



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇÖREK OTUNA UYGULANAN BAZI
SÜPERKRİTİK EKSTRAKSİYON
PARAMETRELERİNİN ELDE EDİLECEK
ÜRÜNLERİN KALİTESİNE ETKİSİ

Rumeysa KARATAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Haziran- 2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Rumeysa KARATAŞ tarafından hazırlanan “Çörek Otuna Uygulanan Bazı Süperkritik Ekstraksiyon Parametrelerinin Elde Edilecek Ürünlerin Kalitesine Etkisi” adlı tez çalışması 24/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr. Nizam Mustafa NİZAMLIOĞLU

.....

Danışman

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

.....

Üye

Doç. Öğr. Üyesi Gamze ÜÇOK

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Şerife Yurdagül KUMCU
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Rumeysa KARATAŞ

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇÖREK OTUNA UYGULANAN BAZI SÜPERKRİTİK EKSTRAKSİYON PARAMETRELERİNİN ELDE EDİLECEK ÜRÜNLERİN KALİTESİNE ETKİSİ

Rumeysa KARATAŞ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

2024, 35 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

Doç. Dr. Nizam Mustafa NİZAMLIOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Gamze ÜÇÖK

Tıbbi aromatik bitkilerden olan çörek otunun ana biyoaktif bileşeni timokinon sağlık sorunlarına ve kronik hastalıklara karşı yardımcı bir besindir. Bu çalışmada süperkritik karbondioksit ekstraksiyon yöntemiyle farklı parametrelerle (300 bar- 500 bar ve 45°C-55°C-65°C) ekstraktlar elde ederek, timokinon içeriği ve bazı fizikokimyasal özellikleri (peroksit değeri, yağ asidi kompozisyonu, toplam fenolik madde miktarı ve serbest radikal süpürücü etkisi) belirlenmiştir. En yüksek timokinon miktarının (90.17mg/gr) 300 bar basınç altında 45°C sıcaklıkta üretilen ekstrakta olduğunu tespit edilmiştir. Ekstraktların peroksit değeri bakımından en düşük değerinin (66,54 meqO₂/Kg) 500 bar basınç altında 45°C sıcaklıkta elde edildiği gözlemlenmiştir. Ransimat test metodu ile uygulanan süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların oksidasyona karşı dayanıklılığı tespit edilmiş olup, uygulanan parametrelerden en yüksek değer 500 bar, 65°C parametrelerinde (3.44saat) en düşük ise 300 bar ve 45°C parametrelerinde (0.14 saat) elde edilmiştir.

Yağ asidi bileşimlerinde ise farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen ekstraktların doymamış yağ asitleri linoleik asit (%34.50-58.02) ve oleik asit (%19.14-24.62) olup, ana doymamış yağ asidi ise palmitik asit (%11.68-26.01) olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen verilere göre süper kritik karbondioksit ekstraksiyon yöntemi ile en yüksek timokinon veriminin 300 bar, 45°C parametreleri uygulandığında elde edildiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Çörek otu, *Nigella sativa* L., Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu, Yağ asidi bileşimi, Timokinon.

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECT OF CERTAIN SUPERCRITICAL EXTRACTION PARAMETERS ON THE QUALITY OF PRODUCTS OBTAINED FROM BLACK CUMIN

Rumeysa KARATAŞ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE / DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN MECHANICAL ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

2024, 35 Pages

Jury

Prof. Dr. Ahmet ÜNVER

Doç. Dr. Nizam Mustafa NİZAMLIOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Gamze ÜÇÖK

Thymoquinone, the main bioactive component of black cummin (*Nigella sativa*), a medicinal and aromatic plant, is beneficial against health issues and chronic diseases. In this study, supercritical carbon dioxide extraction method was employed under different parameters (300 bar-500 bar and 45°C-55°C-65°C) to obtain extracts, and the thymoquinone content as well as certain physicochemical properties (peroxide value, fatty acid composition, total phenolic content, and free radical scavenging activity) were determined. The highest amount of thymoquinone (90.17 mg/g) was found in the extract produced at 45°C and 300 bar pressure. It was observed that the lowest peroxide value (66.54 meqO₂/Kg) was obtained in the extract at 45°C and 500 bar pressure. The oxidative stability of the extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction was determined using the Rancimat test method, with the highest value (3.44 hours) observed at 65°C and 500 bar, and the lowest value (0.14 hours) at 45°C and 300 bar.

Regarding the fatty acid composition, the extracts obtained under different extraction parameters had unsaturated fatty acids, primarily linoleic acid (34.50%-58.02%) and oleic acid (24.62%-19.14%), while the main saturated fatty acid was palmitic acid (11.68%-26.015%).

Based on the data obtained from this study, it was concluded that the highest thymoquinone yield with the supercritical carbon dioxide extraction method was achieved at 45°C and 300 bar parameters.

Keywords: Black cummin, *Nigella sativa* L., Supercritical CO₂ extraction, Fatty acid composition, Thymoquinone.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışma sürecimin her aşamasında desteğini esirgemen, bilgisiyle, deneyimleriyle bana yol gösteren ve beni yönlendiren kıymetli hocam Prof. Dr. Ahmet ÜNVER'e,

Ekstratlarımı elde etmemde bana yardımcı olan Yasin BAŞARAN'a, laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Aybüke YAVAŞ'a,

Hayatımın her aşamasında beni destekleyen, fedakarlık yapan sevgili aileme,

Ayrıca Necmettin Erbakan Üniversitesi (NEÜ) Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından 23YL19009 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı NEÜ BAP Birimine teşekkür ederim.

Rumeysa KARATAŞ
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1.Çörek otu.....	3
2.2. Çörek Otunun Kimyasal Yapısı	4
2.3. Timokinon.....	6
2.4. Süperkritik Akışkan ekstraksiyonu	7
2.4.1. Süperkritik CO ₂ ekstraksiyonu.....	8
3.MATERYAL VE YÖNTEM	10
3.1.Materyal	10
3.2.Metot	10
3.2.1.Süperkritik CO ₂ ekstraksiyon.....	10
3.2.2.Peroksit değeri	10
3.2.3.İndüksiyon periyodu	11
3.2.4.Fırın Testi (Schaal Oven Testi).....	11
3.2.5.Timokinon Analizi	12
3.2.6.Yağ asitleri kompozisyonu (GC-MS)	12
3.2.7.Toplam fenolik madde miktarı.....	13
3.2.8.DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikali yakalama aktivitesi	13
3.2.9.İstatistiki analizler	14
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	15
4.1. Analiz Sonuçları	15
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	29
5.1 Sonuçlar	29
5.2 Öneriler	30
6. KAYNAKLAR	31

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Santigrat derece
m	: Metre
cm	: Santimetre
gr	: Gram
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
µl	: Mikrolitre
sn	: Saniye
dk	: Dakika

Kısaltmalar

Süperkritik CO ₂ Ekstraksiyonu	: SCO ₂
Karbondiyoksit	: CO ₂
Timokinon	: TK
GC-MS	: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Ns	: İstatistiksel olarak önemli değil

1. GİRİŞ

İnsanlar, ilk çağlarından itibaren yaygın bir şekilde tıbbi ve aromatik bitkilerden faydalanmıştır. Tıbbi bitkiler, insanlar ve hayvanların tedavilerinde, beslenmelerinde, kişisel bakım ürünlerinde, dini törenlerde ve tütsü olarak kullanılan bitkiler iken; aromatik bitkiler güzel kokulu veya tatlandırıcı bitkiler olarak tanımlanmaktadır. Ancak bitkilerin genelde bir kokusu olması nedeniyle bu iki tanım bir arada kullanılmaktadır (Sofowara ve ark., 2013). Günümüzde dünya üzerinde bilinen 270.000 bitkiden sadece 20.000 tanesi tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Laird ve Pierce, 2002; Aslan ve ark. 2015).

Çörek otu (*Nigella*), Ranunculaceae familyasına dahil tıbbi aromatik bir bitki olarak özellikle tıp alanında kullanılan bitkiler içerisinde en geniş tarihsel geçmişe sahip bitki olarak bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda tarih boyunca özellikle yiyeceklerin korunması ve lezzet vermesi amacı ile kullanıldığı tespit edilmiştir (Salama, 2010). Çörek otu bitkisinin genel olarak Batı Asya, Ortadoğu, Avrupa ve Türkiye’de yetiştiği bilinmektedir. (Magner, 2002; Al-Haj ve ark., 2010; Salama, 2010; Anonim, 2023a;).

