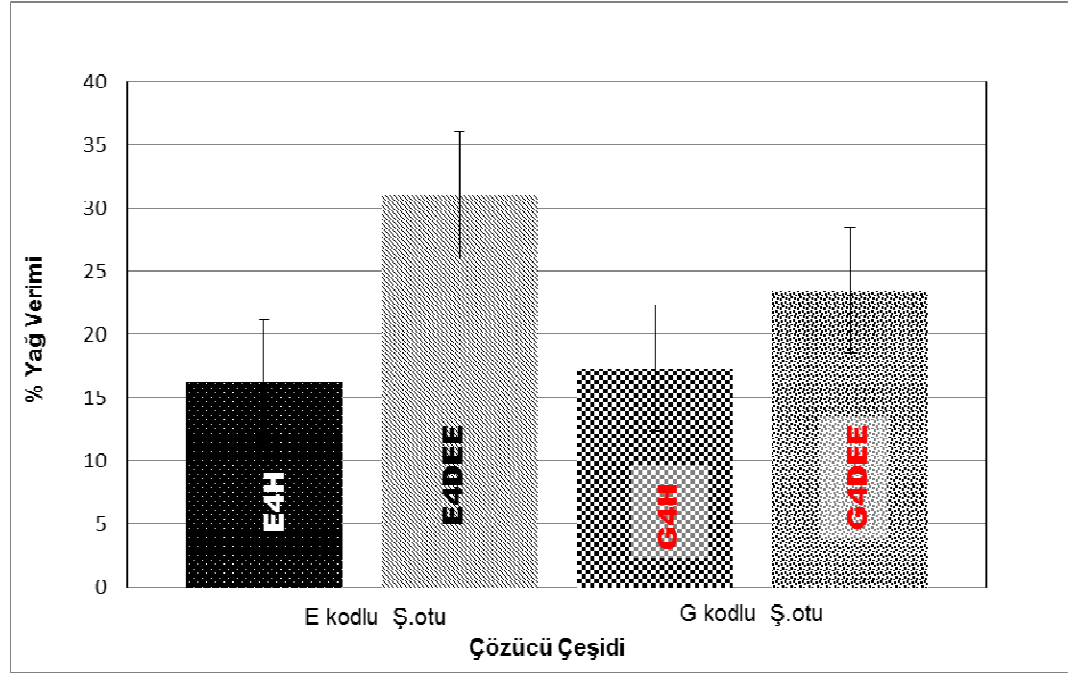
çözücülere bağlı ekstraksiyon verimlerinde önemli fark oluştuğu belirlenmiştir (şekil 4.1).



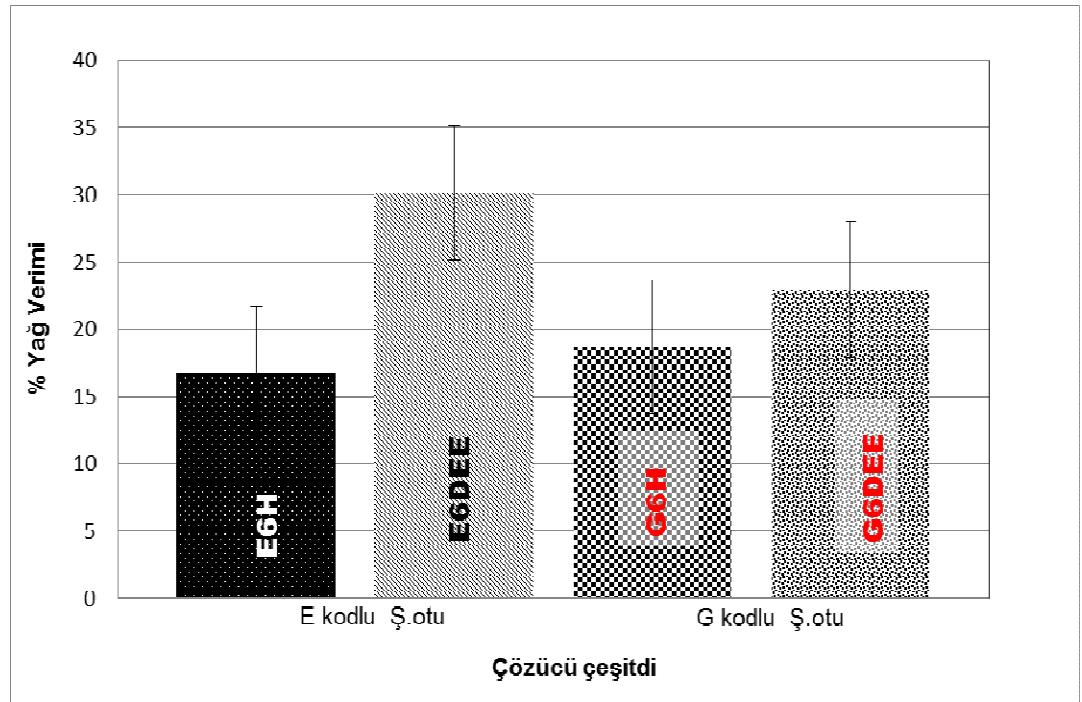
Şekil 4.1. Farklı çözücülerin farklı ekstraksiyon sürelerinde Şerbetçiotu ekstraksiyon verimine etkisi

