

**ÇEŞİTLİ BİTKİ TOHUMLARINDA FİTOMELANİN
PİGMENTİNİN EKSTRAKSİYONU, SAFLAŞTIRILMASI,
ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ VE KARARLILIK
KOŞULLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖNDER ÖZDEMİR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

**MERSİN
OCAK - 2017**

**ÇEŞİTLİ BİTKİ TOHUMLARINDA FİTOMELANİN
PİGMENTİNİN EKSTRAKSİYONU, SAFLAŞTIRILMASI,
ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİ VE KARARLILIK
KOŞULLARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖNDER ÖZDEMİR

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**


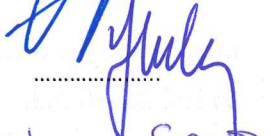
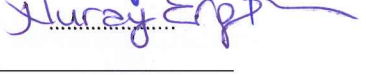
**BİYOLOTEKJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Yüksel KELEŞ**

**MERSİN
OCAK - 2017**

ONAY

Önder ÖZDEMİR tarafından Prof.Dr. Yüksel KELEŞ danışmanlığında hazırlanan "Çeşitli Bitki Tohumlarında Fitomelanin Pigmentinin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması, Antioksidan Özellikleri ve Kararlılık Koşullarının Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Serpil ÜNYAYAR	
Üye	Prof.Dr. Yüksel KELEŞ	
Üye	Doç.Dr. Nuray ERGÜN	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19./01./2017 tarih ve 2017/66 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ayla ÇELİK
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi

beyan ederim

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific Works about the case of exploitation of others' Works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

13 Ocak 2017

Önder ÖZDEMİR

ÖZET

Günümüzde yasal düzenlemeler ve tüketici talebi sebebiyle sentetik boyalara alternatif olarak doğal kaynaklardan elde edilen gıda ve tekstil boylarına artan bir ilgi mevcuttur. Fitomelanin pigmentinin, özellikle kozmetik sektöründe olmak üzere, birçok farklı sektörde kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Fitomelanin pigmentinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması oldukça zordur. Çeşitli kaynaklar, bu pigmentin antioksidan, antimikrobiyal ve morötesi (uv) ışık absorbe etme özelliği bulunduğunu, bu nedenle doğal gıda boyası olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu belirtmektedir. Bu tez kapsamında, çörek otu (*Nigella sativa*), fıstık çamı (*Pinus pinea*) ve ayçiçeği (*Helianthus annuus*) bitkilerinin siyah renkli tohumları fitomelanin pigmenti bakımından değerlendirilmiştir. Çörekotu ve fıstık çamı tohum gömleklerinden fitomelanin ekstraksiyonu yapılamamış, ayçiçeği tohum gömleklerinde belirlenen fitomelanin pigmentinin ekstraksiyon, saflaştırma, antioksidan özellikleri ve kararlılık koşulları incelenmiştir. Bulgular ayçiçeği tohumlarındaki fitomelanin oranının %1.95 olduğunu ve antioksidan kapasitenin % 9.8 askorbik asit eşdeğeri olduğunu göstermiştir. Saflaştırılan fitomelanin pigmenti ile sentetik fitomelanin pigmentinin saflığı ince tabaka kromatografisi (TLC) ile karşılaştırılmıştır. Kromatografi bulguları saflığı bozan maddelerin önemsenmeyecek oranda düşük olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği, fitomelanin, pigment, saflaştırma, TLC

Danışman: Prof. Dr. Yüksel KELEŞ, Mersin Üniversitesi, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

ABSTRACT

Because of legal regulations and consumer demands, It has increased interest to food and textile dyes. Phytomelanin pigment used in many industries, especially cosmetic industry obtained from natural sources instead of synthetic dyes. Phytomelanin extraction is very difficult. Several researches indicate that phytomelanin pigment has antioxidant activity, antimicrobial activity and ultraviolet (UV) light absorbance ability, also potentially used as natural food coloring as well as those properties. In this study, phytomelanin pigment was extracted from black cumin (*Nigella sativa*), stone pine (*Pinus pinea*) and sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. It was investigated extraction, purification, antioxidant properties and stability of pigment in sunflower seed coats. However, phytomelanin did not analyzed from seed coats of black cumin and stone pine. Results showed that sunflower seeds have % 1,95 phytomelanin content and antioxidant level is equal to % 9,8 ascorbic acid. Also obtained phytomelanin pigment was compared with synthetic phytomelanin by using thin layer chromatography (TLC) method.

Key Words: Sunflower, phytomelanin, pigment, purification, TLC

Advisor: Prof. Dr. Yüksel KELEŞ, Department of Biotechnology, University of Mersin

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve “Çeşitli bitki tohumlarında fitomelanin pigmentinin ekstraksiyonu, saflaştırılması, antioksidan özellikleri ve kararlılık koşullarının belirenmesi” konulu yüksek lisans tezini veren yapıcı ve yönlendirici fikirleri ile bana daima yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yüksel KELEŞ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mersin üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü Araştırma Görevlilerinden Mert ÖKTEM, Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlilerinden Ali Osman ADIGÜZEL ve Dr. Serpil KÖNEN ADIGÜZEL’e yapıcı ve yönlendirici fikirleriyle katkıda buldukları için teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans çalışmam süresince bana her türlü desteği sağlayan Aile üyelerim Muhsin ÖZDEMİR, Cennet ÖZDEMİR, A. Bilge ÖZDEMİR’e şükranlarımı sunarım.

Yüksek Lisans çalışmalarım esnasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Bölüm Başkanlığı’na, maddi destek veren Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne (Proje No: 2016-2-TP2-1818) içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY	i
ETİK BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
EKLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM	8
3.1. Materyal	8
3.1.1. Tohum Örnekleri	8
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar	8
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler	8
3.2. Yöntem	9
3.2.1. Ekstraksiyon	9
3.2.2. Saflaştırma	11
3.2.3. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini	12
3.2.4. Stabilite Testleri	13
3.2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	14
3.2.6. Fitomelanin Miktar Tayini	14
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	15
4.1. Ekstraksiyon	15
4.1.1. Çözücü Seçimi	16
4.1.2. Çözücü – Çözünen Optimum Madde Miktarı Tayini	18
4.1.3. Optimum Sıcaklık – Zaman İlişkisi	19
4.2. Saflaştırma	20
4.2.1. Çökeltme İşlemi	21
4.2.2. Saflaştırma Birinci Aşama	21
4.2.3. Saflaştırma İkinci Aşama	21
4.3. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini	22
4.4. Stabilite Testleri	22
4.4.1. Sıcaklık Etkisi	22

4.4.2. O ₂ etkisi	23
4.5. İnce Tabaka Kromatografisi	24
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	26
KAYNAKLAR	27
EK -1	30
ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ	31



TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1: NaOH, KOH ve NH ₄ OH bazlarının farklı konsantrasyonlarında ekstrakte edilen fitomelanin pigmentinin UV-VIS Spektrofotometre'de 280 nm dalgaboyunda ölçülen ortalama absorbans değerleri	16
Tablo 4.2: Farklı çözeltilerde ekstrakt edilen fitomelanin pigmenti çözünürlüğünün istatistik analizi	17
Tablo 4.3: Farklı çözeltiler kullanılarak ekstrakt edilen fitomelanin pigment miktarları	17
Tablo 4.4: Farklı miktarda (1-5 g) ayçiçeği tohumlarından elde edilen fitomelanin ekstrakt miktarı	19
Tablo 4.5: Fitomelanin pigmenti ekstraksiyon performansının sıcaklığa ve zamana bağlı istatistik analizi	20
Tablo 4.6: Fitomelanin pigmenti ekstraksiyon performansının sıcaklığa ve zamana bağlı miktar değişimi	20
Tablo 4.7: Fitomelanin pigment miktarının 100 °C'de zamana bağlı değişimi	22
Tablo 4.8: Gün ışığı ve oksijen varlığında fitomelanin pigmentinin kararlılığının istatistik analizi	24
Tablo 4.9: Gün ışığı ve oksijen varlığında fitomelanin pigmentinin miktar değişimi	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1: Melanin pigmenti molekül formülü	3
Şekil 2.2: Ömelanin ve Feomelanin pigmentleri molekül formülü	4
Şekil 3.1: Fitomelanin pigmenti saflaştırma işlem şeması	12
Şekil 4.1: Örneklerin mikroskopta 100 kez büyütülmüş görüntüsü	15
Şekil 4.2: 0,5 M NaOH içerisinde 24 saat bekletilen örnekler	15
Şekil 4.3: Ayçiçeği tohum gömleklerinden elde edilen fitomelanin özütlerinin görüntüsü.	16
Şekil 4.4: Farklı miktarda (1-5 g) ayçiçeği tohumlarından elde edilen fitomelanin ekstraktlarındaki renk farklılığı	18
Şekil 4.5: Farklı miktarlarda (1-5 g) ayçiçeği tohumlarından elde edilen fitomelanin ekstraktlarındaki 280 nm dalgaboyunda ölçülen absorbans değerleri	18
Şekil 4.6: Fitomelanin pigmentinin ekstraksiyon performansının sıcaklığa ve zamana bağlı değişim grafiği	19
Şekil 4.7: Saf melanin pigmenti standart eğrisi	21
Şekil 4.8: Fitomelanin pigment konsantrasyonunun 100 °C' de zamana bağlı değişimi	22
Şekil 4.9: Gün ışığı ve oksijen varlığında fitomelanin pigmentinin kararlılık grafiği	23
Şekil 4.10: Ayçiçeği tohum gömleğinden saflaştırılan fitomelanin pigmentinin saflık düzeyinin ince tabaka kromatografisi ile karşılaştırılması	25

EKLER DİZİNİ

	Sayfa
Ek 1 Askorbik asit standart eğrisi grafiği	30



KISALTMALAR VE SİMGELER

Kısaltma/Simgesi	Tanım
UV	Ultraviyole
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
KMnO ₄	Potasyum Permanganat
AgNO ₃	Gümüş Nitrat
NaOH	Sodyum Hidroksit
KOH	Potasyum Hidroksit
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
HCl	Hidroklorik Asit
H ₂ SO ₄	Sülfürik Asit
Na ₂ HPO ₄	Sodyum Fosfat
ppm	Milyonda bir
nm	Nanometre
mg	Miligram
L	Litre

1. GİRİŞ

Gıda ve kozmetik sanayisinde renklerin kullanımı antik çağa dayanmaktadır. Kayıtlı tarihe göre; renklendiricilerin günlük hayatta kullanımı ile ilgili birçok örnek bulunmaktadır. Antik Mısır mezarlarında (M.Ö. 1500) renklendirilmiş şeker resimlerine rastlanmakta ve şarabın yapay olarak renklendirilmesi Milattan önce 400 yılına dayanmaktadır. Kozmetik alanında ise Arkeologların çalışmaları, M.Ö. 5000 yıllarında kadınlar; yeşil bakır cevherini saçlarını boyamak, Carmine pigmentini dudaklarını boyamak ve Kohl (bir Arsenik Bileşiği) kaşlarını boyamak için kullanmışlardır [1].

Günümüzde yasal düzenlemeler ve tüketici talebi sebebiyle sentetik boyalara alternatif olarak doğal kaynaklardan elde edilen gıda boyalarına artan bir ilgi mevcuttur [2]. Pigmentler gıda katkı maddeleri içerisinde önemli bir yer tutmakta ve son yıllarda pigmentlere olan talep gitgide artmaktadır. Doğal pigmentler, besin değeri ve terapi etkileri bakımından sentetik pigmentlere göre güvenli olarak kabul edilmektedir. Günümüzde, doğal pigmentlerin çoğu bitki materyallerinden uygun ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilmektedir [3].