İnsanlık tarihinde oldukça önemli bir yere sahip olan çörek otu, günümüzde de özellikle doğal olan ürünlere karşı talebin artması ve baharat, fonksiyonel gıda, bitkisel drog preparatları, sağlık ve kozmetik gibi birçok sektörde üretilen ürünler içerisinde kullanılabilen bir bitki türüdür. Çörek otunun da dahil olduğu tıbbi ve aromatik bitkiler işlevlerine göre, metabolitler olarak bilinen, farklı bölümlere ayrılmıştır. Yaşamsal fonksiyonlarının düzenlenmesi için gerekli olan karbonhidratlar, lipitler, proteinler, nükleik asitler, klorofiller ve organik asitler gibi bileşiklerin bulunduğu metabolitler primer metabolitler olarak bilinmektedir. Primer metabolitler tüm bitkilerde bulunmakla beraber, beslenme ve üremeye dahil edilerek metabolik faaliyetlerin yerine getirilmesini sağlamaktadır (Croteau ve ark., 2000; Pagare ve ark., 2015). Bitkilerin korunma, adaptasyon ve üreme için oluşturulan, yaşamsal faaliyetleri ile doğrudan bir ilişkisi bulunmayan ancak hücre metabolizmasının yan ürünü olarak bitkilerde üretilen, en az primer metabolitler kadar önemli, alçak moleküllü kimyasal bileşikler sekonder metabolitler olarak bilinmektedir (Verpoorte ve Alfermann, 2013; Anonim, 2023a). Çörek otu tohumları sabit yağ, protein, indirgen şekerler, organik asitler, tanenler, reçineler ve arabik asit, ham lif, mineraller, biyoaktif fitosteroller, β -karoten, tokoferoller ile askorbik asit, tiamin, niasin ve folik asit gibi vitaminleri içermektedir (Ramadan ve Mörsel 2004; Ramadan 2007; Al-Haj ve ark., 2010; Ramadan ve ark., 2012 Kiralan ve ark., 2014; Anonim, 2023b).

Çörek otu yağının antikanser, antidiyabetik, antiradikal ve immünmodülatör, analjezik, antimikrobiyal, anti-inflamatuar, spazmolitik, bronkodilatör, hepatoprotektif, antihipertansif ve böbrek koruyucu özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Badary ve ark 1998, Badary, 1999; AbdelFattah ve ark 2000; Badary ve ark 2000; Kanter ve ark 2005; Salem, 2005; Kaseb ve ark., 2007; Halawani 2009). Ayrıca, çörek otu tohumlarının birçok antioksidan özelliği ve aktivitesi bulunmaktadır (Ramadan, 2007).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, uçucu yağında yüksek oranlarda bulunan timokinon (TK) molekülünün kanser hücreleri üzerindeki tedavi edici etkileri doğrulanmıştır. Ayrıca, kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanıldığında tedavinin etkinliğini artırdığı ve ilaçların yan etkilerini (toksik) azalttığı da gözlemlenmiştir (Ballout ve ark., 2018).

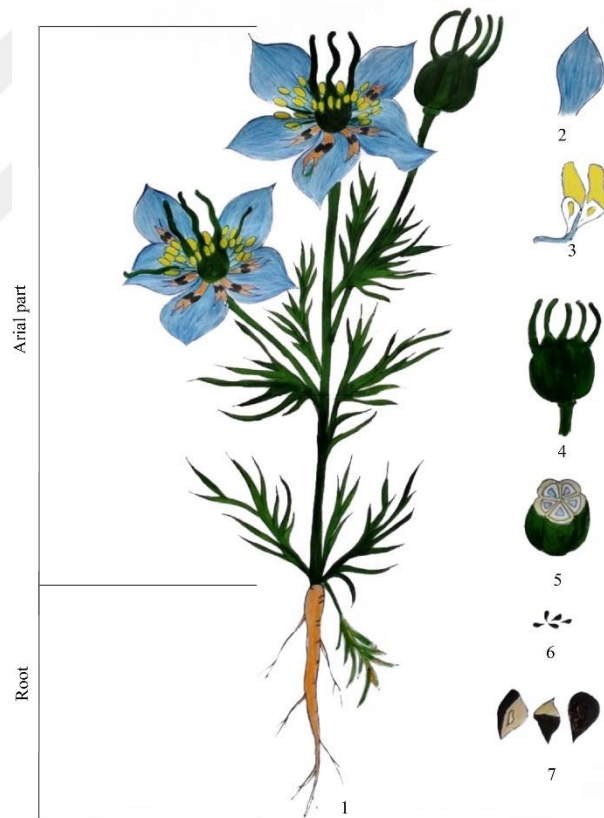
Yöntem seçimi, tohum yağlarının özelliklerini etkileyen önemli bir faktördür. Solvent ekstraksiyonu seçicilik açısından yetersiz ve aşırı ısı gerektirir, bu da istenen bileşenlerin bozulmasına neden olabilmektedir (Pokorný ve Korczak, 2001). Soğuk pres ekstraksiyonu, doğal ve güvenli gıda konusunda endişe duyan tüketiciler tarafından tercih edilir çünkü ısı ve kimyasallar içermemektedir (Kıralan ve ark., 2014). Ancak, bu yöntem düşük verim sağlar ve bu da gıda işleyen endüstrilerde kullanımını sınırlayabilir (Zúñiga ve ark., 2003; Soto ve ark., 2007). Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SAE) ise diğer tekniklere göre bazı avantajlı özellikler sunar ve genel olarak antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu için önerilen bir yöntemdir. SAE, TK gibi önemli bileşiklerin daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmasını sağlamaktadır. Bu yöntem, tohum yağlarının ekstraksiyonunda kullanılan geleneksel tekniklere göre daha öncelikli bir seçenektir (Akandi ve ark. 2012; Solati ve ark., 2014).

Bu çalışmada çörek otu bitkisinin tohumlarından süperkritik CO₂ ekstraksiyonu (SCO₂) yöntemi ile elde edilen çörek otu yağının farklı basınç ve sıcaklık değerlerinde farklı analizler doğrultusunda değerlendirme ve karşılaştırmaları yapılarak elde edilen ekstraktlardaki farklılıklar ortaya konulmaya çalışılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1.Çörek otu

Çörek otu (*Nigella sativa* L.), Ranunculaceae (düğünçiçeğigiller) familyasına mensup olan sert, çok dallı bir gövdeye ve iyi gelişmiş bir kazık köke sahip, dik, otsu, çiçekli bir bitkidir. Bitki boyu 20-70 cm arasında değişiklik göstermektedir. Pembe, beyaz, sarı, soluk mavi veya soluk mor renklerinden 5 parçalı çiçekler açan, alt yaprakları saplı, üst yaprakları sapsız, çiçekleri uzun saplı ve tek tek olan, meyvesi ise 2.5-4 mm uzunluğunda 0.4-1.7 mm uzunlukta siyah renkli tohumlara sahiptir (Seçmen ve ark., 2000; Bendre 2010; Paarakh 2010; Ramadan 2021). Şekil 1.'de *Nigella sativa*'nın çiçekleri, meyveleri ve tohumları da dahil olmak üzere farklı gövde parçaları gösterilmiştir.



Şekil 1. *Nigella sativa* kısımları.1.Yaşam alanında bulunuş hali 2.Taç yaprak, 3. Erkek organ (önden görünüm), 4.Meyve, 5. Meyve (enine kesit), 6. Tohumlar, 7. Çekirdek (uzunlamasına ve enine kesit) (Artwork credit: Rabyea Jahan Mukti1).

Nigella sativa tohumları küçük boyutludur (1–5 mm), oluklu kabuklara sahiptir. Tohumlar yaygın olarak black seed, black cumin (İngilizce) ve habbatu sawda veya habbatu el baraka (Arapça) olarak bilinir (Benkaci-Ali ve ark. 2007). Bu bitkinin

tohumları ilk Mısır'da 18. hanedan döneminde (M.Ö. 1549/1550-1292) Tutankhamun'un mezarında keşfedildiğinden bu bitkinin kökeninin Mısır ve çevre bölgeleri olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, *Nigella sativa* küresel olarak dağıılmakta ve bunlarla sınırlı olmamak üzere Orta Doğu Akdeniz bölgesi, Orta ve Güney Avrupa, eski Sovyetler Birliği (Baltık ülkeleri, Orta Asya, Doğu Avrupa, Rusya) dahil olmak üzere dünyanın birçok ülke ve bölgesinde yetiştirilmektedir. Kafkasya, Kuzey Afrika, Sudan, Etiyopya, Kenya, Somali, Cibuti, Hindistan, Pakistan, Bangladeş, Sri Lanka, Nepal, İran, Suriye, Türkiye ve Suudi Arabistan. Bitki ticari olarak birçok kuzey Hindistan eyaletinde yetiştirilmektedir ve Hindistan dünyanın en büyük çörek otu üreticisi ve ihracatçısıdır (Tonçer ve Kızıl, 2004.).