Şerbetçiotu çeşitlerine uygulanan sokshlet ekstraksiyonunda en yüksek ortalama ekstraksiyon verimi $93,99 \pm 0,29$ olarak 6 saatte hekzanla yapılan çalışmada bulundu.

Şerbetçiotu çeşitlerinde 4 ve 6 saat yapılan ekstraksiyonlarda, çözücüler n-hekzan ve dietil eter olarak ayrı ayrı uygulandığında, % yağ verim değerleri Şekil 4.2 ve 4.3'deki gibi elde edilmiştir. Buna göre şerbetçiotu çeşidi ve çözücünün, yağ verimi üzerinde önemli ölçüde etkisi olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı çözücülerle 4saat ekstre edilen şerbetçiotu % yağ verimleri



Şekil 4.3 Farklı çözücülerle 6saat ekstre edilen şerbetçiotu % yağ verimleri

Şerbetçiotu çeşitlerine uygulanan ekstraksiyonda en yüksek yağ verimi E kodlu şerbetçiotu peletlerinde 6 saatte dietil eterle yapılan çalışmalarda $31,06 \pm 0,31$ olarak bulunmuştur.

Şerbetçiotu peletleri, serbest ve bağlı fenoliklerin alınması amacıyla, %70'lik metanol ve 1.2M HCl içeren %50'lik metanol ve etil asetat ile ekstre edilmiştir.

Elde edilen Şerbetçiotu çeşitlerine ait ekstrelerin Folin-Ciocalteu metodu ile tayin edilmiş toplam fenolik madde miktarları Tablo 4.3' de verilmiştir.

Tablo 4.3.Şerbetçiotu çeşitlerine ait toplam fenol miktarları (mg GAE/g ekstre)

	Serbest fenolik içerik	Esterleşmiş fenolik içerik	Toplam Fenol içeriği
E kodlu Ş.otu Peleti	112,76 ± 6,02	75,85 ± 1,45	188,61
G kodlu Ş.otu Peleti	134,01 ± 5,59	101,01 ± 3,96	235,03

Ekstraksiyon işlemleri sonucunda kuru drog üzerinden hesaplanan ekstraksiyon verimi ve toplam fenol miktarları açısından G kodlu şerbetçiotu ekstresinin diğerine göre daha yüksek miktarda fenolik bileşiğe sahip olduğu belirlenmiştir. Her iki çeşitte de serbest fenoliklerin baskın olduğu görülmektedir.

Ekstrelerin serbest radikal süpürücü etkileri stabil bir serbest radikal olan DPPH üzerinde test edildi. Serbest radikal süpürücü etki sonuçları 30 dakika içerisinde DPPH'nin %50 sini süpürdüğü konsantrasyon olarak (EC₅₀) hesaplandı.

Düşük EC₅₀ değeri yüksek antioksidan etkiyi göstermektedir. Bu çalışmada test edilen şerbetçiotu ekstralarının DPPH (µg/ml) üzerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri Tablo 4.4'de görülmektedir.

Buna göre EC₅₀ değeri daha düşük olan G kodlu şerbetçiotun inhibisyon direncinin ve antioksidan kapasitesinin daha fazla olduğu belirlendi.