Siyah renkli, çözünmez bir pigment olan melanin konsantre asit degradesyonuna dayanıklıdır ve okside edici ajanlar ile beyazlatılabilir. Bu pigment bitkilerde, hayvanlarda ve mikroorganizmalarda bulunabilir. Bitkilerde fitomelanin ya da fitomelan olarak adlandırılan bileşik, bazı *Asparagales* taksonlarının tohum gömleklerinde ve belirli *Asteraceae* meyvelerinde bulunmaktadır [4].

Az çalışılmış bir pigment olan fitomelanin özellikle *Asteraceae* (Syn. Compositae) familyası üyelerinin tohum gömleklerinde bulunur. 50 yıldan fazladır literatürde bulunmasına rağmen, komposit dış bölgesinde oluşumu, yapısı ve kimyasal kompozisyonu hakkında basılmış çok az kaynak vardır. Pigment; polimerik, yüksek derecede çözünmez, alkali ve aside karşı dayanıklı ve yüksek derişimde siyah renge sahip görünmektedir. Doğal fonksiyonları bilinmemesine rağmen siyah-gömleklili tohumların uzun yıllar sonra toprak altında gömülü olarak dayanabilmesi; hava koşullarına, toprak asitliğine ve mikrobiyal ataklara dirençli olmasındandır. Bu da belirgin derecede bir stabilite göstergesidir [5].

Fitomelanin, özellikle kozmetik sektöründe kullanılmakta olup birçok farklı sektörde de kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Fitomelanin pigmenti ekstraksiyonu zor bir pigmenttir. Çeşitli kaynaklar, hem antioksidan hem antimikrobiyal hem de morötesi (uv) ışık absorbe etme özelliği bulunduğunu belirtmekte, ayrıca bu özelliklerin yanı sıra doğal gıda boyası olarak kullanım potansiyeli bulunmaktadır.

Bu tez kapsamında, ayçiçeği tohumlarında bulunan fitomelanin pigmenti için ekstraksiyon ve saflaştırma metodlarının optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca

fitomelanin pigmentinin antioksidan özellikleri belirlenmiş, oksijen, ışık ve sıcaklık gibi çeşitli koşullarda stabilite bakımından değerlendirilmiştir.



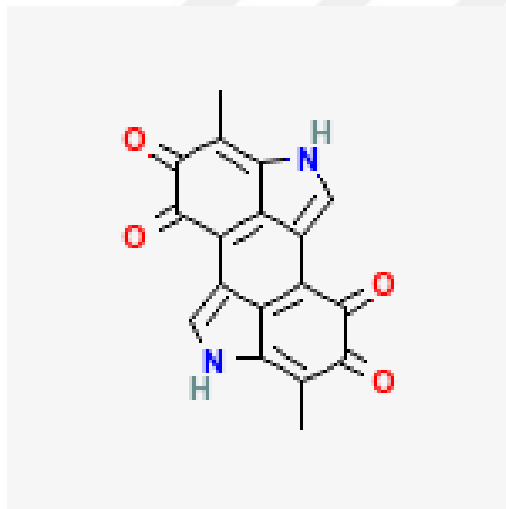
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

Fitomelaninin kimyasal doğası nedeniyle birçok spekülasyona maruz kalmıştır. İnert (durağan, kararlı) doğası ve çözücü ekstraksiyonu konusundaki zorluklar sebebiyle, kimyasal testlerden uzak kalmıştır [6].

Antioksidanlar, DNA ve diğer biyolojik olarak önemli bileşikler için koruyucu etki sağladığı bilinen bileşiklerdir. Bu yüzden antioksidan kullanımının insan sağlığı üzerinde hayati bir etkisi olduğu düşünülür [7].

Gıda ürünleri, olgunlaşma, hasat, temel işlemler ve depolanma sürecinde doğal matriksinde bir değişim zincirine girer. Renk, yapı, koku ve tat değişimi; vitamin kaybı ve proteinlerin zarar görmesi lipid oksidasyonunun etkilerinden bazılarıdır. Lipid oksidasyonu antioksidanların eklenmesi ile geciktirilebilir [8].

Melanin hayvanlar için en çok bilinen ve önemli pigmentlerden biridir. Buna rağmen, Melanin yapı ve rolü bitkiler için yeterince tanımlanmamış bir alandır. Genellikle melanin için yapılan tanımlama; fenollerin oksidasyonu ile oluşan yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler şeklindedir. Tirozinden türevlenmiş azotlu bileşikler olarak bilinmektedir. Bu azotlu polimerler ömelanin olarak adlandırılır [9]. Memeliler ve kuşlarda belirlenmiş olan feomelanin bileşiğinin seyreltik alkali çözeltilerde çözüldüğü belirlenmiştir. Fitomelanin *Compositae* familyasında rapor edilmiş ve ömelanine benzer şekilde düşük çözünürlük gösterdiği rapor edilmiştir [10].



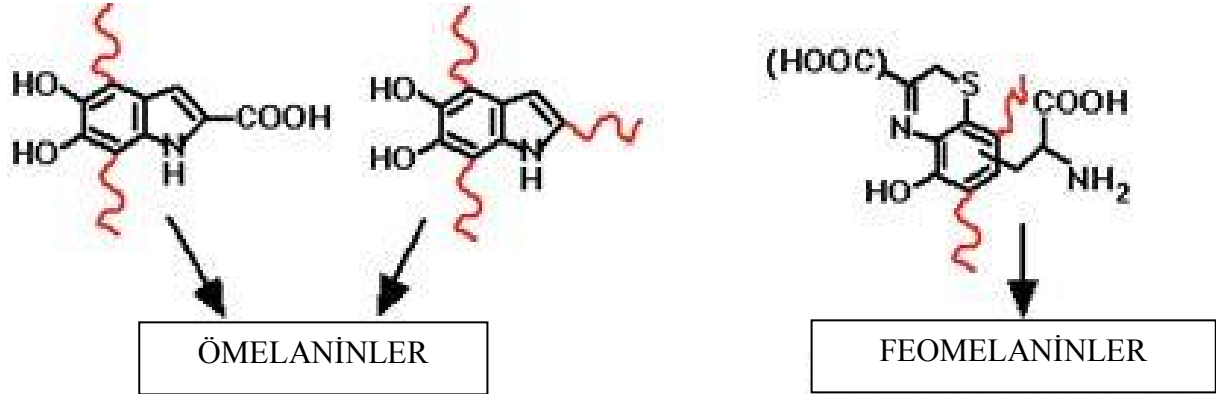
Şekil 2.1. Melanin pigmenti molekül formülü [11].

Kompleks polimerik bir yapıya sahip olan melanin bileşikleri: ömelanin, feomelanin ve allomelanin olarak sınıflandırılmaktadır.

Ömelaninler: Bu çeşit melaninler genellikle tirozin türevlerinden (ana olarak yüksek derecede çapraz bağlanma ile 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit (DHCIA) ve dihidroksi indol (DHI))

meydana gelmiş kompleks polimerik yapılarıdır. Canlılar tarafından oluşturulan ömelaninler protein ve metallerle (genellikle bakır, çinko veya demir) ilişkilendirilir.

Feomelaninler: Bu grup kükürt içeren polimerlerden (sistenil- DOPA'dan meydana gelmiş benzothiazin kompozisyonu) meydana gelir.



Şekil 2.2. Ömelanin ve Feomelanin pigmentleri molekül formülü [12].

Allomelaninler: Bu yapısal farklılığa sahip olan moleküller az miktarda azot bulundurmakta ya da hiç bulundurmamaktadır. Katekola benzer fenol bileşiklerin polimerleri olarak nitelenirler.

Allomelaninler, bitkiler ve mantarlar tarafından üretilen siyah pigmentlerdir. Allomelaninler yaprakların siyah spotlarında, çiçeklerde, fasulye ve tohumlarında (ör. *Osmanthus fragrans*), mantar sporlarında (ör. *Tuber melanosporum*) bulunmaktadır. Melanin tipi bileşikler çay ve çay polifenollerinden izole edilmiş; radikal süpürücü ve antioksidan özellikler göstermiştir. Fungal melaninler *Aspergillus nidulans* ve *A. niger*, *Alternaria alternata*, *Cryptococcus neoformans*, *Wangiella dermatitis* tarafından üretilmektedir [13].

Phytomelanin *Asteraceae* familyasından *Eupatorium* ve *Helianthus* genuslarına mensup bitkilerde, perikarpda bulunan mekanik olarak sert, kahverengi-siyah renkli, dayanıklı bir tabakadır. Fitomelanin kendine ait belirgin bir fiziksel yapısı yoktur. Hanausek'e göre fitomelanin orta lamelin taşınımı ve sklerenkima hücre duvarı tarafından sağlanan bir bileşik ile oluşur. Fakat bu gözlem diğer çalışmacılar tarafından reddedilmiş ve görüş olarak fitomelanin her zaman perikarp hipoderma hücrelerinden farklı oranlarda olduğu çok sayıda çalışma ile gözlemlenmiştir [6].

Fitomelanin tabakasının haşere zararlarına karşı caydırıcı bir etkisi vardır. Bunda fiziksel sert yapısına ek olarak toksisitesi de rol oynamaktadır. Siyah bileşik çözücü ve zarar veren ortamlara karşı oldukça dirençlidir. Konsantre asit ve alkali çözeltilerine dayanıklılık gösterip, organik çözeltilerde çözünmediği test edilmiştir [6]. Fitomelanin perikarpı koruyan bir koruyucu tabaka gibi davranır, böcek, haşere ve makro - mikro organizmaların saldırılarına karşı dıştan

koruma sağlar [14]. Haşere zararlılarının yıkıcı etkisinin yanı sıra bakteriyel bozulmaya karşı da dayanıklıdır. Kimyasal doğası henüz belirlenmemiştir [6].

Gıda üretiminde kullanılan çoğu ham madde doğal antioksidanlar içerir. Buna rağmen, üretim ve depolama esnasında doğal antioksidanlar azalır. Antioksidan kimyasallarını ekleme gerekliliğine sebep olur. Son yıllarda, doğal olarak oluşan antioksidanlar sentetik antioksidanlara göre hem tüketici hem de üreticiler tarafından tercih edilmektedir [8].

Fitomelanin ilk olarak ayçiçeğinde (*Helianthus annuus*) belirlenmiş ve mekanik dayanıklılığa vurgu yapmak amacıyla 'tabaka zırhı' şeklinde tarif edilmiştir. Fitomelanin kendine ait fiziksel bir yapıya sahip değildir, tahminler; tabaka yapısı, morfolojisi, hipoderma ve sklerenkima arasındaki hacmi doldurması ve sertleşmesi şeklindedir [6].

Türkiye; dünya ayçiçeği tohumu üretiminde 2015/2016 tahmini üretim miktarlarına göre sırasıyla Ukrayna, Rusya, Avrupa, Arjantin, Çin ve ABD'nin ardından 1170 bin ton ile yedinci sırada bulunmaktadır [15].