2.2. Çörek Otunun Kimyasal Yapısı

Çörek otunun kimyasal bileşimi, bitkinin hasat edildiği mevsime, çeşidine, yetiştiği iklim ve bölgeye göre değişiklik göstermektedir (Sultan ve ark., 2009; Can, 2022). Ayrıca, yağın çıkarılma yöntemleri, yağın geri kazanımı, raf ömrü ve fitokimyasal bileşimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Mekanik presleme sürecinde yağ geri kazanımı; tohum çatlatma, kabuk soyulması ve çıkarma öncesi ısı işlem gibi çeşitli değişkenlere bağlıdır. Buna karşın, çözücü ile çıkarma, yüksek yağ geri kazanımını mümkün kılan hızlı ve ekonomik bir yöntemdir. Soğuk çıkarma ise yağı çıkarmak için ısı veya rafinasyon kullanmayan bir teknolojidir. Soğuk çıkarma yöntemi ile yağda yüksek konsantrasyonda lipofilik fitokimyasallar ve doğal antioksidanlar bulunabilir. Bu nedenle, uygun çıkarma tekniğinin seçimi kritik bir öneme sahiptir.

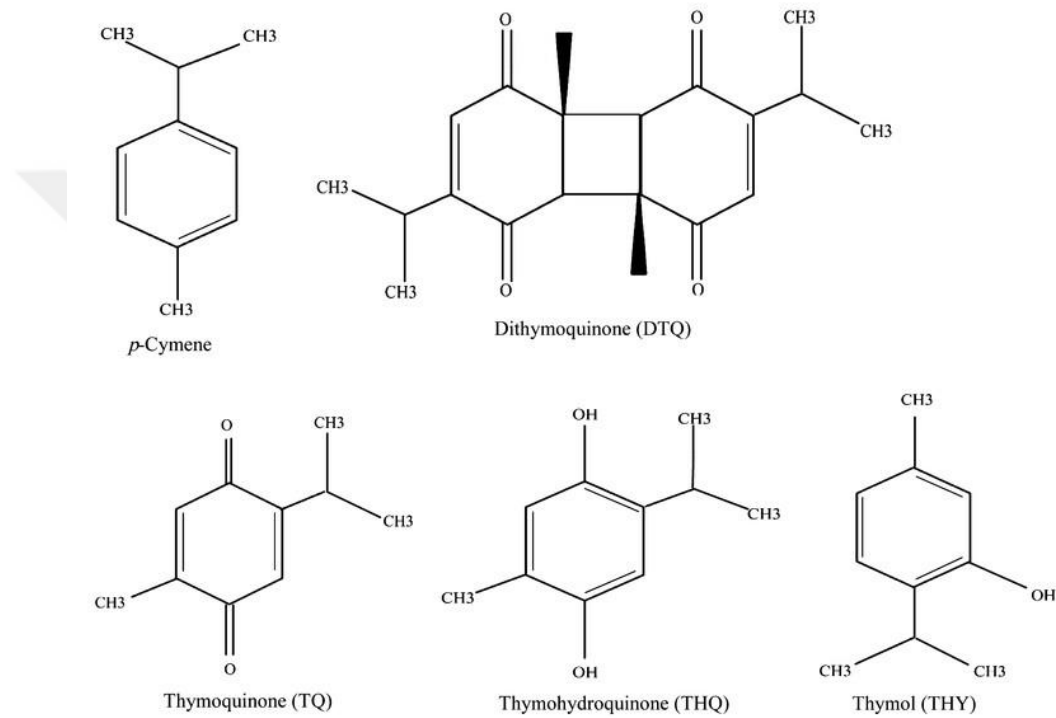
N. sativa tohumları, sabit yağ, esansiyel yağ, proteinler, alkaloidler ve saponinleri içerir. Aynı zamanda TK, flavonoidler, α -hederin, alkaloidler, antioksidanlar, yağ asitleri gibi birçok biyolojik olarak aktif molekülü içerir (Shafiq ve ark., 2014).

Çörek otunun kimyasal bileşimi Çizelge 2.2'de verilmiştir (Shah ve Kasturi, 2003; El-Tahir ve Bakeet, 2006; Trigui ve ark., 2018; Oubannin ve ark., 2022).

Çizelge 2.2. *Nigella sativa*'nın kimyasal bileşimi.

Çörek otu Bileşenleri (%)	Bileşenlerin Konsantrasyonları (%)
Karbonhidrat	3,7-43,42
Protein	20,6-40
Yağ	22-53,4
Su	3,8-11
Kül	3,7-4,86

Nigella sativa tohumları yetiştiği bölgeye ve uygulanan metoda göre kendine özgü aroması ve tadı olan yüzün üzerinde birçok farklı bileşenler içerir (Kabir ve ark., 2020). Cu, P, Zn ve Fe gibi çeşitli vitaminler ve mineralleri iyi miktarda içerir. *N. sativa*'nın en önemli aktif bileşenleri TK (%30-%48), timohidrokinon, ditimokinon (nigellon), p-simen (%7-%15), karvakrol (%6-%12), 4-terpineol (%2-%7), t-anetol (%1-%4), seskiterpen longifolen (%1-%8), α -pinene ve timol'dur (Ali ve Blunden, 2003; Boskabady ve Shirmohammadi, 2004).



Şekil 2. *N. sativa* L. tohumların yağının aktif bileşenlerinin kimyasal yapısı (Amin ve Hosseinzadeh., 2016).

N. sativa ayrıca eser miktarlarda carvone, limonene ve citronellol içerir ve iki çeşit alkaloid içerir: isoquinoline alkaloidleri (örneğin nigellicimine ve nigellicimine-N-oxide) ve pyrazole alkaloidleri (örneğin nigellidine ve nigellicine). *Nigella sativa* tohumları ayrıca α -hederin içerir, bu suda çözünebilen bir pentasiklik triterpendir (Al-Jassir, 1992; Nickavar ve ark., 2003). *N. sativa*'nın farmakolojik özellikleri, başlıca quinine bileşenlerine bağlanabilir; TK en bol olanıdır. *N. sativa* tohumları, doymamış yağ asitleri açısından zengin yağ içerir: linoleik asit (%50-%60), oleik asit (%20), eicosadienoic asit (%3) ve dihomolinoleik asit (%10); doymuş yağ asitleri (palmitik ve stearik asitler) toplamın %30'una kadar çıkabilir. α -Sitosterol, *N. sativa* yağındaki toplam

sterollerin %44-%54'ünü oluştururken, stigmasterol toplam sterollerin %6.57-%20.9'unu oluşturur (Cheikh-Rouhou ve ark., 2008).

2.3. Timokinon

Timokinon ilk kez 1963 yılında El-Dakhakhny tarafından çörek otu tohumuna ince tabaka kromatografisi kullanılarak izole edilmiştir. Ayrıca, *Eupatorium ayapana* ve *Origanum türlerinin* yaprakları, *Calocedrus decurrens* ve *Satureja'nın* esansiyel yağı, *Nepeta distans raul*, ve *Thymus vulgaris L.'nin* çiçeklenen kısmından elde edildiği diğer bitkilerden de elde edilmiştir. *Nigella sativa'nın* olağanüstü biyolojik aktivitesi, özellikle yağ bileşeni TK ile ilişkilendirilir (Norsharina ve ark., 2008). Al-Saleh ve ark. (2006) *N. sativa'daki* TK içeriğinin ülke kökenine bağlı olduğunu rapor etmişlerdir; örneğin, en düşük TK içeriği (1,274-6 mg/kg) Sudan'da gözlemlenirken, en yükseği Etiyopya örneklerinde (3,098-5 mg/kg) bulunmuştur (Al-Saleh ve ark., 2006).

Nigella türlerinden *N. sativa'yı* fark oluşturan özelliği, içeriğindeki TK değeridir. *N. sativa* uçucu yağı %30-64 oranında gözlemlenirken, *N. damascene*, *N. arvensis* ve *N. orientalis* uçucu yağlarında %0.001-0.1 oranında TK bulunmaktadır (Edris, 2021).

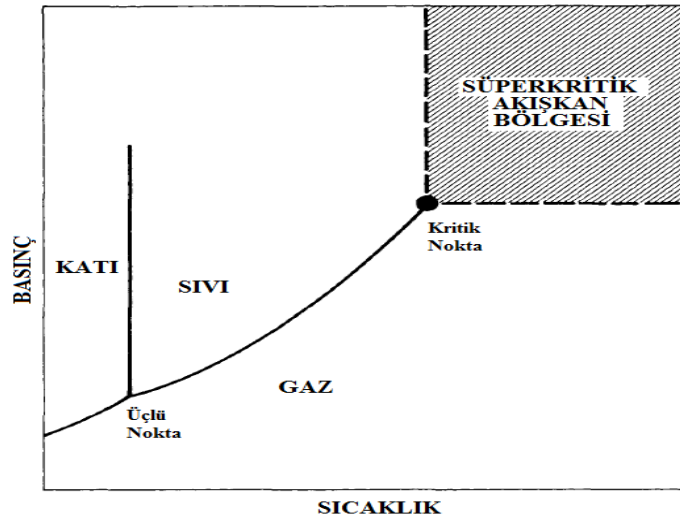
TK çörek otunda bulunan önemli antioksidan etkiye sahip olan aktif bileşiktir (Padhye ve ark., 2008). TK, metil ve izopropil yan zincirleri ile birleştirilmiş kinon halkasını içerir; bunlar sırasıyla 2. ve 5. Pozisyonlarda (2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon) bulunmaktadır. TK oda sıcaklığında sarımtırak renkli ve kristal yapıda bulunur. Timokinonun yalnızca kristalin triklinik formda var olduğunu X-ışını toz difraksiyon çalışmaları ile doğrulamıştır. 2-İzopropil-5-metilbenzo-1,4-benzokinon veya genellikle timoinon olarak adlandırılan, *N. sativa* tohumlarından elde edilen esansiyel yağın en önemli bileşenidir (Islam ve ark., 2016).