Tablo 4.4. Şerbetçiotu metanolik ekstralarının DPPH üzerinden hesaplanan EC₅₀ değerleri

	EC50 (µg/ml)	İnhibisyon (%)
E kodlu Ş.otu Peleti	39,93± 0,9	56,37± 0,9
G kodlu Ş.otu Peleti	33,07± 4,57	70.23± 4,45

Toplam fenol miktarı yüksek olan ekstralarda antioksidan aktivite de yüksek olarak bulunmuştur.

Literatürde yer alan çalışmalar şerbetçiotunun öğütülmesi ve peletize edilmesinin onun polifenolik madde içeriğini önemli düzeyde etkilemediği ancak çeşide bağlı önemli farklar yarattığını ifade etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

2010 yılında harmanlanmış şerbetçiotundan elde edilen ekstrelerde antioksidan aktiviteye, farklı miktarlarda fenolik bileşen bulunması ve bu bileşenlerin kimyasal yapısı ve şerbetçiotunda bulunma oranlarının etkisi olduğu düşünülmektedir.(Silva ve ark., 2000; Shahidi ve ark., 2003; Jelínek ve ark., 2010).

Yapmış olduğumuz çalışma da en yüksek antioksidan aktivite değeri ve toplam fenolik bileşen miktarı G kodlu şerbetçiotunda elde edilmiştir. Bitkilerin antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde üzerine yapılmış olan birçok literatür çalışmasında da belirtildiği gibi araştırma sonucunda da antioksidan aktivite doğal olarak bulunan fenolik içerikle paralellik göstermiştir (Shahidi ve ark., 1995; Silva ve ark.,2000; Yıldız, 2007; Ceslov ve ark. , 2009; Akış, 2010).

Şerbetçiotu numunelerinin iki çeşidinde de elde edilen nem, kül ve protein değerleri literatüre uygun bulunmuştur (Pomeranz 1987; Ogu ve ark. 1995, Canbaş ve ark. 2001, Heyerick 2009). Yapılan ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen yağ miktarları literatürde şerbetçiotu benzeri bitkilerin içeriğindeki yağ miktarlarına paralellik göstermiştir (Demirci ve ark. 1993, Türker ve ark. 2001).

Analizi yapılan şerbetçiotu çeşitlerinden E kodlu numunenin, G kodlu numuneye göre daha fazla nem içerdiği saptanmıştır. Nem miktarının az olması; verim, kalite ve dayanıklılık açısından avantaj sağlamaktadır. Yüksek nem içeriği oksidatif zarar riskini artıracığından daha fazla antioksidan içeriğine sahip G kodu verilen şerbetçiotu, E kodlu numuneye göre nem içeriği açısından tercih edilebilir özellik taşımaktadır.

Dietil eter çözücüsü farklı ekstraksiyon sürelerinde dahi her iki şerbetçiotu çeşidi için daha fazla %yağ verimini arttırmıştır. Ekstraksiyon verimini arttırmak için çözücü olarak hekzan seçilmesi gerektiği anlaşılmıştır. Nem miktarı az olan şerbetçiotu çeşidinin (G kodlu) aynı koşullarda ekstrasyon veriminin fazla olduğu bulunmuştur. Nem miktarı nispeten fazla olan şerbetçiotu çeşidinin (E kodlu) aynı koşullarda yağ veriminin fazla olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Akgül A., (1993), “Baharat bilimi ve teknolojisi”, Gıda teknolojisi Derneği Yayınları No:15 Ankara, 451
2. Akış, T., (2010), “Piyasada Çay Olarak Tüketilen Bazı Bitkilerin Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi ve Fenolik Yapılarının İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir
3. Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., (2010), “Bitkisel Ürünlerin ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler”, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(4):401-409
4. Anonim (2008) Food And Agriculture Organization Of The United Nations, 2008 Data For Selected Countries And Products, “<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>”
5. AOAC, (2002), Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists, 17th Ed., Editor;William Horwitz
6. Ardağ, A. (2008), “Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan İncelenmesi”, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Aydın
7. Bağcı, İ., (2007), “Şerbetçiotunda (*Humulus lupulus L.*) Yapraktan Uygulanan Gübrenin Verim Ve Kaliteye Etkileri”, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,
8. Biendl, M., Virant, M., Varjú, P., (2004), “Determination of iso-alpha-acids, alpha- and beta-acids in Isomerised Hop Pellets by HPLC”, Journal of the Institute of Brewing, Vol. 110 (No. 3): 242-243
9. Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar M. (1999), Flavonoidler, Aktif Yayınevi, 382.
10. Buřičová L., Réblová Z., (2008), “Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants”. Czech J. Food Sci., 26: 132–138.
11. Canbaş, A., Erten, H., Özşahin, F., (2001), “The Effects Of Storage Temperature On The Chemical Composition Of Hop Pellets”, Process Biochemistry, 36: 1053–1058