Çörek otu (*Nigella sativa*) tohumları, genellikle siyah çekirdek veya siyah kimyon olarak bilinir, bitkisel kaynaklı ilaç olarak kullanımı dünya çapında yaygındır ve çok sayıda hastalığa karşı koruma sağlar [16]. Son yıllarda yapılan çok sayıda araştırma bu tohumların farmakolojik etkisi olduğunu ve bu etkinin de tohum içeriği ile bağlantılı olduğunu göstermektedir. Bu araştırmaların bir kısmı çörek otunun farklı ekstraktlar kullanılarak antimikrobiyal etkiye sahip olduğuna vurgu yapmıştır. Pozitif inhibisyon iki önemli aktif içerik maddesi olan Timoquinon ve melanin ile ilişkilendirilebilir [17]. Çörek otu doğal olarak Güneybatı Asya ve Akdeniz bölgesinde yetiştirilmektedir [18].

Fıstık çamı (*Pinus pinea*) tohumu iyi bir besin kaynağıdır. Raporlara göre fıstık çamı tohumu 5.6 % nem, 31.1 % protein, 47.4 % yağ, 10.7 % karbonhidrat ve 4.3 % kül içermektedir. Tohum özellikle B₁ ve B₂ vitaminler; potasyum ve fosfor minerallerini bulundurmaktadır. Çam fıstığı kompozisyonu türlere ve alt türlere iklimsel ve coğrafik koşullara bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Literatürde fıstık çamı tohumunun kimyasal kompozisyonu üzerine bilgiye rastlanmamıştır [19]. İspanyadan sonra en çok Türkiye'de yetiştirilen Fıstık çamı'nın tohumlarında kozalakтан çıkarıldığı hali ile etrafında siyah bir tabaka bulunmaktadır, bu tabakanın ne olduğu ve fitomelanin içerip içermediğine dair bilgi Literatür taramasında bulunamamıştır.

İnert doğası ve çözücü ekstraksiyonu konusundaki zorluklar sebebiyle fitomelanin pigmenti üzerine çalışma sayısı çok azdır. Kromik asit, potasyum hidroksit, sülfürik asit, hidroklorik asit, nitrik asit, kral suyu, su, alkol, eter, amil alkol, benzen, kloroform, aseton, petrol eteri, gliserin, kloral hidrat ve amonyak çözücüleriyle ısıtılsa bile çözünmediği gözlenmiştir [6].

Bazı bilim adamları fitomelaninin karbonhidratların dehidrasyon işlemi aracılığı ile olduğu konusunda fikir belirtmiş ve $x(C_6H_{10}O_5) \cdot yH_2O$ formülünü önermişlerdir. Fitomelanin;

Tagetes meyvelerinden Wiesner ayırıcı ve hassas bir şekilde uygulanan birkaç akışkan madde (kupramonyum hidroksit ve dioksan) çözeltileri aracılığı ile $C_x(H_2O)_y$ yapısında az miktarda elde edilebilmiştir [6].

Bitki ve mantarlarda melanin pigmenti asidik çözeltilerde yüksek derecede kararlı, dimetil sülfoksit (DMSO) ile düşük seviyede çözünür, H_2O_2 veya NaOCl ile beyazlatılabilir ve alkali çözeltilerde ekstrakt edilebilir ve ham koyu kahverengi materyaller alkali çözeltiden asidik çözeltiye pH 2'ye HCl eklenerek ayarlandığında çökelti oluşturmuştur [20].

Fitomelanin için daha fazla tanımlayıcı ve karakter özellikleri; suda ve birçok organik çözücüde çözünememekte, 0,5 M NaOH veya KOH'de tam çözünürlük elde edilmekte, $FeCl_3$ varlığında presipite edilebilmekte, oksidasyon ajanları olan ($KMnO_4$, H_2O_2) ile renk kaybı sağlanmakta ve $AgNO_3$ amonyak solüsyonu ile renk yeniden oluşturulabilmektedir [21].

Antioksidanların gıdalar üzerinde bayatlama ve tat özürlerinin oluşmasını engelleme, koruma ve geciktirme özellikleri vardır. Antioksidanlar tat bozulmasını indüksiyon periyodunu uzatarak erteler. Antioksidan ekleme işleminin indüksiyon periyodundan sonra eklenmesi gıdaların bayatlaması üzerinde etkisiz kalmaktadır [22].

Bitkilerde ve hayvanlarda bulunan doğal melanin, antioksidan özelliğinden kaynaklandığı düşünülen geniş ölçekte biyolojik aktivitelere etki eder. Melaninin bu özelliği sağlığın korunmasında ve faydalı gıdaların üretiminde etkili olması sebebi ile büyük ilgi oluşturmaktadır [23].

Antioksidanlar bozulmayı iki şekilde inhibe edebilir; serbest radikalleri süpürerek ki bu antioksidanlar birincil antioksidanlar olarak adlandırılır. Serbest radikallerin süpürülmesi dışındaki metodlar aracılığı ile işlev gösteren antioksidanlar ise ikincil antioksidanlar olarak adlandırılır. Birincil antioksidanlar fenolik birleşikleri (vitamin E) içerir ve indüksiyon periyodunda kullanılır. İkincil antioksidanlar metal iyonlarını bağlama, oksijen süpürme, hidroperoksitleri radikal olmayan ürünlere çevirme, UV absorbe etme veya singlet oksijeni deaktif hale getirme gibi mekanizmaları kullanırlar [22].

Melaninde bulunan süpürücü ve kelatlama özellikleri temel olarak antioksidan aktiviteye dahil edilir. Bu özellikler başlangıç zincir reaksiyonlarında geçiş metallerinin yakalanması veya süperoksit radikallerini inaktive etme amacıyla kullanılabilir. Halbuki serbest radikal süpürücüler peroksil radikalleriyle reaksiyona giremedikleri için propagasyon zincir reaksiyonlarından korunma konusunda etkili değildirler. Buna rağmen melaninin güçlü antioksidan aktivitesi, propagasyon zincirini sonlandırabilecek muhtemel etkiye sahiptir [23].

Kompleks biyolojik materyallerden özgül bir biyomolekülün saflaştırılması veya bu kompleks yapının analizi için kullanılan yöntemler genel olarak kromatografik yöntemler olarak isimlendirilir. İnce tabaka kromatografisi (TLC) bu yöntemlerden bir tanesidir. TLC'de durgun faz, uygun bir matrikse bağlanarak cam, plastik veya metal alüminyum tabaka üzerine ince bir

katman oluşturacak şekilde kaplanır. Hareketli faz ise horizontal veya vertikal olarak tutulan TLC tabakasını kapiller aksiyon ile bir boydan bir boya geçer. Bu kromotografi yöntemi ise fazla sayıdaki örneklerin aynı anda uygulanmasına izin vermesi nedeniyle, kolon kromotografisine göre bazı pratik avantajlara sahiptir [24].

Fitomelanin pigmentinin karakteristik özelliklerini gösteren pigmentler UV spektrofotometrede tipik olarak 280 nm'de bir omuz göstermiştir [25]. Melanik pigmentlerin 275-280 nm'de belirgin bir omuz gösterdiği ve melanin pigmentleri için tipiktir [26]. Fitomelanin pigmenti absorbans ölçümleri NaOH çözeltisinde çözülmüş şekilde 280 nm'de yapılabilir [27].



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Tohum Örnekleri

Deneylerde kullanılan tohum örnekleri; ayçiçeği (*Helianthus annuus*) tohumları kuruyemiş satıcısından, çörek otu (*Nigella sativa*) aktardan ve fıstık çamı (*Pinus pinea*) tohumları ağaçlardan toplanılarak temin edilmiştir. Analizlerde kullanılmak üzere ışık almayan kaplarda muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler (Merck, Sigma-Aldrich) analitik saflıktadır.

Çalışmada UV-VIS spektrofotometre, santrifüj, pH metre, manyetik karıştırıcı, ısıtıcı, hassas terazi ve su banyosu başlıca kullanılan cihazlardır.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

NaOH çözeltileri

20 gram NaOH (0,5 mol) 1 litre saf su ile tamamlanarak 0,5 molar NaOH çözeltisi hazırlanmıştır. 0,5 Molar NaOH çözeltisi saf su ile seyreltilerek 0,3 M, 0,1 M, 0,05 M derişimde NaOH çözeltileri elde edilmiştir.

KOH çözeltileri

28,05 gram KOH (0,5 mol) 1 litre saf su ile tamamlanarak 0,5 molar KOH çözeltisi hazırlanmıştır. 0,5 Molar KOH çözeltisi saf su ile seyreltilerek 0,3 M, 0,1 M, 0,05 M derişimde KOH çözeltileri elde edilmiştir.

NH₄OH Çözeltileri

% 35 W/W NH₄OH çözeltisi kullanılmıştır

$$1 \text{ mol NH}_4\text{OH} = 35,04 \text{ gram}$$

$$0,5 \text{ M NH}_4\text{OH} = 0,5 \text{ mol} / 1 \text{ litre}$$

$$0,5 \text{ mol NH}_4\text{OH} = 17,52 \text{ gram}$$

$$(X \text{ cm}^3) * (35/100) * (0,88 \text{ g/cm}^3) = 17,52 \text{ gram}$$

56,88 cm³ NH₄OH alınıp (0,5 mol) 1 litre saf su ile tamamlanarak 0,5 molar NH₄OH çözeltisi hazırlanmıştır. 0,5 Molar NH₄OH çözeltisi saf su ile seyreltilerek 0,3 M, 0,1 M, 0,05 M NH₄OH çözeltileri elde edilmiştir.

2 M HCl Çözeltisi

% 37'lik HCl çözeltisinden 2 M HCl çözeltisi yapmak için 16,5 ml % 37'lik HCl alınıp saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

6 M HCl Çözeltisi

% 37'lik HCl çözeltisinden 6 M HCl çözeltisi yapmak için 49,5 ml % 37'lik HCl alınıp saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.

Çözücüler

Saflik derecesi % 96 olan etil alkol, % 99,5'luk hazır etil asetat ve 99,8'lik aseton (Merck) kullanılmıştır.

0,6 M H₂SO₄ Çözeltisi

0,6 M H₂SO₄ Çözeltisinden 500 ml hazırlamak için % 98'lik H₂SO₄ çözeltisinden 16,3 ml alınıp saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

28 mM Na₂HPO₄ Çözeltisi

28 mM Na₂HPO₄ çözeltisinden 500 ml hazırlamak için 1,988 gram Na₂HPO₄ tartılıp saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

4 mM Amonyum Molibdat Çözeltisi

4 mM amonyum molibdat çözeltisinden 500 ml hazırlamak için 2,328 gram amonyum molibdat tartılıp saf su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

500 ppm Askorbik Asit Çözeltisi

500 ppm askorbik asit çözeltisinden 250 ml hazırlamak için 250 ml'lik balon joje içerisine 0,125 gram tartım yapılır ve 250 ml'ye saf su ile tamamlanır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Ekstraksiyon

Bitki ve mantarlarda melanin pigmenti asidik çözeltilerde yüksek derecede stabil, dimetil sülfoksit (DMSO) ile düşük seviyede çözünür, alkali çözeltilerde ekstrakte edilebilir [20]. Tez kapsamında 3 farklı bitki tohumu incelenmiş olup bunlar çörek otu (*Nigella sativa*) tohumları, çörek otu tohumu posası (soğuk pres ile yağı alınmış hali), Ayçiçeği (*Helianthus annuus*) ve Fıstık

Çamı (*Pinus pinea*) tohumlarıdır. Örnekler mikroskop altında 100 kat büyütülerek incelenmiştir. Ayrıca fitomelanin pigmenti ekstraksiyonu için eşit miktarlarda ve eşit hacimdeki 0,5 molar NaOH çözeltisinde 24 saat bekletilmiştir.