Çörek otu ve aktif bileşeni TK için anti-oksitosisik, öksürük önleyici, antiinflamatuvar ve antioksidan etkisi bulunmuştur. TK'nın antikanser aktivitesi kan, meme, kolon, pankreas, karaciğer, akciğer, fibrosarkom, prostat ve serviks kanseri hücre dizileri için ve akciğer, böbrek, deri, kolon ve meme kanseri hayvan modellerinde gösterilmiştir (Fadishei ve ark., 2020).

2.4. Süperkritik Akışkan ekstraksiyonu

"Süperkritik" terimi, bir maddenin kritik sıcaklığının ve kritik basıncının üzerine çıkarıldığında yoğunlaşmayan ve tek fazlı bir akışkan olduğu durumu ifade etmektedir. Ayrıca, madde süperkritik bir bölgeye girer ve burada gazlar veya sıvıların bazı tipik fizikokimyasal özelliklerini göstermektedir. Bunlar arasında yüksek yoğunluk, orta derecede difüzyon hızı ve düşük viskozite ve yüzey gerilimi bulunmaktadır (Spilimbergo ve Bertucco, 2003).

SAE, süperkritik gaz ekstraksiyonu ve yoğun gaz ekstraksiyonu, kritik noktaya yakın sıcaklık ve basınçlarda bir akışkanla yapılan işlemi adlandırmak için alternatif terimlerdir. Geleneksel sıvı organik çözücülerle karşılaştırıldığında, süperkritik akışkanlar daha yüksek bir yayılmaya ve daha düşük yoğunluğa, viskoziteye ve yüzey gerilimine sahiptir (Díaz-Reinoso ve ark., 2006). SAE için faz diyagramı Şekil 2.3. 'de verilmektedir.



Şekil 2.3. SAE için basınç-sıcaklık diyagramı (McHugh ve Krukoniş,1994)

SAE, doğal ürünlerden biyoaktif türlerin ekstraksiyonu için üstün bir alternatif teknik olarak ortaya çıkmıştır. Çünkü ekstraksiyon süresini azaltır, daha az organik çözücü kullanımı gerektirir, termo-duyarlı maddeler için uygundur; daha temiz ekstraktlar üretir ve çevre dostudur. SAE, bir bileşiğin, karışımın veya elementin kritik noktasının üzerindeki basınç ve sıcaklık uygulanarak elde edilebilen süperkritik akışkanın çözme özelliklerine dayanmaktadır. SAE parametrelerinin uygun şekilde kontrol edilmesiyle, süperkritik akışkanın ekstraktabilitesi de değiştirilebilir, bu da bu sürecin

gıda araştırmalarından pestisit araştırmalarına kadar geniş bir alanda kullanımını sağlamaktadır (Ahmad ve ark., 2019).

2.4.1. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu

Süperkritik akışkanlar kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemi, günümüzde geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine uygulanabilir bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Süperkritik durumda olan çözücüler, sıvı ve gazın fizikokimyasal özelliklerine benzer ara özellikler gösterir, bu da çözücünün ekstraksiyon gücünü artırmaktadır. Bu akışkanların yüksek yoğunluğu, onlara yüksek bir çözme gücü kazandırırken, yüksek difüzyon ve düşük viskozite değerleri, katı matriste istenilen penetrasyon gücünü sağlamaktadır (Reverchon ve ark., 2000). SAE sürecinin geliştirilmesini sağlamak için çözücü olarak kullanılabilen geniş bir bileşik yelpazesi vardır. Ancak, süperkritik akışkanlar olarak kullanılabilen bir çok bileşik olmasına rağmen (etilen, metan, azot, ksenon veya florokarbonlar), çoğu ayırma sistemi güvenliği ve düşük maliyeti nedeniyle karbondioksit tercih edilmektedir (Sihvonen ve ark., 1999; Akinlua ve ark., 2008).

Çeşitli ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan süperkritik akışkanlar arasında, SCO₂ en yaygın kullanılmaktadır. Çünkü CO₂, organik çözücülere bir alternatiftir; patlayıcı değildir, toksik değildir, ucuzdur ve lipofilik maddeleri çözme yeteneğine sahiptir ve nihai ürünlerden kolayca uzaklaştırılabilir. Bir diğer avantaj ise oda sıcaklığı ve basıncında gaz halinde CO₂ olmasıdır, bu da bileşiklerin geri kazanımını çok basit hale getirir ve çözücü içermeyen ekstraktlar sağlamaktadır (Cavero ve ark., 2006; Wang ve Weller, 2006; Wang ve ark., 2008). Ayrıca, bu moleköl çevre dostudur ve FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) ve EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) tarafından "genel olarak güvenli kabul edilir" (GRAS) olarak sınıflandırılmıştır.

SCO₂'de bir çözücünün çözünürlüğü büyük ölçüde sıcaklık ve basınca bağlıdır, bu da CO₂ yoğunluğundan dolayısıyla çözücü gücünü etkiler. Basıncın artırılması, SCO₂'nin sıvı benzeri yoğunluğa ulaşmasına neden olarak, çözücü ve çözünen arasındaki etkileşim olasılığını artırır. Ayrıca, sıcaklığın artırılması, SCO₂ yoğunluğunda azalmaya neden olurken, aynı zamanda da çözücünün buhar basıncını artırmaktadır. Bu iki zıt faktörün net etkisi çözünürlükte değişikliğe neden olmaktadır. Bu geçişlerin sonucu, çözünürlük izotermelerinin iyi bilinen kesiliş davranışıdır. Çözücü özellikleri, özellikle moleküler

ağırlık, polarite ve buhar basıncı, SCO_2 'deki çözünürlüğü de etkiler. Maddelerin SCO_2 'deki çözünürlüğü, hidrojen bağlanması gibi çözücü-çözünen etkileşimlerinden etkilenir. CO_2 'nin polar olmayan doğası nedeniyle, polar olmayan bileşenlerin çözünürlüğü genellikle benzer moleküler ağırlığa sahip polar bileşenlerden daha yüksektir. Bir çözücünün moleküler boyutunun artması, süperkritik akışkandaki çözünürlüğü azaltır. Bu nedenle, düşük moleküler ağırlığa ve yüksek buhar basıncına sahip polar olmayan çözücüler, nispeten düşük yoğunluk koşullarında SCO_2 'de tercihli olarak çözünürken, daha büyük, hafif polar ve daha az uçucu çözücüler için daha yüksek yoğunluk koşulları gereklidir. Böylece, sıcaklık ve basıncı basitçe ayarlayarak yüksek seçicilikler elde edilebilir, bu da çoğu durumda ek rafinasyon gereksinimlerini minimize eden SCO_2 ekstraksiyon teknolojisinin büyük bir avantajıdır. Hedef bileşik polarsa, süperkritik çözücünün polaritesi, bir polar ortak çözücü eklenerek ayarlanabilir, bu da aynı zamanda modifiye edici veya yardımcı solvent olarak adlandırılır. Ortak çözücü, çözücü ile hidrojen bağlanması, yük transfer kompleksi oluşumu ve dipol-dipol etkileşimi yoluyla etkileşime girebilir ve çözücü karışımının yoğunluğunu artırarak çözünürlüğü olumlu etkiler. Gıda uygulamaları için tercih edilen ortak çözücü, belirgin nedenlerle gıda işleme için güvenli kabul edilen (GRAS) bir çözücü olan etanol olmuştur (Lesellier ve ark., 2015; Ahmad ve ark., 2019). Birçok araştırma grubu, polar bileşiklerin hızlı SAE ayırımında bu tür bir gradyanı en yüksek modifiye edici bileşimde tutarak kullanmıştır (Ebinger ve Weller, 2014).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

Araştırmada kullanılmak üzere, Konya'daki yerel bir işletmeden çörek otu teminedilmiştir. Kullanacağımız çörek otu ekstraktlarını TİBAM' da çörek otu tohumunu öğütürerek SCO₂ ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan SCO₂ ekstraksiyon parametreleri

SCO ₂ ekstraksiyonu	Yöntem
1	120 dakika süre ile 300 bar, 45°C
2	120 dakika süre ile 300 bar, 55°C
3	120 dakika süre ile 300 bar, 65°C
4	120 dakika süre ile 500 bar, 45°C
5	120 dakika süre ile 500 bar, 55°C
6	120 kika süre ile 500 bar, 65°C

3.2.Metot

3.2.1.Süperkritik CO₂ ekstraksiyon

Şekil 3.2.1'de SCO₂ cihazında, öğütülmüş tohumlar, 120 dakika süre, 300 bar ve 500'da 45°C, 55°C ve 65°C parametrelerinde SCO₂ ekstraksiyonu ile elde edilmiştir.