12. Ceslova, L., Holcapek, M., Fidler, M., Drstickova, J., Lısa, M., (2009), “Characterization of Prenylflavonoids and Hop Bitter Acids in Various Classes of Czech Beers and Hop Extracts Using High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry”, *Journal of Chromatography A*, 1216: 7249–7257
13. Coşkun, F., (2006), “Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular”, *Teknolojik Araştırmalar*, T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü www.teknolojikarastirmalar.org, ISSN: 1306-7648, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, Cilt 2, 27-33, Tekirdağ
14. Cowan, M. M., (1999), “Plant Products as Antimicrobial Agents”, *Antimicrobial Plant Chemicals*, 12(4):564-567
15. Çakıcı, H., Yener, H. , Aydın, Ş., (2005), “Bilecik-Pazaryeri Yöresi Şerbetçiotu Plantasyonlarının Beslenme Durumu” , *Ege Üniv. Ziraat. Fak. Derg.*, 42(3):123-134 , ISSN 1018-88,
16. Dell'Agli, M., Busciala, A. ve Bosisio, E. (2004), “Vascular effects of wine polyphenols”, *Cardiovascular Research*, 63(4), 593-602.
17. Demirbüker Kavak, D., (2010), “Antioksidan Etkileşimleri: Polifenol-Protein Etkileşimleri”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(3): 9-16
18. Ekmen, M.E., (2006),“Avrupa Birliği Ortak Piyasa Mekanizmasının Uygulanmasında Çiftçi Örgütlerinin Rolü Ve Türkiye İçin Öneriler”, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara
19. Frankel, E.N., Meyer, A.S. (2002), “The problems of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants”, *J.Sci.Food Agric.*, 80, 1925-1941
20. Gamez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J.A., Medina-Juarez, L.A., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., Angulo-Guerrero, (1999), “Antioxidant Activity in Soybean Oil of Extracts from Thompson Grape Bagasse”,*O.: J.A.O.C.S.*, 76, 1445
21. Gardea-Torresdey, J., Hejazı, M., Tiemann, K., Parsons, J. G., Duarte-Gardea, M., Henning, J., (2002), “Use of Hop (*Humulus Lupulus*) Agricultural By-Products For The Reduction of Aqueous Lead (II) Environmental Health Hazards”, *Journal of Hazardous Materials* , B91: 95–112

22. Gil-Munoz, R., Gomez-Plaza, E., Martinez, A. ve Lopez-Roca, M. (1999), "Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature", *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 259-272.
23. Guendez, R., Kallithraka, S., Makris, D.P. ve Kefalas, P. (2005), "Determination of low molecular weight polyphenolic constituents in grape (*Vitis vinifera* sp.) seed extracts: correlation with antiradical activity", *Food Chem.*, 89(1), 1-9.
24. Gümrukçüoğlu, A., Onur, M. A. (2006), Serbest radikaller, <http://www.bioclub.hacettepe.edu.tr/makales/fizyo/05.htm>
25. Heyerick, A., (2009) "Emerging Medicinal Uses of Hops", American Hop Convention, and Hop Research Council Winter Meeting, 29 January.
26. Huang, M., Ho, C. ve Lee, C (1992), "Phenolic compounds in food: an overview", *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I*, American Chemical Society, 2-8.
27. Javornik, B., Jakše, J., Štajner, N., Kozjak, P., Čerenak, A., (2004), "Molecular Genetic Hop (*Humulus lupulus* L.) Research in Slovenia", *ISHS Acta Horticulturae* 668: I International Humulus Symposium.
28. Jelínek L., Šneberger, M., Karabín, M. and Dostálek, P., (2010), "Comparison of Czech Hop Cultivars Based on their Contents of Secondary Metabolites", *Czech J. Food Sci.* Vol. 28, No. 4: 309–316
29. Jerkovic, V., Callemien, D., Collin, S., (2005), "Determination of Stilbenes in Hop Pellets from Different Cultivars", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4202-4206
30. Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. and Heinonen, M., (1999), "Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds", *J. Agric. Food Chem.* , 47, 3954-3962
31. Karadeniz, F. ve Ekşi, A. (2002), "Gıdalardaki başlıca fenolik bileşikler", *Gıda Dergisi*, 80–85.
32. Krofta, K., Mikyška, A., Hašková, D., (2008), "Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products", *Journal of the Institute of Brewing*, 114(2): 160–166