3.2.1.1. Çözücü seçimi

Geçmiş araştırmalarda yapılmış ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen bulgular değerlendirilerek ham maddeler üç farklı çözücü ile farklı çözünürlükte zamana bağlı ekstrakt olan madde miktarı gözlemlenmiştir.

Çözücü olarak alkali NH_4OH , KOH ve $NaOH$ çözeltileri kullanılmıştır. İlk olarak 0,5 M hazırlanan çözeltiler daha sonra seyreltilerek 0,3 M, 0,1 M ve 0,05 M olacak şekilde seyreltilmiştir. Bir adet saf su çözeltisi olmak üzere toplamda 13 adet çözelti hazırlanmıştır.

1 gr çekirdek tartılmış, 100 ml çözeltiye eklenmiştir. 24 saat, O_2 'siz ortamda ve oda sıcaklığında pigment ekstraksiyonu için bırakılmıştır. Kaba filtre kağıdında süzülüp 3500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Cam petri kaplara bir miktar konularak görsel olarak karşılaştırılmış daha sonra 1ml örneğe 2 ml saf su eklenerek seyreltilmiştir. Son olarak 280 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür.

3.2.1.2. Çözücü – çözünen optimum madde miktarı tayini

100 ml çözücü ile çözülebilen optimum fitomelanin pigmenti miktarını belirlemek amacıyla 1 g / 2 g / 3 g / 4 g / 5 g çekirdek tartılmıştır. Her biri 0,3 M'lık 100 ml NaOH çözeltisine eklenip 24 saat, O_2 'siz ortamda ve oda sıcaklığında pigment ekstraksiyonu için bırakılmıştır. Kaba filtre kağıdında süzülüp 3500 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Cam petri kaplara bir miktar konularak görsel olarak karşılaştırılmış daha sonra 50 µl örneğe 2,95 ml saf su eklenerek seyreltilmiştir. Son olarak spektrofotometre'de 280 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür.

3.2.1.3. Optimum sıcaklık – zaman ilişkisi

Sıcaklık – zaman ilişkisi baz alınarak optimum madde miktarına ulaşmak amacıyla farklı sıcaklıklarda zamana göre çözünen madde miktarı incelenmiştir.

İlk olarak 4 g çekirdek tartılıp 100 ml'lik 0,3 M NaOH çözeltisine eklenmiştir. +4 / +24 / +35 / +50 °C'de O_2 'siz ortamda bırakılmıştır. 7 saat boyunca saat başı daha sonra 22. saat ve 24. saatte 3'er ml alınarak 3500 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. 50 µl örnek ve 2,95 ml saf su eklenerek seyreltilmiştir. Son olarak spektrofotometre'de 280 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür.

3.2.2. Safaştırma

Safaştırma işlemi üç aşamada yapılmış olup her aşamada saflık oranının artırılması hedeflenmiştir.

3.2.2.1. Çökeltme işlemi

Ekstrakte edilen fitomelanin çözeltisi filtre edilip 2 M HCl çözeltisi ile pH derecesi 1 ve 3 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında 2 saat beklendiğinde oluşan çökelti 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj aracılığı ile süpernatant uzaklaştırılmış çöken madde spatula yardımı ile alınmıştır.

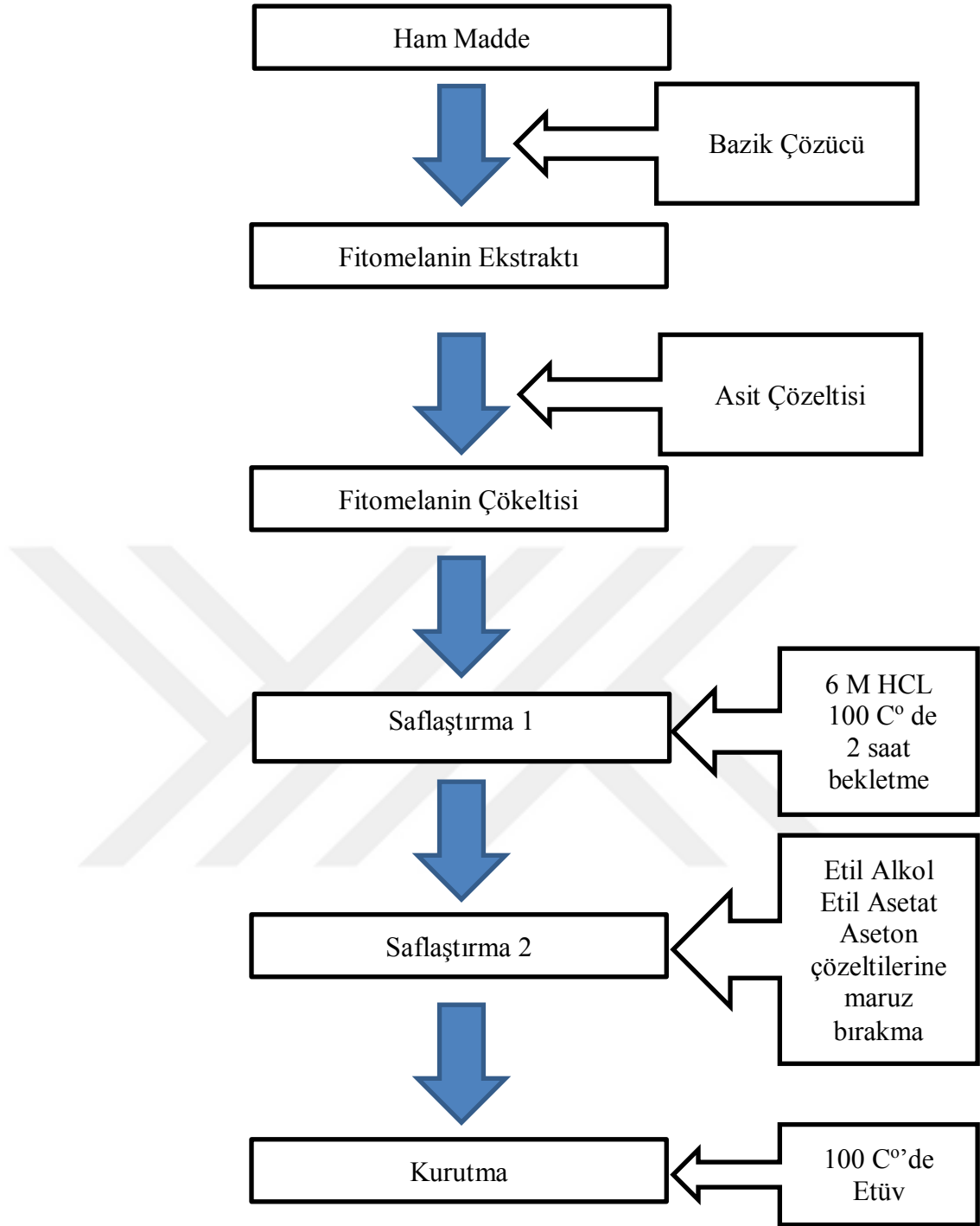
3.2.2.2. Safaştırma birinci aşama

pH ayarlaması ile çökeltile fitomelanin pigmenti; karbonhidrat ve proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla 6 M HCl asit içerisinde 100 °C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra 6 M HCl içerisinde bulunan fitomelanin pigmenti 4000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmıştır. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra saf su eklenip vorteks karıştırıcı ile çalkalanarak yeniden santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp çöken Fitomelanin pigmenti spatula yardımı ile alınmıştır.

3.2.2.3. Safaştırma ikinci aşama

Önceki aşamalardan elde edilen fitomelanin pigmenti ilk olarak 30 dakika süre ile etil alkole maruz bırakılmıştır. Daha sonra 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp saf su ile yıkanmıştır. Aynı işlem etil asetat ve aseton maddeleri için de uygulanmıştır.

Safaştırılan fitomelanin cam petripler içerisinde etüvde 100 °C'de kurutulup cam yüzey üzerinden sıyrılarak alınmıştır.



Şekil 3.1. Fitomelanin pigmenti saflaştırma işlem şeması [21, 28]

3.2.3. Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

İlk olarak toplamda 500 ml olacak şekilde belirteç çözeltisi hazırlanmıştır. Belirteç çözeltisi içerisinde 0,6 M H_2SO_4 çözeltisi, 28 mM Na_2HPO_4 çözeltisi, 4 mM Amonyum Molibdat olacak şekildedir. Daha sonra saflaştırılan fitomelanin pigmenti çözeltisinden bir miktar alınarak

miktar tayini yapıldı. Miktar tayini yapılan çözeltiden 300 µl alınıp 2,7 ml belirteç çözeltiye eklenerek toplamda 3 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Buna ek olarak 300 ml metanol alınarak 2,7 ml belirteç çözelti eklenip kör çözelti oluşturulmuştur. Bunun yanı sıra bir standart eğri oluşturmak amacıyla toplam antioksidan kapasitenin karşılaştırılabilmesi için 40, 60, 80, 100 ppm'lik askorbik asit (C vitamini) çözeltileri hazırlanmış, 300 µl askorbik asit 2,7 ml belirteç çözelti eklenerek daha önceki çözeltilerle aynı işlem uygulanmıştır. Farklı miktarlarda hazırlanan askorbik asit çözeltileri, ilk olarak 500 ppm hazırlanıp daha sonra seyreltilerek istenen miktarlar elde edilmiştir.

Hazırlanan 3 ml'lik çözeltiler 90 dakika boyunca 90 °C sıcaklığa maruz bırakılmış ve daha sonra oda sıcaklığına indirgenmiştir. Son olarak spektrofotometre cihazı 695 nm'ye ayarlanıp kör çözelti ile sıfırlanmış ve tüm ölçümler bu kapsamda yapılmıştır.

3.2.4. Stabilite Testleri

3.2.4.1. Sıcaklık etkisi

Saflaştırılmış fitomelanin pigmentinin sıcaklığa karşı dayanıklılığını belirlemek amacıyla ilk olarak miktarı belirlemek için kullanılan saf fitomelanin çözeltisinden 100 µl alınıp 2,9 ml 0,1 M NaOH ile seyreltilerek spektrofotometrede 280 nm'de okunmuştur. Daha sonra toplamda 150 ml olan saf fitomelanin çözeltisi 2 saat süresince 100 °C sıcaklığa maruz bırakılmış ve yarım saat arayla buharlaşan su yerine saf su ekleme yapılmıştır. Saf su ekleme akabinde çözelti homojen hale geldikten sonra her ölçüm için 100 µl alınıp 2,9 ml 0,1 M NaOH ile seyreltilerek spektrofotometrede 280 nm'de okunmuştur.