Şekil 3.2.1. SCO₂ cihazı

3.2.2.Peroksit değeri

Yağın 1 kg'ında bulunan peroksit oksijeninin meq O₂/kg biriminde yağlarda içerisindeki aktif oksijen sayısına peroksit değeri denir (EEC, 1991). Yağlar depolanırken; metal iyonları, oksijen ile teması, sıcaklık ve ışığın etkisiyle

bozulmalar meydana gelebilir. Ayrıca yağ asitleri parçalanarak küçük molekül yapıdaki yağ asitleri sayısının artmasına oksijen etkisi sebep olur. Bu etkiden dolayı karanlık ortamda KI çözeltisiyle reaksiyona uğrayarak peroksit değeri hesaplanır. Anonymous (2006), AOCS Official Method Cd8-53'e göre peroksit değeri belirlenmiştir. Yağ numuneleri erlene 3gr tartıldı ve üzerine 10 ml kloroform ve 15 ml asetik asit çözeltisi eklenerek, titre edilmiştir. 1 ml doymuş KI çözeltisi eklendikten sonra 1 dakika çalkalanmıştır. Karanlık ortamda 5 dakika süreyle bekletilmiştir. Süresi biten çözeltinin içerisine 75 ml saf su ve 3-5 damla nişasta çözeltisi eklendi. Daha sonra ayarlı

0.002 N Na₂S₂O₃ çözeltisi ile renksiz olana kadar titre edilmiştir (AOCS 1990).

Peroksitdeğeri aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{Peroksit değeri} = \frac{v}{m} \times 2.8$$

v: Titrasyonda harcanan sodyum
tiyosülfat miktarı (ml)
m: Tartılan örnek
miktarı (g)

3.2.3.İndüksiyon periyodu

Yağların oksidasyonu belirli hava akışında ve sıcaklıkta nedeniyle uçucu bileşenlerin yükselişine paralel, bir kırılma noktasının belirlendiği değerdir. İndüksiyon periyodu, damıtılmış suya parçalanma ürünlerinin aktarılması sonucunda suyuniletkenliğindeki değişim ile ölçülür. Yağın oksidatif stabilitesi ne kadar yüksek iseindüksiyon periyodu o kadar uzun sürer. AOCS Cd 12b-92'e göre indüksiyon periyodu tespit edilmiştir. Ransimat 892 cihazı (Metrohm AG, Herisau, İsviçre) kullanılarak, indüksiyon periyodu sonuçları saat olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde numuneler 110°C'de 20 L/saat hızla akışı verilmiştir (Anonymous, 2006).

3.2.4.Fırın Testi (Schaal Oven Testi)

Yağ numunenelerinin raf ömrünü tespit etme yöntemlerden biri olan fırın testi oksidasyonu hızlandırarak belirlenmektedir (Schaal Oven testi) (Fennema, 1976). Numunelerdeki oksidasyonun ilerleyişini takip etmek için, 60°C sıcaklıkta ve belirli zaman periyotlarında numuneler alınarak tespit edilmiştir. Numunelerin

oksidasyon reaksiyonlarındaki gelişmelerin belirlenmesi için 1., 7., 14. ve 28. günlerde peroksit değerinden tespit edilmiştir.

3.2.5. Timokinon Analizi

Timokinon analizi; Falkon tüplerinin içerisine her bir çörek otu ekstaktından 50 mg alınarak üzerine 5 µml metanol ilave edilmiştir. 10 kez alt üst edilerek iyice karıştırıldıktan sonra 5000 rpm'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilerek metanol tabakası ayrılmıştır. Ayrılan kısmın üst kısmındaki metanol tabakası şırınga yardımıyla alınmıştır. Şırıngadaki metanol tabaka 0.45 µm'lik bir şırınga filtresi ile süzülmüştür. Kalibrasyon için, 0.0001, 0.001, 0.1, 5, 15, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 ppm konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Kromatografik analizinden önce çörek otu ekstraktlarını saflaştırmak için Ghosheh ve arkadaşları tarafından belirlenen metod uygulanmıştır (Ghosheh ve ark., 1999).

Timokinon kromatografik analiz şartları:

Mobil faz bileşimi:	%60 asetonitril %40 saf su
Akış hızı:	1 ml/dk
Enjeksiyon hacmi:	20 µL
Kolon:	C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)
İzokratik fırın sıcaklığı:	Oda sıcaklığı
Dedektör:	Diyot array dedektör
Dedeksiyon dalga boyu:	254 nm
Standart/standart için çözgen:	Standart ve internal standart metanolde çözülmüştür.

Oda sıcaklığında 254 nm UV aralığında TK miktarı hesaplanmıştır. Kalibrasyon eğrilerine göre tanımlama, tutma süresinin standart bileşiğinki ile karşılaştırılması ve kantifikasyon, standardın doğrusal gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Yağ asitleri kompozisyonu (GC-MS)

Yağ asitleri kompozisyonu için 5 ml'lik vida kapaklı deney tüpüne 0.1 g yağ örneği tartılıp üzerine 0.2 ml, 2 N metanollü potasyum hidroksit çözeltisi ve birkaç damla metiloranj çözeltisi ilave edildikten sonra PTFE-septumla birlikte tüpün kapağı kapatılmıştır. 30 saniye süreyle kuvvetlice çalkaladıktan sonra üst faz

oluşuncaya kadar beklenmiştir (Parry ve ark., 2005). Yağ asitlerinin metil esterleri (1 µl) GC-MS (Gas Chromatography – Mass Spectroscopy) cihazında incelenmiştir.

GC-MS şartları:	
GC kromatograf:	Agilent 7890A Serisi
Otomatik örnekleyici:	Agilent 7683 Enjektör ve örnek tablası
Kolon:	HP-88, 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm (p/n 112-88A7)
GC İnet:	260°C, split ratio 30:1
Taşıyıcı gaz:	Helyum, sabit akış, 20 cm/sn
Fırın sıcaklık programı:	140°C (5 dk)'den 240 oC (15 dk)'ye 4°C/dk artış hızı ile
Enjeksiyon hacmi:	1 µl
Kütle seçimli dedektör	5975C MSD
Transfer hattı	280°C
Çözücü piki çıkış zamanı	10,5 dk
Algılama modu:	Tarama (40-400 amu)

3.2.7. Toplam fenolik madde miktarı

Çörek otu ekstraktlarının toplam fenolik madde tayini için Singleton ve ark.(1999) tarafından geliştirilen Folin-Ciocalteu spektrofotometrik yöntemi uygulanmıştır.

Bu yöntemle göre 100 ml'lik bir balon jöjeye 100 µl örnek konup üzerine 500 µl Folin ayracı, 1.5 ml sodyum karbonat (Na₂CO₃) eklendikten sonra saf su ile 10 ml'ye tamamlanmış ve 2 saat karanlıkta bekletildikten sonra spektrofotometrede (Libra \$22, Biochrom Ltd., Cambridge, İngiltere) 760 nm dalga boyunda aynı şekilde hazırlanmış şahite karşı absorbansı ölçülecektü. Sonuçlar mg/ml olarak bildirilmiştir.

3.2.8. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikali yakalama aktivitesi

Elde edilen ekstraktlardan 100 µl alınıp ve sonra hazırlanan DPPH çözeltisinden 3.9 ml ilave edilerek vortekste karıştırılacaktır. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, spektrofotometre'de (Libra \$22. Biochrom Ltd., Cambridge, İngiltere) 515 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür (Singh ve ark., 2002).

3.2.9. İstatistiki analizler

Yağda yapılan oksidasyon analizlerinden elde edilen sonuçlar, tek yönlü varyansyöntremine göre analiz edilmiştir (Minitab 2000). Ortalamalar arasındaki farklılıklar Tukey çoklu karşılaştırma testiyle belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Analiz Sonuçları

Çörek otu yağı başlangıçta nispeten yüksek peroksit değerine sahiptir; ancak kararlıdır ve peroksit değeri ısıl işlem ve depolama sırasında çok hızlı artmaz. Bu durum, oldukça yüksek polifenolik içeriğiyle ilgili olabilir. Çörek otu yağının başlangıçtaki yüksek peroksit değeri nedeniyle yenilebilir uygulamalar için rafine edilmesi gerektiği unutulmamalıdır (Cheikh-Rouhou ve ark., 2007). Kirilan ve ark. (2014), farklı ekstraksiyon yöntemleriyle yaptıkları çalışmalarında soğuk presleme, geleneksel soxhlet ekstraksiyonu ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerini kullanmışlardır. Kullanılan ekstraksiyon yöntemlerinden en yüksek peroksit değeri soğuk pres ile elde edilen numunelerde bulunurken, diğer iki yöntemde ise birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir.