33. Leite, I.R.; Faria, J.R.; Marquez, L.D.S.; Reis, M.H.M.; de Resende, M.M.; Ribeiro, E.J.; Cardoso, V.L.,(2013),” Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations”, *Fuel Processing Technology*, Volume 106, issue (February, 2013), p. 611-
34. Lermusieau,G., LieÂgeois,C., LieÂgeois,C., (2001), “Reducing power of hop cultivars and beer ageing”, *Food Chemistry*, 72, 413-418
35. LieÂgeois,C., Lermusieau,G. LieÂgeois,C.,(2000), “Measuring Antioxidant Efficiency of Wort, Malt, and Hops against the 2,2 ϕ -Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride-Induced Oxidation of an Aqueous Dispersion of Linoleic Acid”, *J.Agric. Food Chem.*, 48, 1129-1134
36. Makris, D.P., Kallthra, S. ve Kefalas, P (2006), “Flavonols in grapes, grape products and wines:Burden, profile and influential parameters”, *J. Food Comp.and Analysis*, 19, 396-404.
37. Nance, M. R., Setzer, W. N., (2011), “Volatile Components of Aroma Hops (*Humulus lupulus* L.) Commonly Used in Beer Brewing”, *Journal of Brewing and Distilling*, 2(2): 16-22
38. Ogu, E. O., Agu. R.C.,(1995). “ A Comparison of Some Chemical Properties of *Garcinia Kola* and Hops for Assessment of *Garcinia* Brewing Value”, *Bioresource Technology*, 54, 1-4,0960-8524(95)00081
39. Okcu Z., Keleş, F., (2009), “Kalp-Damar Hastalıkları ve Antioksidanlar”, *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 40(1):153-160
40. Ova G., (2001), “Koruyucular, Gıda katkı maddeleri”, *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi* s 128.
41. Philpott, M. ve Lynnette.R.F., (2004), “Immuno nutrition and cancer”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1–2), 29–42.
42. Pomeranz, Y.,(1987) “Modern Cereal Science and Technology”, VCH Publishers, USA,
43. Pour Nikfardjam, M.S., Mark, L., Avar, P., Figer, M. ve Ohmacht, R. (2006), “Polyphenols,anthocyanins, and trans-resvetrol in red wines of the Hungarian Villany region”, *Food Chem.*, 98, 453-462.

44. Rice-Evans, C. (2001). “Flavonoid antioxidants”, *Current Medicinal Chemistry*, 8, 797–807.
45. Rice-Evans, C.A., Packer, L., (1998)., *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker.Inc.,USA.,35-59.
46. Saldamlı, İ., (1998), “Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri”, *Gıda Kimyası*, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 435-452.
47. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, (1998), “A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols”, *J. Science of Food and Agric.* 76, 270-276.
48. Shahidi, F. ve Naczki, M. (2003), *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, CRC Press.
49. Shahidi, F. ve Naczki, M. (1995), *Food Phenolics, Sources Chemistry Effects. Application*, Technomic, USA.
50. Shapouri R, Rahnema M., (2011), “ Evaluation of antimicrobial effect of hops extracts on intramacrophages *Brucella abortus* and *B. Melitensis*”, *Jundishapur J Microbiol.* ; (Supplement 1): S51-S8
51. Silva, F.A.M. , Borges, F., Guimaraes, C., Lima, J.L.F.C, Matos, C., Reis, S., (2000), “Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters”, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2122-2126
52. Stajner, N., Jakse, J., Kozjak, P., Javornik, B., (2005), “The Isolation and Characterisation of Microsatellites In Hop (*Humulus lupulus L.*)”, *Plant Science*, 168: 213–221
53. Stevens, J.F., Page, J.E. (2004), “Xanthohumol And Related Prenylflavonoids From Hops And Beer: To Your Good Health!”, *Phytochemistry* 65,1317–1330
54. Türker, İ., Canbaş, A. (2001), “Malt ve Bira Teknolojisi”, *Ç. Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın*, No:4, Ders Kitapları Yayın No: A-2, 40.
55. Wietstock, P., Kunz, T., Shellhammer, T., Schön, T., Methner F. J., (2010), “Behaviour of Antioxidants Derived from Hops During Wort Boiling”, *Journal of the Institute of Brewing*, 116(2): 157–166 .
56. Wrolstad, R.E., Acree, T.E., Decker, E.A., Penner, M.H., Reid, D.S., Schwartz, S.J., Shoemaker, C.F., Smith, D ve Sporns, P. (2005), “Polyphenolics”, *Handbook of Food Analytical Chemistry vol. II*, JohnWiley& Sons Inc., New Jersey, 61-535.