3.2.4.2. O₂ etkisi

Bu aşamada çözünmüş haldeki saflaştırılmış fitomelanin pigmentinin farklı ortam şartlarında kararlılığı incelenmiştir. İlk olarak 0,1 M NaOH içerisinde çözünmüş haldeki fitomelanin pigmenti çözeltisinden 50 µl alındı ve 2,95 ml 0,1 M NaOH çözeltisi ile seyreltilip spektrofotometrede 280 nm'de okunmuştur. Akabinde ilk ölçümü yapılan fitomelanin çözeltisinden 4 adet tüp içerisine her birinin içerisine 30 ml alınarak 0,1 M NaOH çözeltisi ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

Oluşturulan tüpler 4 ayrı ortam koşulu;

- a) O₂ ile teması kesik, ışıklı ortam
- b) O₂ ile teması var, ışıklı ortam
- c) O₂ ile teması var, ışısız ortam
- d) O₂ ile teması kesik, ışısız ortam

Olacak şekilde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen çözeltiler ilk üç gün birer gün arayla daha sonra 7, 14, 21, 35'nci günlerde 1 ml örnek alınıp 2 ml 0,1 M NaOH eklenerek spektrofotometrede ölçülmüş ve farklı parametrelerde karşılaştırmaları yapılmıştır.

3.2.5. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Tez kapsamında saflaştırılan fitomelanin pigmentinin sentetik melanin pigmenti saflığı ile karşılaştırmasını yapmak amacıyla ince tabaka kromatografisi uygulanmıştır [29]. Saflaştırılmış ve kurutulmuş fitomelanin pigmenti ve sentetik melanin pigmenti 0,1 M NaOH çözeltisinde çözülmüştür. n-butanol:asetik asit:saf su (70:20:10) çözücü sistemi kullanılmıştır [30]. Silika jel kromatografi kağıdı (Merck TLC Silica Gel 60 F254) üzerinde yürütülmüştür [31]. Yürütme işlemi sonucu safıkları üzerine karşılaştırma yapılmıştır.

3.2.6. Fitomelanin Miktar Tayini

Saflaştırılan fitomelanin pigmenti miktarını belirlemek amacıyla Sigma-Aldrich firmasına ait sentetik melanin pigmenti kullanılmıştır. İlk olarak 500 ppm (mg/L) şeklinde sentetik melanin çözeltisi 0,1 M NaOH ile hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan 500 ppm'lik çözeltilerden seyreltme yapılarak 0, 10, 20, 40, 80 ve 100 ppm olacak şekilde yeni çözeltiler hazırlanmış ve UV-VIS Spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür. Ölçülen absorban değerleri sonucu standart eğri oluşturulmuştur. Bu şekilde fitomelanin pigment miktarı standart eğri yardımı ile tespit edilmiştir (EK: 1)

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. EKSTRAKSİYON

Tez kapsamında 3 farklı bitki tohumu incelenmiş olup bunlar çörek otu (*Nigella sativa*) tohumları, çörek otu tohumu posası (soğuk pres ile yağı alınmış hali), ayçiçeği (*Helianthus annuus*) ve fıstık çamı (*Pinus pinea*) tohumlarıdır. Örnekler mikroskop altında 100 kat büyütülerek incelenmiş ve örneklerin mikroskop altındaki görüntüleri şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Örneklerin mikroskopta 100 kez büyütülmüş görüntüsü. Soldan sağa Çörek otu tohumu, Ayçiçeği bitkisi tohumu, Fıstık çamı tohumu kabuğu

Fitomelanin pigmenti ekstraksiyonu için eşit miktarlarda ve eşit hacimdeki 0,5 molar NaOH çözeltisinde bir gün (24 saat) bekletilen örnekler Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

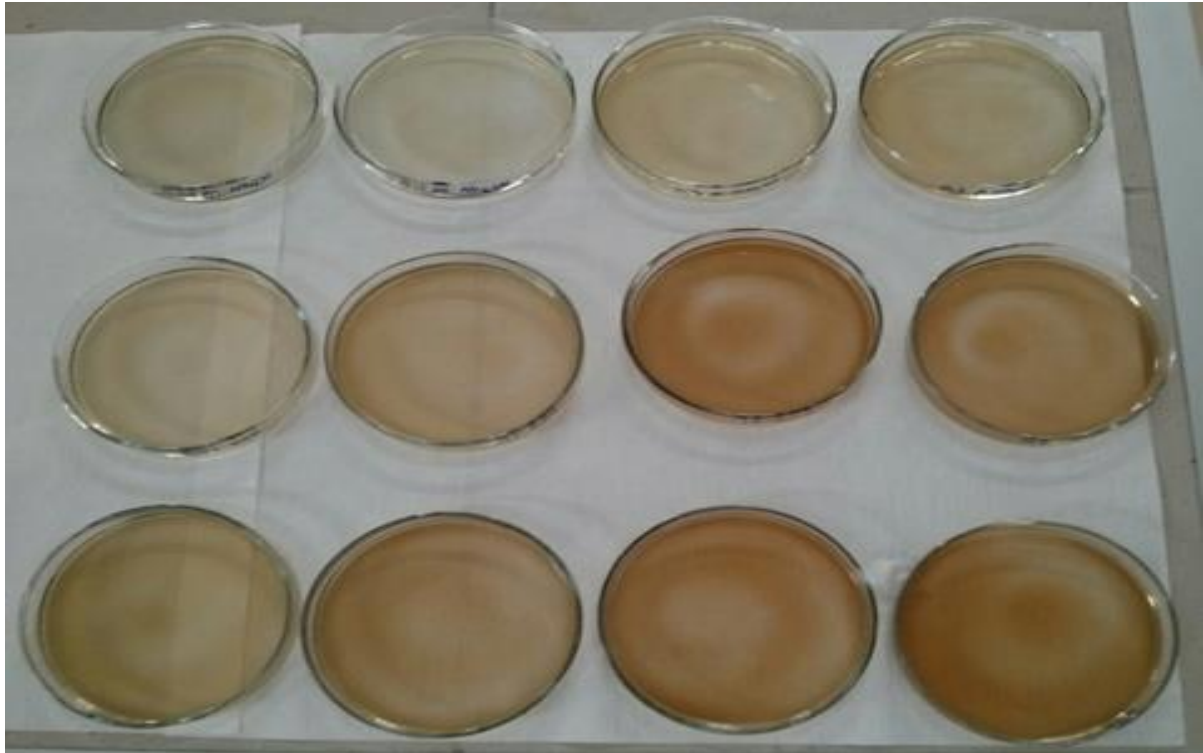


Şekil 4.2. 0,5 M NaOH içerisinde 24 saat bekletilen örnekler. Soldan sağa Çörek otu tohumu posası, Çörek otu tohumu, Ayçiçeği bitkisi tohumu, Fıstık çamı tohum kabuğu

Örnekler içerisindeki çörek otu ve fıstık çamında devam etmeye değer bir çözünürlük elde edilememiştir. Ayçiçeği tohumlarında kayda değer bir çözünürlük elde edilmiştir ve deneye ayçiçeği tohumları ile devam edilmiştir.

4.1.1. Çözücü Seçimi

Geçmiş araştırmalarda yapılmış ekstraksiyon işlemleri sonucu elde edilen bulgular değerlendirilerek ham maddeler üç farklı çözücü ile farklı çözünürlükte zamana bağlı ekstrakt olan madde miktarı gözlemlenmiştir. Yapılan çalışma sonucu edinilen bulgular;



Şekil 4.3. Ayçiçeği tohum gömleklerinden elde edilen fitomelanin özütlerinin görüntüsü. Soldan sağa 0,05 M -0,1 M -0,3 M -0,5 M konsantrasyonlarında ve aşağıdan yukarıya NaOH, KOH, NH₄OH bazlarındaki durum görülmektedir.

Tablo 4.1. NaOH, KOH ve NH₄OH bazlarının farklı konsantrasyonlarında ekstrakte edilen fitomelanin pigmentinin UV-VIS Spektrofotometre’de 280 nm dalgaboyunda ölçülen ortalama absorbanans değerleri. 1 gr tohum 100 ml çözücü içinde ekstrakte edilmiştir.

Konsantrasyon (M)	NaOH	KOH	NH ₄ OH
0	0,32±0,04	0,32±0,04	0,32±0,04
0,05	1,05±0,15	0,58±0,06	0,74±0,05
0,1	1,07±0,17	0,97±0,08	0,92±0,12
0,3	1,50±0,25	1,30±0,16	1,28±0,18
0,5	2,05±0,22	1,34±0,12	1,58±0,21

Tablo 4.2. Farklı çözeltilerde ekstrakt edilen fitomelanin pigmenti çözünürlüğünün istatistik analizi (n:3)

Özneler Arası Etki Analizi					
Bağıl değişken: Fitomelanin					
Kaynak	Tip 3 Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Anlamlılık
Düzeltilmiş Model	3,436 ^a	6	0,573	26,199	0,000
Sabit	15,688	1	15,688	717,644	0,000
Çözücüler	0,241	2	0,121	5,523	0,031
Konsantrasyon	3,195	4	0,799	36,537	0,000
Hata	0,175	8	0,022		
Toplam	19,299	15			
Düzeltilmiş Toplam	3,611	14			

a. $R^2 = 0,952$, (Düzeltilmiş $R^2 = 0,915$),

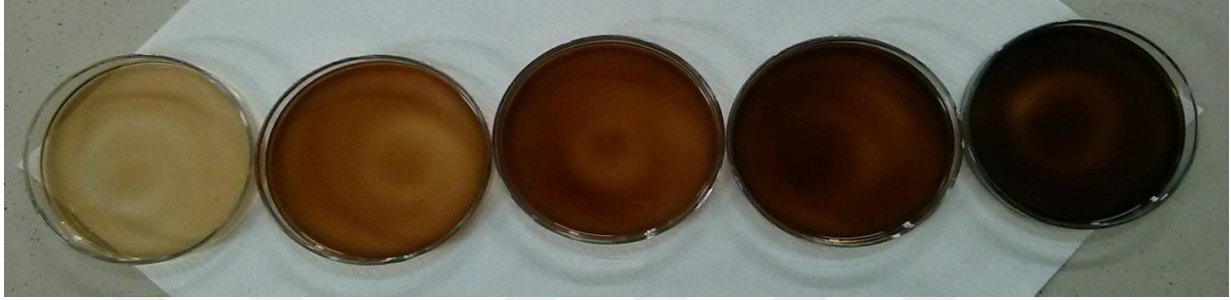
Tablo 4.3. Farklı çözeltiler kullanılarak ekstrakt edilen fitomelanin pigment miktarları

Konsantrasyon	NaOH	KOH	NH ₄ OH
(M)	ppm		
0	16,6	16,6	16,6
0,05	58,8	31,6	40,9
0,1	59,9	54,2	51,3
0,3	84,8	73,2	72,1
0,5	116,6	75,5	89,4