İndüksiyon periyodu, Ransimat cihazıyla belirlenen, yağların oksidasyona karşı stabilitesini gösteren en önemli indekstir (Upadhyay ve Mishra, 2015). Yağların oksidatif stabilitesi; yağ asidi bileşimi, antioksidanlar, küçük biyoaktif bileşikler (steroller, tokoller), polar lipitler ve metal iyonları dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir (Kiralan ve diğerleri, 2017). Rudzińska ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada çörek otu yağının diğer yağlara (kolza tohumu yağı ve pirinç kepeği yağı) göre indüksiyon değerinin yüksek olduğunu bulmuşlardır. Mazaheri ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada ayçiçek yağı, çörek otu yağı ve farklı miktarda karıştırdıkları yağların Ransimat cihazı ile analiz ederek en yüksek değeri çörek otunda bulmuşlardır. Aksoy (2022), 11 çeşit çörek otu yağının indüksiyon değerini analiz etmiştir ve çörek otu yağlarının farklı verilere sahip olduğunu saptamıştır.

Yağlı tohumlar farklı fenolik bileşikleri, sağlık üzerindeki etkileri ve duyuşal-besleyici özellikleri nedeniyle gıda ürünlerinde ve endüstriyel uygulamalarında dikkat çekmektedir (Pericin ve ark., 2009). Fenolik bileşikler doğal serbest radikal temizleyiciler olarak bilinir. Çünkü etkili bir antioksidan olarak lipit oksidasyonunu geciktirebilirler (Siger ve ark., 2008). Ramadan (2016), DPPH yöntemiyle çörek otu yağının güçlü bir antioksidan kapasitesine sahip olduğunu tespit etmiştir. Albakry ve ark. (2023), süperkritik akışkanlar ve geleneksel yöntemlerle (soğuk pres ve solvent ekstraksiyonu) elde ettikleri çörek otu ekstraktlarının karşılaştırmışlardır. Süperkritik akışkanlarla elde

edilen ekstraktın, solventle ekstrakte edilmiş ekstraktan daha güçlü DPPH (1,43 mg/mL) temizleme aktivitesine sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

Farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen çörek otu ekstraktlarının peroksit değeri, indüksiyon periyodu, DPPH ve toplam fenolik madde miktarına ait varyans analiz tablosu Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1.Farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen çörek otu ekstraktlarının peroksit değeri, indüksiyon periyodu, DPPH ve toplam fenolik madde miktarına ait varyans analiz tablosu.

Varyans kaynağı	SD	Peroksit değeri (meqO ₂ /Kg)		İndüksiyon Periyodu (Saat)		Serbest radikal süpürücü etki (%)		Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g)	
		KO	Faktör	KO	Faktör	KO	Faktör	KO	Faktör
A	1	1439.88	643.52**	2.73	2.11**	119.51	92.08**	2.74	651.00**
B	2	3118.24	696.82**	14.95	5.77**	392.80	151.32**	0.42	49.63**
A*B	2	4639.24	1036.70**	3.29	1.27**	455.98	175.65**	0.52	61.73**
Hata	12	26.85		15.56		15.58		0.05	
Toplam	17	9224.21		36.53		983.87		3.72	

A, Basınç; B, Sıcaklık; A*B, Basınç*Sıcaklık interaksiyonu *,P<0.05; **, P<0.01; ns, istatistiksel olarak önemli değil.

Farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen çörek otu ekstraktlarının analiz sonuçlarına ait varyans analiz tablosu incelendiğinde; ekstraksiyon işleminde basınç ve sıcaklık farklılığının peroksit değeri, indüksiyon periyodu, serbest radikal süpürücü etki ve toplam fenolik madde miktarı açısından istatistiksel olarak etkili olduğu (p<0.01) görülmektedir. Basınç-Sıcaklık interaksiyonunun ise bütün analiz parametrelerinde istatistiksel olarak p<0.01 seviyesinde etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Çörek otu ekstraksiyonunun basınç farklılığının ele alındığı peroksit değeri, indüksiyon periyodu, DPPH ve toplam fenolik madde miktarı sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları sunulmuştur (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Çörek otu ekstraksiyonunun basınç farklılığının ele alındığı peroksit değeri, indüksiyon periyodu, DPPH ve toplam fenolik madde miktarı sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Varyans kaynağı (Basınç)	SD	Peroksit değeri (meqO ₂ /Kg)	İndüksiyon Periyodu (saat)	Serbest radikal süpürücü etki (%)	Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g)
300 Bar	9	88.23±30,99 ^a	0.95±1,02 ^a	23.78±10,69 ^a	1.64±0,29 ^a
500 Bar	9	70.35±3,5 ^b	1.73±1,79 ^a	18.62±1,52 ^b	0.86±0,20 ^b

** Farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın ifadesidir. **, P<0.01

300 bar ve 500 bar basınç ile elde edilen çörek otu ekstraktlarının TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları incelendiğinde; peroksit değeri (meq O₂/kg yağ), serbest radikal süpürücü etki ve toplam fenolik madde miktarı (mgGAE/g) değerlerini 300 bar da daha yüksek olduğu görülmüştür. İndüksiyon periyodu değerleri açısından basınç farkının sonuçların değişiminde etkili olmadığı görülmüştür.

Çörek otu ekstraksiyonunun sıcaklık farklılığının ele alındığı peroksit değeri, indüksiyon periyodu, DPPH ve toplam fenolik madde miktarı sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları sunulmuştur (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Çörek otu ekstraksiyonunun sıcaklık farklılığının ele alındığı peroksit değeri, indüksiyon periyodu, DPPH ve toplam fenolik madde miktarı sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Varyans kaynağı	SD	Peroksit değeri (meqO ₂ /Kg)	İndüksiyon Periyodu (saat)	Serbest radikal süpürücü etki (%)	Toplam Fenolik Madde Miktarı(mg GAE/g)
45 °C	6	97.64±34,13 ^a	0.70±1,22 ^b	27.74±11,97 ^a	1.04±0,27 ^b
55 °C	6	72.80±2,34 ^b	0.69±0,55 ^b	18.77±1,47 ^b	1.40±0,32 ^a
65 °C	6	67.43±7,13 ^c	2.63±0,26 ^a	17.10±2,50 ^b	1.32±0,70 ^a

** Farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın ifadesidir. **, P<0.01

Farklı sıcaklık parametrelerinden elde edilen ekstraktların sonuçlarına ait ortalamalara göre; peroksit değerinin (meq O₂/kg yağ) 45°C sıcaklıkta en yüksek olduğu, 65°C sıcaklıkta elde edilen ekstraktlara ait ortalama değerlerinin ise en düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde sıcaklık artışının beklenenin aksine peroksit değerini düşürdüğü tespit edilmiştir. Fakat, genel olarak en düşük peroksit değeri bile yüksek seviyededir, şeklinde değerlendirilebilir. Can (2022), farklı ekstraksiyon uygulamaları ile elde ettiği ekstraktların peroksit değeri bakımından en yüksek değeri SCO₂ ekstraktların ortalamalarından tespit ederken, en düşük değeri soxhlet ekstraktlarına ait ortalamalardan tespit etmiştir. İndüksiyon periyodu sonuçlarına göre de 45°C ve 55°C'de elde edilen ekstraktlar istatistiksel olarak yakın bulunmuş, 65°C'de ise bu sonuç en yüksek değere (2.63 saat) ulaşmıştır. Elde edilen ekstraktların serbest radikal süpürücü etkisi ise 45°C'de en yüksek değere (%27.74) ulaşmıştır. 55°C ve 65°C sıcaklıklarda elde edilen ekstraktların indüksiyon periyodu sonuçları ise birbirine benzer çıkmıştır. Üç farklı sıcaklıkta elde edilen ekstraktlardan 45 °C'de alınan örneklerin toplam fenolik madde miktarlarının diğer ikisine göre düşük çıktığı tespit edilmiş olup, bunun yanı sıra 55°C ve 65°C sıcaklık uygulamalarında elde edilen ekstraktların sonuçlarının ise yakın değerlerde olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde; elde edilen

ekstraktlarda, 65 °C de en düşük peroksit değeri elde edilmesi ve bunun yanı sıra, aynı sıcaklıkta en yüksek indüksiyon periyodu sonuçlarının elde edilmesi, 65 °C'nin oksidasyona karşı dayanıklılık açısından elde edilen ürüne diğer sıcaklık uygulamalarına göre olumlu yönde etki yaptığı anlaşılmıştır. Örneklerden elde edilen serbest radikal süpürücü etki sonuçlarının 45 °C de yüksek olması indüksiyon periyodu ve peroksit değeri sonuçlarında ulaştığımız genel değerlendirmeden farklı ve beklenenin tersi yönde bir sonuç elde edilmiştir. Örneklerin toplam fenolik madde miktarı sonuçları ise genel olarak değerlendirildiğinde sıcaklık artışı ile toplam fenolik madde miktarının arttığı, bunun da elde edilen ürünün oksidatif stabilitesinin göstergesi olan peroksit değeri ve indüksiyon periyodu sonuçlarıyla uyumlu olduğu bulunmuştur.