57. Yamaguchi, N., Satoh-Yamaguchi, K., Ono M., (2009)., “In Vitro Evaluation of Antibacterial, Anticollagenase, And Antioxidant Activities of Hop Components (Humulus lupulus) Addressing Acne Vulgaris”, *Phytomedicine*, 16(4): 369-376
58. Yıldız, L. (2007), “Bazı Bitki Örneklerinde Antioksidan Kapasitenin Spektrofotometrik ve Kromatografik Tayini”, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı.
59. Yücer,A.A., Bayaner, A., Polat, S., (2006), “Ortak Piyasa Düzenleri Alt Çalışma Grup Raporları”, T.C. Tarım Ve Köyişleri Bakanlığı, Strateji Geliştirme Başkanlığı, . Cilt 2, Ankara.

EKLER

Proje No: 2010.BİL.01-011

Proje Başlığı: Bilecik İlinde Yetiştirilen Şerbetçiotu'nun (*Humulus Lupulus L.*) Bazı Kimyasal Özellikleri, Ekstraksiyonu ve Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:

Yrd.Doç.Dr. Alev AKPINAR BORAZAN , Doç.Dr. Çağlayan AÇIKGÖZ,
Uzm.Veli ŞİMŞEK

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15.09.2010-15.12.2012

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

12.000,00 TL değerindeki sarf malzemesi proje bütçesi kapsamında Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Birimi Müdürlüğü tarafından satın alınarak proje yürütücüsüne teslim edilmiştir.

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve ilerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Proje kapsamında alınan makine ve teçhizat Kimya ve Süreç Mühendisliği Bölümü laboratuvarında halen kullanılmaktadır.

c) Projeden Yapılan Yayınlar:

Proje kapsamında elde edilen sonuçlar kullanılarak Uluslararası kongrede 1 adet ve ulusal kongrelerde 3 adet bildiri sunulmuştur.

1. Akpınar Borazan, A., Andoğlu, E.M., “Ekstraksiyon Koşullarının Şerbetçiotu (*Humulus Lupus L.*) Peletlerinden Elde Edilen Yağ Verimi Üzerine Etkileri”, Türkiye 11. Gıda Kongresi ; 10-12 Ekim 2012 Antakya/ Hatay, Poster
2. Akpınar Borazan, A., Andoğlu, E.M , “Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Şerbetçiotu (*Humulus lupulus L.*) Çeşitlerinde Fenolik Madde İçeriği ve Antioksidan Aktivitesi”, 17. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, 25 Eylül 2012, İstanbul, Türkiye, Sözlü sunum
3. Akpınar Borazan, A. , Andoğlu, E.M., “Phenolic Content And Their Antiradical Activity Of The Hops (*Humulus Lupulus L.*) Varieties Cultivated In Turkey”, 15th

European Congress On Biotechnology (ECB15), 23 – 26 September 2012, Istanbul, Turkey, Poster

4. Akpınar Borazan, A., Andoğlu, E.M., “Şerbetçiotu (Humulus Lupus L.) Yağının Çözücü Ekstraksiyonu”, Onuncu Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, 3-6 Eylül 2012, Koç Üniversitesi, İstanbul, Poster