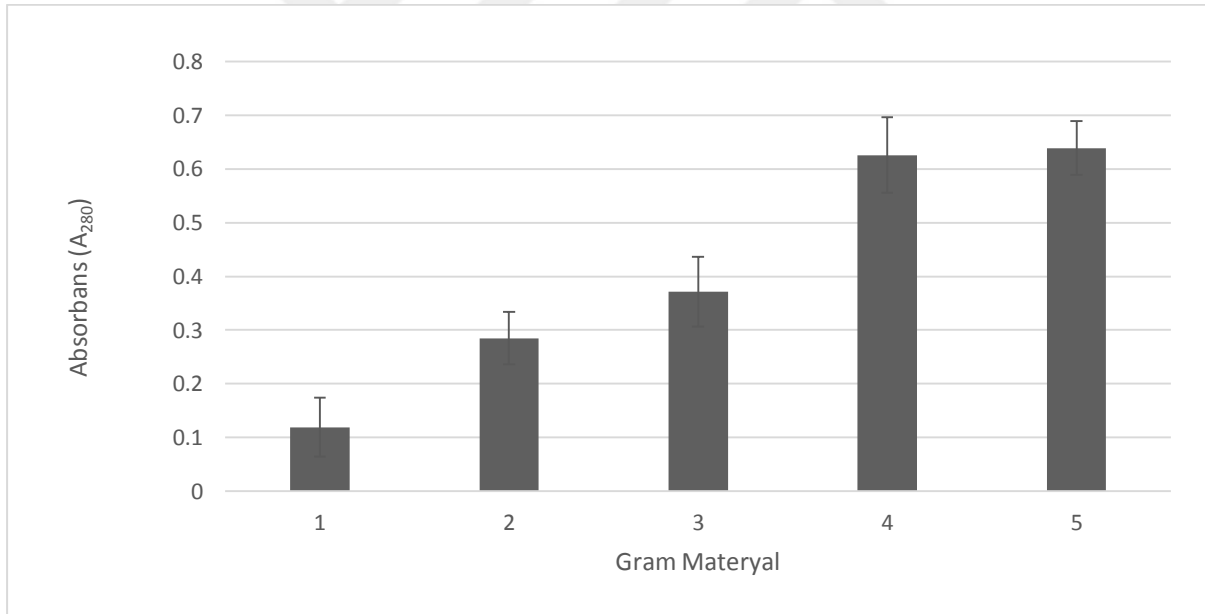
Yapılan analiz sonucu görsel ve miktar olarak en çok fitomelanin özütü 0,5 M NaOH çözeltisi ile elde edilmiştir. Elde edilmek istenen pigmente zarar vermemesi için ve safsızlığı azaltmak amacıyla 0,3 M NaOH çözeltisini çözücüsü ile devam etmeye karar verilmiştir.

4.1.2. Çözücü – Çözünen Optimum Madde Miktarı Tayini

100 ml çözücü ile çözülebilen optimum fitomelanin pigmenti miktarını belirlemek amacıyla 1 g / 2 g / 3 g / 4 g / 5 g olarak tartılan ayçiçeği tohumları 0,3 M'lık 100 ml NaOH çözeltisinde, 24 saat, O₂'siz ortamda ve oda sıcaklığında şekilde ve tabloda belirtilen bulguları vermiştir.



Şekil 4.4. Farklı miktarda (1-5 g) ayçiçeği tohumlarından elde edilen fitomelanin ekstraktlarındaki renk farklılığı (Soldan sağa 1 g, 2 g, 3 g, 4 g ve 5 g).



Şekil 4.5. Farklı miktarlarda (1-5 g) ayçiçeği tohumlarından elde edilen fitomelanin ekstraktlarındaki 280 nm dalgaboyunda ölçülen absorbans değerleri

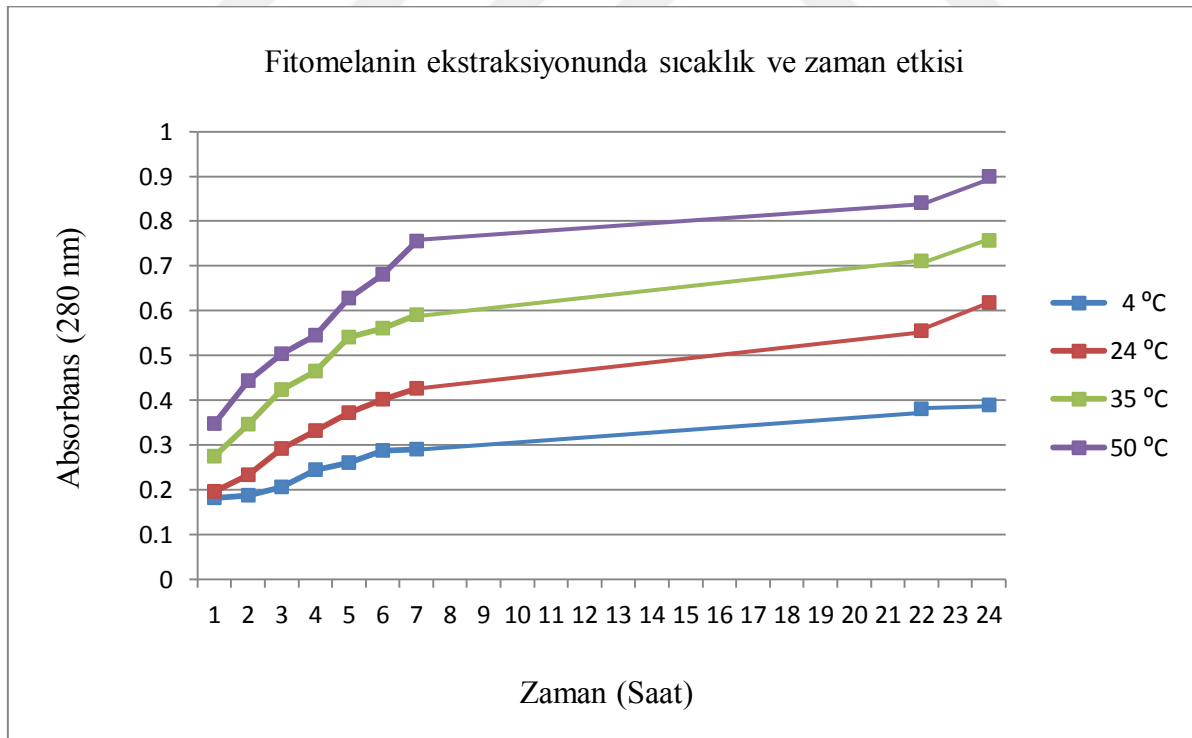
Tablo 4.4. Farklı miktarda (1-5 g) ayçiçeği tohumlarından elde edilen fitomelanin ekstrakt miktarı

Materyal	ppm (fitomelanin pigmenti)				
	1 gr	2 gr	3 gr	4 gr	5 gr
<i>Helianthus annuus</i>	5,1	14,6	19,6	34,3	35,1

Bulgular sonucu 1 g'dan 4 g'a kadar bir artış mevcut olmakla beraber 4 g ve 5 g arasında çok az bir fark gözlenmiştir. Bundan dolayı yapılan çalışmalara 4 g ayçiçeği tohumu / 100 ml 0,3 M NaOH çözeltisi şeklinde devam edilmiştir.

4.1.3. Optimum Sıcaklık – Zaman İlişkisi

Sıcaklık – zaman ilişkisi baz alınarak optimum madde miktarına ulaşmak amacıyla farklı sıcaklıklarda zamana göre çözünen madde miktarı incelenmiş olup ulaşılan bulgular Şekil 4'de bulunmaktadır.

**Şekil 4.6.** Fitomelanin pigmentinin ekstraksiyon performansının sıcaklığa ve zamana bağlı değişim grafiği.

Tablo 4.5. Fitomelanin pigmenti ekstraksiyon performansının sıcaklığa ve zamana bağlı istatistik analizi (n:3)

Özneler Arası Etki Analizi					
Bağlı değişken: Absorbans (280)					
Kaynak	Tip 3 Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Anlamlılık
Düzeltilmiş Model	1,135 ^a	9	0,126	41,544	0,000
Sabit	6,645	1	6,645	2189,391	0,000
Sıcaklık	0,613	3	0,204	67,302	0,000
Süre	0,522	6	0,087	28,665	0,000
Hata	0,055	18	0,003		
Toplam	7,834	28			
Düzeltilmiş Toplam	1,189	27			
a. R ² = 0,954 (Düzeltilmiş R ² = 0,931),					

Tablo 4.6. Fitomelanin pigmenti ekstraksiyon performansının sıcaklığa ve zamana bağlı miktar değişimi

Sıcaklık	1 saat	2 saat	3 saat	4 saat	5 saat	6 saat	7 saat	22 saat	24 saat
C°	ppm								
4	8,7	9,03	10,1	12,3	13,3	14,8	15	20,1	20,6
24	9,5	11,6	15	17,3	19,7	21,4	22,8	30,2	33,8
35	14	18,2	22,6	25	29,4	30,5	32,3	39,2	42
50	18,3	23,7	27	29,6	34,5	37,5	41,8	46,7	50,1

Farklı sıcaklıklar (4, 24, 35 ve 50°C) altında incelendiğinde sıcaklık arttıkça çözünürlüğün arttığı gözlemlenmiştir. Bulgular 6 saatten sonraki değişimin önemli olmadığını göstermektedir. Ekstraksiyon şartları optimum olarak 35 °C ve 5 saat olarak belirlenmiştir.

4.2. SAFLAŞTIRMA

Saflaştırma işleminin sonucunda fitomelanin pigmenti saflığı artırılmıştır.

4.2.1. Çökeltme İşlemi

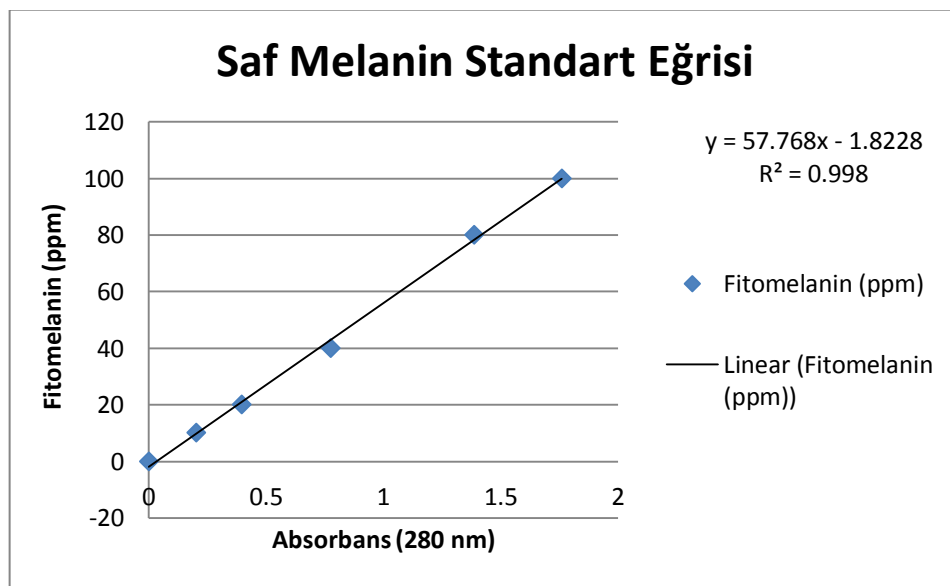
Ekstrakt edilmiş fitomelanin pigmenti çözeltisi pH derecesi 1-3 aralığına ayarlanarak çökeltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çökeltme işlemi ortalama 2 saat sürmüş olup oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın çökeltme işlemi üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlemlenmiş olup çökeltme süresini azalttığı görülmüştür.

4.2.2. Saflaştırma Birinci Aşama

pH 1-3 arası ayarlanması ile çökeltile fitomelanin pigmenti; karbonhidrat ve proteinlerin uzaklaştırılması için 6 M HCl 100 °C'de 2 saat bekletilmiştir. Yüksek sıcaklığa maruz bırakılan fitomelanin pigmentinde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiş olup pigment parçacıklarında topaklanma görülmüştür. Hidroliz sırasında HCl çözeltisinde herhangi bir renk değişimi olmamıştır.