Çörek otu ekstraksiyonun basınç ve sıcaklık farklılığının ele alındığı peroksit değeri, indüksiyon periyodu, serbest radikal süpürücü ve toplam fenolik madde miktarı sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.4.'de ve Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de ise şekil grafikte ortalamalar sunulmuştur.

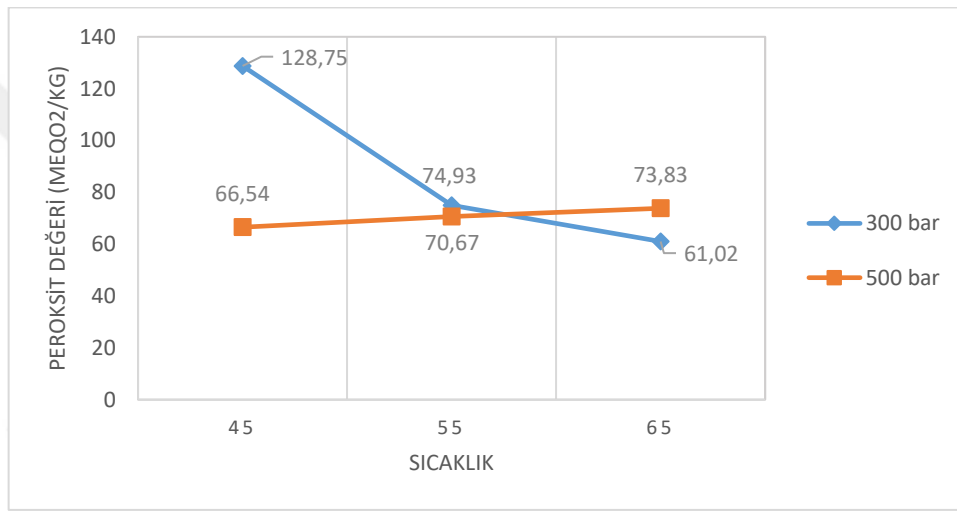
Çizelge 4.4. Çörek otu ekstraksiyonun basınç ve sıcaklık farklılıklarının ele alındığı peroksit değeri, indüksiyon periyodu, DPPH ve toplam fenolik madde miktarı sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları

Varyans kaynağı	SD	Peroksit değeri (meqO ₂ /Kg)	İndüksiyon Periyodu (Saat)	Serbest radikal süpürücü etki (%)	Toplam Fenolik Madde Miktarı(mg GAE/g)
300 bar 45°C	3	128.75±1.29 ^a	0.14±1.01 ^b	37.37±0.01 ^a	1.29±0.01 ^c
300 bar 55°C	3	74.93±0.15 ^b	0.88±0.45 ^{ab}	18.63±1.91 ^b	1.69±0.01 ^b
300 bar 65°C	3	61.02±1.10 ^e	1.81±0.10 ^{ab}	15.33±0.68 ^c	1.95±0.07 ^a
500 bar 45°C	3	66.54±0.07 ^d	1.25±0.02 ^{ab}	18.10±1.91 ^{bc}	0.80±0.02 ^e
500 bar 55°C	3	70.67±2.80 ^c	0.49±0.10 ^{ab}	18.90±1.67 ^b	1.10±0.02 ^d
500 bar 65°C	3	73.83±1.62 ^{bc}	3.44±0.01 ^a	18.86±1.97 ^b	0.69±0.13 ^e

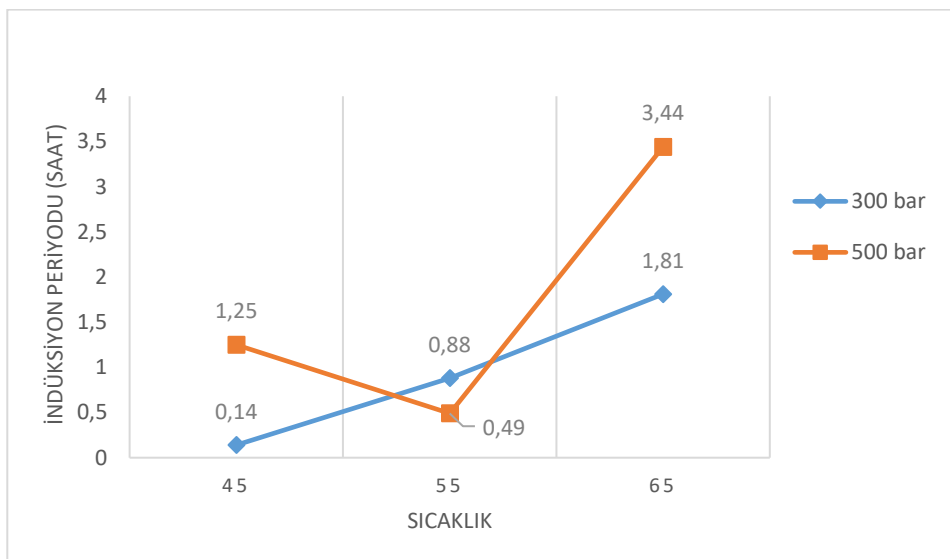
** Farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın ifadesidir. **, P<0.01

Uygulanan ekstraksiyon parametrelerinden elde edilen ekstraktların peroksit değeri, 61,02 meqO₂/Kg ile 128,75 meqO₂/Kg arasında değişim göstermiştir. Peroksit değeri bakımından, ekstraksiyonda 300 bar basınç ve 45°C sıcaklık parametreleriyle elde edilen ekstraktlar en yüksek sonuçları (128,75 meqO₂/kg) verirken, en düşük sonuçlar (61,02 meqO₂/Kg) 300 bar basınç ve 65°C sıcaklıkta elde edilen ekstraktlarda gözlemlenmiştir. Bu açıya göre değerlendirdiğimizde 300 bar basınçtaki sıcaklık arttıkça peroksit değeri azalmış, 500 bar da ise sıcaklık arttıkça peroksit değeri artmıştır. Elde edilen ekstraktların indüksiyon periyodu sonuçları incelendiğinde, 500 bar basınç ve 65°C sıcaklıkta elde edilen ekstraktların en yüksek değere (3,44 saat) ulaştığı, ancak 300 bar basınç altında 45°C sıcaklıkta en düşük seviyede (0.14 saat) olduğu gözlemlenmiştir.

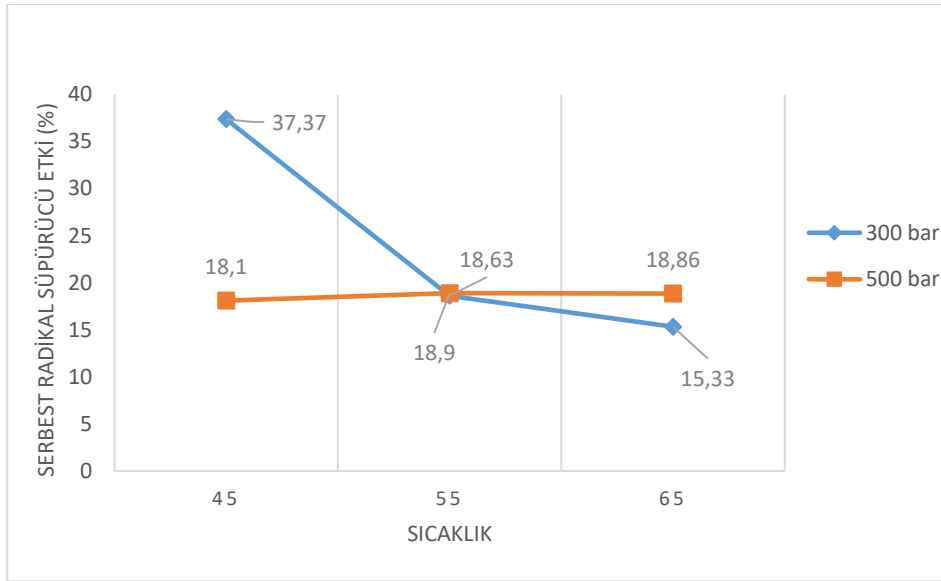
Diğer basınç ve sıcaklık değerlerine ait ürünlerin sonuçları ise birbirine yakın değerler sergilemektedir. Serbest radikal süpürücü etkinin en yüksek (%37.37) olduğu sonuçlar 300 bar basınç ve 45°C sıcaklıkta elde edilen ekstraktlarda elde edilmiştir. Son olarak, toplam fenolik madde miktarı analizinden elde edilen sonuçlarda, 300 bar basınç altında elde edilen ürünlerin değerleri birbirine yakınken, 500 bar basınç altında elde edilen ürünlerden de benzer değerler elde edilmiştir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde; elde edilen ekstraktlarda, 500 bar basınç ve 65 °C de en yüksek indüksiyon derecesi vermesi dikkat çekicidir. Bu durumda ekstrakte edilen fenoliklerin düşük olduğu fakat antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.