4.2.3. Saflaştırma İkinci Aşama

Önceki aşamalardan elde edilen fitomelanin pigmenti etil alkol, etil asetat ve aseton maddelerine maruz bırakılmış olup, saflaştırılan fitomelanin cam petriyer içerisinde etüvde 100 °C'de kurutulup cam yüzey üzerinden sıyrılarak siyah renkli toz halinde elde edilmiştir. 20 gr Kıbrıs ayçiçeği tohumundan 390 mg saf fitomelanin pigmenti elde edilmiş olup, fitomelanin oranı %1.95 olarak hesaplanmıştır. Hesaplama saf Sigma melanin ile hazırlanmış standart eğri yardımıyla yapılmıştır. Spektrofotometre'de 280 nm'de elde edilen melanin standart eğrisi Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 4.7. Saf melanin pigmenti standart eğrisi

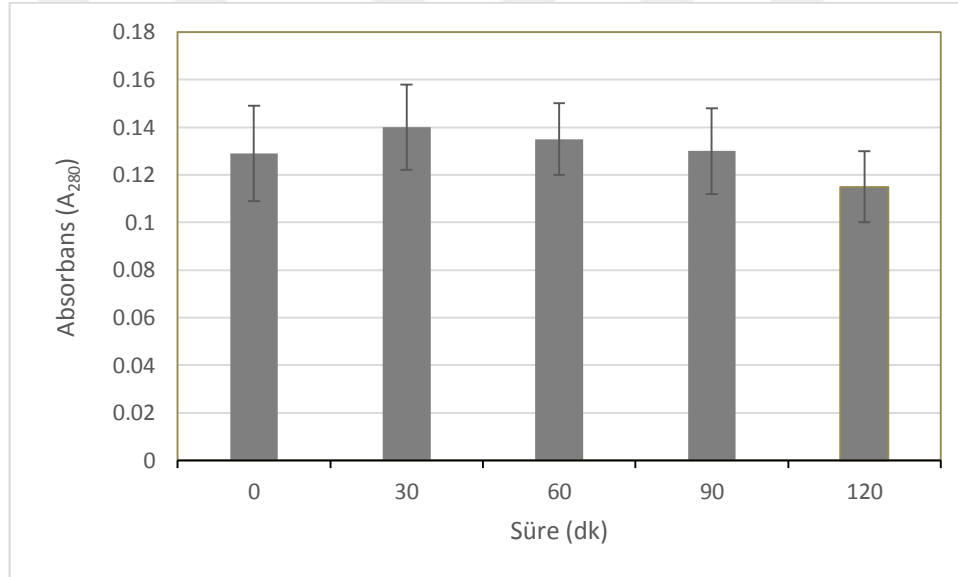
4.3. TOPLAM ANTIÖKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ

Fosfomolibden kompleks oluşturma yöntemiyle yapılan toplam antioksidan kapasite tayininde antioksidan kapasite askorbik asit standart eğrisine göre tespit edilmiştir. Saflaştırılmış 1000 ppm fitomelanin pigmentinin antioksidat kapasitesi 98 ppm askorbik asit eşdeğeri yani % 9.8'i olarak belirlenmiştir.

4.4. STABİLİTE TESTLERİ

4.4.1. Sıcaklık Etkisi

Saflaştırılmış fitomelanin pigmentinin sıcaklığa karşı dayanıklılığını belirlemek amacıyla fitomelanin pigmentinin 100 °C'de 2 saat bekletilmesi sürecinde yarım saat arayla yapılan ölçümler sonucu çizelge 4.3'deki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Fitomelanin pigment konsantrasyonunun 100 °C'de zamana bağlı değişimi

Fitomelanin pigmenti miktarının 100 °C'de 90 dakika boyunca belirgin bir değişiklik göstermediği ancak 120 dakika sonunda azaldığı Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Fitomelanin pigment miktarının 100 °C'de zamana bağlı değişimi

Zaman (dakika)	0	30	60	90	120
Miktar (ppm)	5,6	6,2	5,9	5,7	4,8

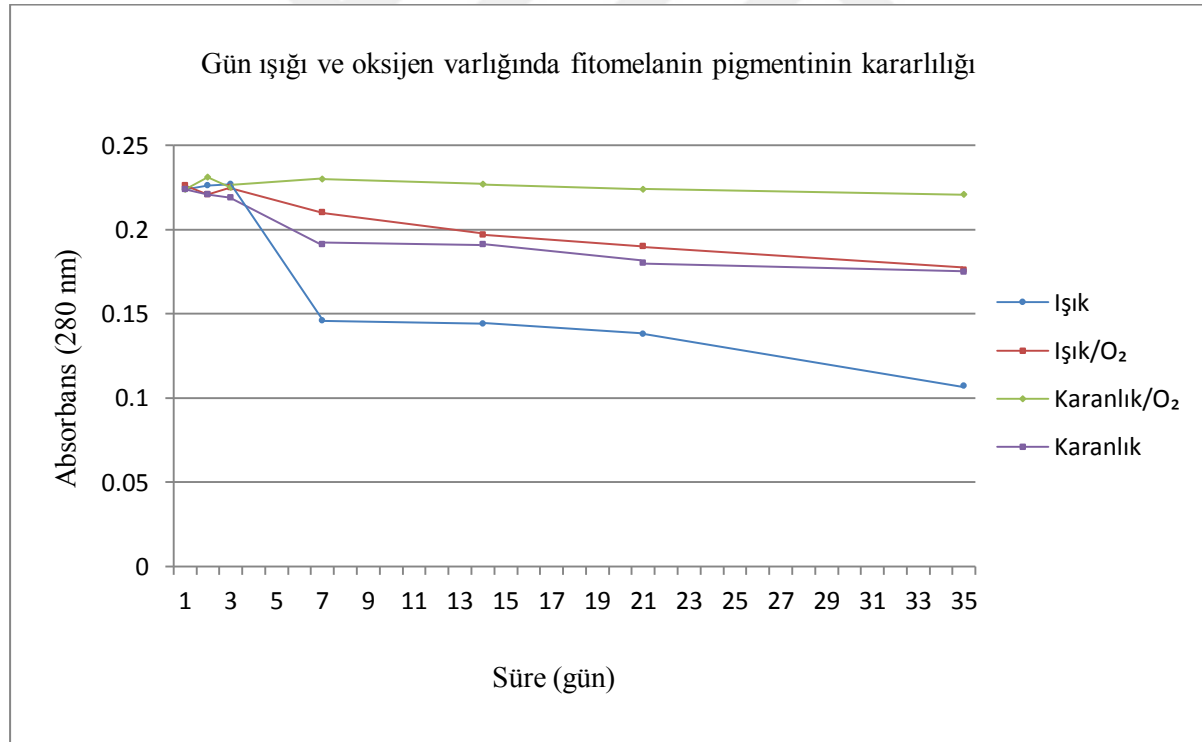
4.4.2. O₂ etkisi

Bu aşamada çözülmüş haldeki saflaştırılmış fitomelanin pigmentinin farklı ortam koşullarında kararlılık koşulları incelenmiştir.

Oluşturulan tüpler 4 ayrı ortam koşulu;

- O₂ ile teması kesik, ışıklı ortam
- O₂ ile teması var, ışıklı ortam
- O₂ ile teması var, ışısız ortam
- O₂ ile teması kesik, ışısız ortam

Olacak şekilde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen çözeltiler ilk üç gün birer gün arayla daha sonra 7, 14, 21, 35'nci günlerde spektrofotometre aracılığı ile ölçülmüş farklı parametreler birbiriyle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu şekil 12'deki sonuçlara ulaşılmıştır. Ulaşılan sonuçlar Tablo 4.8'de istatistik olarak incelendiğinde oksijen varlığının yahut yokluğunun kayda değer bir değişim göstermediği ancak süre ve ışık parametrelerinin fitomelanin kararlılığını etkilediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. Gün ışığı ve oksijen varlığında fitomelanin pigmentinin kararlılık grafiği

Tablo 4.8. Gün ışığı ve oksijen varlığında fitomelanin pigmentinin kararlılığının istatistik analizi (n:3)

Özneler Arası Etki Analizi					
Bağlı değişken: Absorbans (280)					
Kaynak	Tip 3 Kareler Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Anlamlılık
Düzeltilmiş Model	0,011 ^a	6	0,002	1,928	0,151
Sabit	0,737	1	0,737	811,57	0
Işık	0,005	1	0,005	5,636	0,034
Oksijen	0	1	0	0,352	0,563
Süre	0,005	4	0,001	1,395	0,29
Hata	0,012	13	0,001		
Toplam	0,76	20			
Düzeltilmiş toplam	0,022	19			
a. R ² = 0,471 (Düzeltilmiş R ² = 0,227)					

Tablo 4.9. Gün ışığı ve oksijen varlığında fitomelanin pigmentinin miktar değişimi

Oksijen	-	+	+	-	
Işık	+	+	-	-	
24 saat	11,1	11,2	11,1	11,1	PPM
48 saat	11,2	10,9	11,5	10,9	
72 saat	11,3	11,1	11,1	10,8	
7 gün	6,61	10,3	11,4	9,2	
14 gün	6,5	9,5	11,3	9,2	
21 gün	6,1	9,1	11,1	8,5	
35 gün	4,3	8,3	10,9	8,3	

4.5. İNCE TABAKA KROMOTOGRAFİSİ

Tez kapsamında saflaştırılan fitomelanin pigmentinin sentetik melanin pigmenti saflığı ile karşılaştırmasını yapmak amacıyla ince tabaka kromatografisi uygulanmış olup yürütme

işlemi sonucu saflıkları üzerine karşılaştırma yapılmıştır. Yapılan karşılaştırma sonucu elde edilen bulgular şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.10. Ayçiçeği tohum gömleğinden saflaştırılan fitomelanin pigmentinin saflık düzeyinin ince tabaka kromatografisi ile karşılaştırılması. Soldaki 1 ve 2 numaralı lekeler Saf Sigma melanin, Sağdaki 3 ve 4 numaralı lekeler bu çalışmada saflaştırılan fitomelanine aittir. İnce tabakada hareketli lekeler saflığı bozan maddelere aittir.

Sentetik melanin ve tez kapsamında saflaştırılan fitomelanin pigmenti karşılaştırıldığı zaman fitomelanin pigment saflığının oldukça yüksek olduğu düşünülmektedir. Farklı saflaştırma metodları üzerinde çalışmak sürece katkı sunacaktır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde saf fitomelanin pigmenti oldukça değerli bir maddedir. Doğası gereği ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri oldukça zahmetlidir. Bu kapsamda optimize edilmiş bir işlem en başta zaman olmak üzere her türlü kaynağın korunması açısından önem arz etmektedir. Yapılan deneyler esnasında, literatürde verilen süreçte bazı değişiklikler yapılarak optimum ekstraksiyon koşulları araştırılmış ve oldukça başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Silika jel ince tabakada saf melanine karşı yapılan değerlendirmede ekstraksiyon başarısının yüksek olduğu görülmektedir.

Fitomelanin pigmenti miktarının sıcaklık, ışık ve hava ile temasının zamana karşı değişimi incelenmiş kararlılık koşulları belirlenmeye çalışılmıştır. Fitomelanin pigmenti inert doğası nedeniyle bozulmaya oldukça dayanıklı olsa da sıcaklık ve ışık altında belli bir süre kaldığında önemli ölçüde kayba uğradığı belirlenmiştir. Pigmentlerin gıdalarda kullanımında en sık görülen problem kararlılık problemidir. Yani, üründe istenen rengi elde edebilmek için formülasyon uzmanları, renklerin diğer bileşiklerle nasıl etkileştiğini, final renk kalitesini hangi ton ve hangi işlemin tavsiye edildiğini hesaba katmak zorundadırlar.

Melanin pigmentinin antioksidan özelliği olduğu bilinmektedir. Fitomelanin pigmenti için de antioksidan özelliğinin olduğu yönünde araştırmalar mevcuttur. Saflaştırılmış fitomelanin pigmentinin fosfomolibden metodu ile antioksidan özelliğinin C vitamininin % 9.8'i kadar olduğu belirlenmiştir.

Ayçiçeği tohum gömleklerinden saflaştırılan fitomelanin pigmentinin miktarı 100 gram Kıbrıs ayçiçeği tohumu için yaklaşık 390 mg olup saflık değeri kozmetik ve gıda endüstrisinde kullanılabilir düzeydedir.

Elbette ki fitomelanin pigmentinin başta gıda sektörü olmak üzere kozmetik sektöründe kullanılabilmesi için ekstra çalışmalar yapılması gerekmektedir. Beraber yapılan tez çalışmasının bu ekstra çalışmalara katkı sunması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

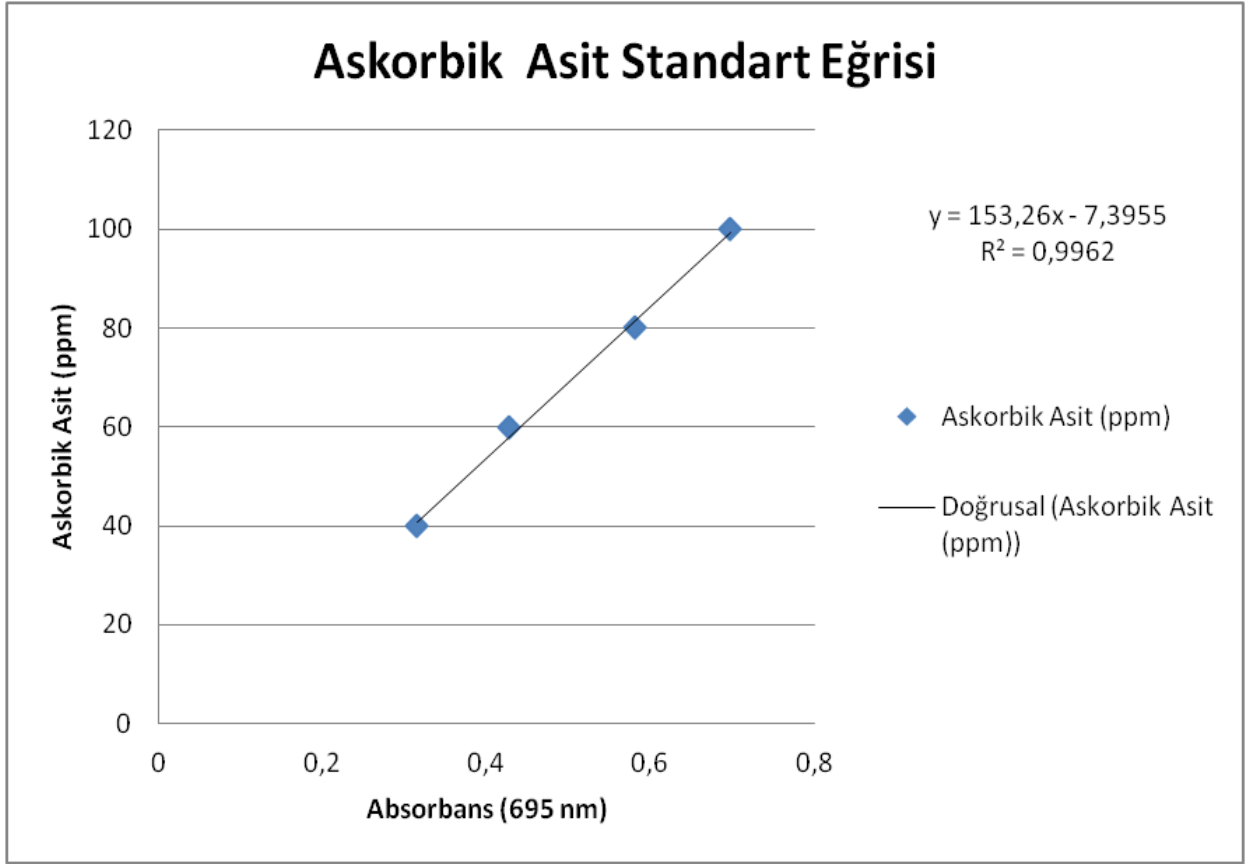
- [1]. Francis, F.J., "Colorants", Eagan, Minnesota, 144 s., (1999).
- [2]. Assous, M.T.M., Abdel-Hady, M.M., Medany, G.M., "Evaluation of red pigment extracted from purple carrots and its utilization as antioxidant and natural food colorants", *Annals of Agricultural Science*, (2014) 59(1), 1-7, (2014).
- [3]. Shujing, S., Zhang, X., Sun, S., Zhang, L., Shan, S., Zhu, H., "Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure", *Food Chemistry*, 190 (2016) 801-807, (2015).
- [4]. De-Paula, O.C., Marzinek, J., Oliveira, D.M.T., "The role of fibres and the hypodermis in *Compositae* melanin secretion", *Micron*, 44(2013) 312-316, (2012)
- [5]. Hendry, G.A.F., Houghton, J.D., "Natural Food Colorants", Blackie Academic & Professional, 348 s., (1996).
- [6]. Pandey, A.K., Dhakal, M.R., "Phytomelanin in *Compositae*", *Current Science*, Vol. 80, No.8, (2001).
- [7]. Sava, V.M., Hung, Y.C., Golkin, B.N., Hong, M.Y., Huang, G.S., "Protective Activity of melanin-like pigment derived from tea on *Drosophila melanogaster* against the toxic effects of benzidine", *Food Research International*, 35 (2002) 619-626, (2002).
- [8]. Rajalakshmi, D., Narasimhan, S., "Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation", *Food Antioxidants*, (Editör; Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K.) Marcel Dekker Inc., New York, 65-159, (1995)
- [9]. Davies, K.M., "Important Rare Plant Pigments Plant", *Pigments and Their Manipulation*, Volume 14 (Editör: Davies, K.), Blackwel & CRC, Canada, 214 -248, (2004).
- [10]. Delgado-Vargas, F., Paredes-Lopez, O., "Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses", CRC, Florida, 327s. (2003).
- [11]. <http://www.food-info.net/tr/colour/enzymaticbrowning.htm> (İndirme tarihi: 24.10.2016)
- [12]. <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/7F.html> (İndirme tarihi: 07.11.2016)
- [13]. Pintea, A.M., "Other Natural Pigments", *Food Colorants Chemical and Functional Properties*, (Editör: Socaciu, C.), CRC, Florida, 102-119, (2008).
- [14]. Kumar, J.B., Kumar, M.S., "A General Idea About Phytomelanin Layer In some *Compositae*", *Indian Journal of Plant Sciences*, 2013 Vol. 2 (4), (2013).
- [15]. 2015 Yılı Ayçiçeği Raporu (2016, Şubat), T.C. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü
- [16]. Ali, B., Blunden, G., "Pharmacological and Toxicological Properties of *Nigella Sativa*", *Phytotherapy Research*, 17 , 299-305, (2003).

- [17]. Bakathir, H. A., Abbas, N. A., "Detection of The Antibacterial Effect of Nigella Sativa Ground Seeds With Water", African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 8(2) , 159-164, (2011).
- [18]. Kara, N., Katar, D., Baydar H., "Yield and Quality of Black Cumin (*Nigella sativa L.*) Populations: The Effect Of Ecological Conditions" , Turkish Journal of Field Crops, 2015, 20(1), 9-14
- [19]. Nergiz, C., & Dönmez, İ., "Chemical composition and nutritive value of Pinus Pineae L. Seeds", Food Chemistry, 86 (2004) , 365-368, (2004).
- [20]. Jana, B.K., Mukherjee, S.K., "Notes On The Distribution Of Phytomelanin Layer In Higher Plants – A Short Communication", Journal of Pharmaceutical Biology, 4(3), 2014, 131-132, (2014).
- [21]. European Patent Office "Biologically active fraction of vegetable melanin, process for its production and its use", Bulletin 2003/43, (2003).
- [22]. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., "Antioxidants in food", Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, 380 s., (2001)
- [23]. Hung, Y.C., Sava, V.M., Makan, S.Y., Chen, T.H.J., Hong, M.Y., Huang, G.S., "Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states", Food Chemistry, 78 (2002) 233-240, (2002).
- [24]. Tuncer M., "Protein Safaştırma Kromatografik Teknikler ", Mersin Üniversitesi, Mersin, 268 s., (2008)
- [25]. Park K., Ishikawa N., Morita Y., Choi J., Hoshino A., Lida S., "A bHLH regulatory gene in the common morning glory, Ipomoea purpurea, controls anthocyanin biosynthesis in flowers, proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in seeds, and trichome formation" The Plant Journal, (2007) 49, 641-654, (2007)
- [26]. Sava V.M., Yang S., Hong M., Yang P., Huang G.S., " Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols ", Food Chemistry, 73(2001) 177-184, (2001)
- [27]. Park K., Hoshino A., "AWD40- repeat protein controls proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in the seed coats of the Japanese morning glory", Journal of Plant Physiology, 169(2012)523-528, (2012)
- [28]. Kannan, P., Ganjewala, D., "Preliminary Characterization of Melanin Isolated from Fruits and Seeds of *Nyctanthes arbor-tristis*", Journal of Scientific Research, 1 (3), 655-661 (2009)
- [29]. Girgin M., Ceylan Ö., "*Streptomyces sp.* OC 73-9 İzolatı Tarafından Üretilen Melanin Pigmentinin Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi", 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, 772, (2012)

- [30]. Kiran G.S., Dhasayan A., Lipton A.N., Selvin J., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A., “ Melanin-templated rapid synthesis of silver nanostructures ”, Journal Nanobiotechnology, 2014; 12:18, (2014)
- [31]. Madhusudhan D.N., Mazhari Z.B.B., Dastager S.G., Agsar D., “ Production and Cytotoxicity of Extracellular Insoluble and Droplets of Soluble Melanin by *Streptomyces lusitanus* DMZ-3 ”, Biomed Research International, Volume 2014, (2014)



EK -1



Ek 1: Askorbik asit standart eğrisi grafiği

ÖZGEÇMİŞ VE ESERLER LİSTESİ

Adı Soyadı: Önder ÖZDEMİR

Doğum Tarihi: 16/04/1987

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Gıda Mühendisliği	Gaziantep Üniversitesi	2006-2012
Yüksek Lisans	Biyoteknoloji	Mersin Üniversitesi	2014-D.Ediyor

Görevler:

Görev Unvanı	Görev Yeri	Yıl
Uzman Yrd.	Akdeniz İhracatçı Birlikleri	2015-2016
Gıda Mühendisi	Seyhan İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü	2016-D.Ediyor

ESERLER

1. Özdemir Ö., Keleş Y., 2016. Çeşitli Bitki Tohumlarında Fitomelanin Pigmentinin ekstraksiyonu, saflaştırılması, antioksidan özellikleri ve Kararlılık koşullarının belirlenmesi. 2. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, 31 Ağustos – 03 Eylül, Mersin. (Poster Bildiri)