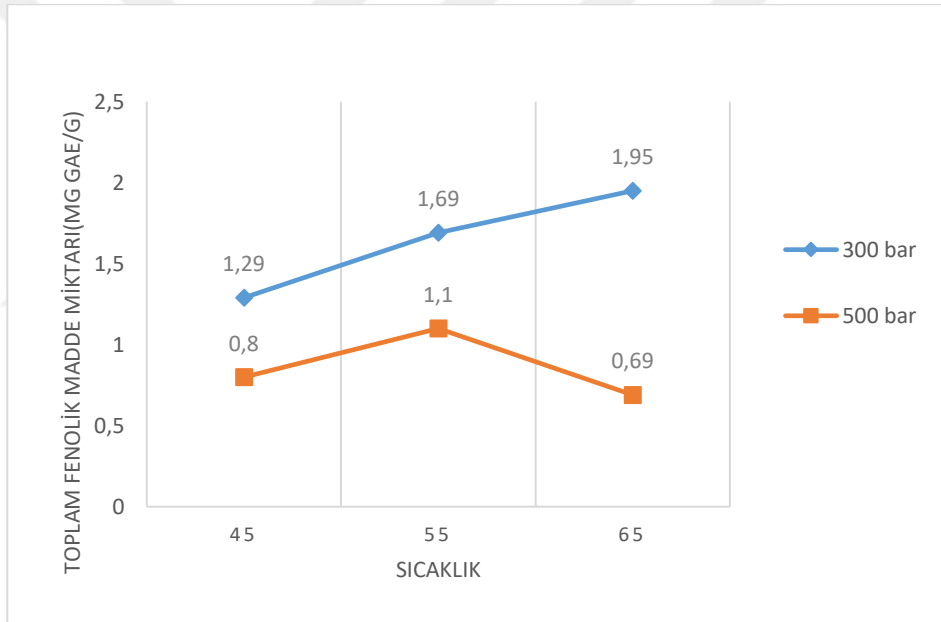
Şekil 4.1. SCO₂ farklı ekstraksiyon parametrelerinden elde edilen ekstraktlardaki peroksit değeri (meqO₂/Kg) içeriklerine ait sonuçların ortalamaları



Şekil 4.2. SCO₂ farklı ekstraksiyon parametrelerinden elde edilen ekstraktlardaki indüksiyon değeri (saat) içeriklerine ait sonuçların ortalamaları



Şekil 4.3. SCO_2 farklı ekstraksiyon parametrelerinden elde edilen ekstraktlardaki serbest radikal süpürücü etki (%) içeriklerine ait sonuçların ortalamaları



Şekil 4.4. SCO_2 farklı ekstraksiyon parametrelerinden elde edilen ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g) içeriklerine ait sonuçların ortalamaları

Oksidatif stabilite, yağın kalitesini değerlendirmek ve oksidasyon sürecine karşı direncini belirlemek amacıyla kullanılan önemli parametrelerden biridir (Symoniuk ve ark., 2018). Yağın depolanması veya ısıl işlem sırasında doymamış yağ asitleri ile oksidasyon meydana gelerek bunların bozulmasına neden olmaktadır (Ferrari ve Souza, 2009). Soğuk presleme yöntemiyle elde edilen yağlar, triaçilgliserollerin yanı sıra lipide eşlik eden çeşitli bileşikler de içermektedir. Bu nedenle, yağın stabilitesi, sadece yağ asitlerinin bileşimine değil, aynı zamanda oksidasyon sürecini etkileyen antioksidanların,

birincil ve ikincil oksidasyon ürünlerinin, metallerin ve diğer kirleticilerin içeriğine de bağlıdır (Landers ve Rathmann, 1981; Choe ve Min, 2006; Ferrari ve Souza, 2009; de Lira ve ark., 2010; Szterk ve ark., 2010; Górnas ve ark., 2014).

Kirilan ve ark. (2016), soğuk presle elde edilen çörek otu yağını, ayçiçek yağı ile %5, %10 ve %20 oranlarında karıştırmışlardır. 30 gr'lık yağ numuneleri 16 gün boyunca 60°C sıcaklığa ayarlanmış basınçlı çekişli hava fırınında depolamışlardır. Oksidasyon değişimini 2 günlük aralıklarla hesaplamışlardır ve artan değerler elde etmişlerdir. Bayrak (2007), ayçiçek yağının oksidasyon stabilitesi üzerine çeşitli tohum ekstraktlarının etkisi incelemiştir. Çalışmada keten, kişniş, ısırganotu ve çörek otu tohumlarının alkol ekstraktları ile kişniş ve çörek otu tohumlarının uçucu yağları, rafine ayçiçek yağına 500, 1000, 2000 ppm dozlarında ilave edilmiştir. Fırın testi için 60°C sıcaklıkta 2 günlük aralıklarla 14 gün boyunca yağlardaki oksidatif değişim incelemiştir. 500 ve 1000 ppm konsantrasyonunda kullanılan çörek otu ekstraktlarının, kontrol örneğine göre oldukça düşük peroksit sayısı değerleri gösterdiği tespit edilmiştir.

SCO₂ ekstraksiyonu ile elde edilen farklı parametrelerdeki ekstraktların fırın testi ile stabilitesini değerlendiren analizlere ait varyans analiz tablosu Çizelge 4.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. SCO₂ ekstraksiyonu ile elde edilen farklı parametrelerdeki %5 çörek otu yağı ekstraktlarının fırın testi ile stabilitesini değerlendiren analizlere ait varyans tablosu

Varyans kaynağı	SD	Peroksit değeri (meqO ₂ /Kg)	
		KO	Faktör
Günler	3	6069396	1135766.84**
Basınç	1	3029	1700.68**
Sıcaklık	2	5546	1556.77**
Günler*Basınç	3	3504	655.70**
Günler*Sıcaklık	6	17669	1653.21**
Basınç*Sıcaklık	2	2594	728.21**
Günler*Basınç*Sıcaklık	6	509	47.61**
Error	48	86	
Total	71	6102333	

** Farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın ifadesidir. **, P<0.01

SCO₂ ekstraksiyonu ile elde edilen farklı parametrelerdeki %5 çörek otu ekstraktlarının ayçiçek yağıyla tamamlanarak stabilitesini değerlendiren fırın testi gerçekleştirilmiştir. Analizlere ait varyans analiz tablosundaki veriler incelendiğinde peroksit değeri bakımından ekstraksiyon farklılıkları, depolama süreleri ve ekstraksiyon farklılıklarına ait x depolama sürelerinin interaksiyon değerlerinin istatistiksel olarak değerli olduğu (p<0.01) gözlemlenmiştir.

SCO₂ ekstraksiyonu ile elde %5 çörek otu yağı ekstraktlarının fırın testi ile stabilitesini değerlendiren analizlere ait ortalamaların yer aldığı hammadde farklılığı x depolama süresi interaksyonu sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları sunulmuştur (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. SCO₂ ekstraksiyonu ile elde %5 çörek otu ekstraktlarının fırın testi ile stabilitesini değerlendiren analizlere ait ortalamaların yer aldığı hammadde farklılığı x depolama süresi interaksyonu

SCO ₂ Ekstraksiyonu Parametreleri x Süre (Gün) İnteraksiyonu	60°C'de Depolama (Gün)	Peroksit değeri (meq O ₂ /Kg)
300 bar - 45°C	1.Gün	40.77 ^a
	7.Gün	91.25 ^l
	14.Gün	215.81 ^h
	21.Gün	749.55 ^d
300 bar - 55°C	1.Gün	35.66 ^r
	7.Gün	86.70 ^m
	14.Gün	190.43 ^j
	21.Gün	742.47 ^e
300 bar - 65°C	1.Gün	48.14 ^p
	7.Gün	93.46 ^l
	14.Gün	198.64 ⁱ
	21.Gün	812.18 ^b
500 bar - 45°C	1.Gün	31.18 ^s
	7.Gün	79.53 ⁿ
	14.Gün	240.12 ^f
	21.Gün	741.75 ^e
500 bar - 55°C	1.Gün	56.08 ^o
	7.Gün	114.23 ^k
	14.Gün	240.12 ^f
	21.Gün	756.97 ^c
500 bar - 65°C	1.Gün	42.68 ^q
	7.Gün	93.00 ^l
	14.Gün	234.64 ^g
	21.Gün	829.95 ^a

** Farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın ifadesidir. **, P<0.01

Uygulanan ekstraksiyon parametrelerinden elde edilen ekstraktların %5 miktarında ayçiçek yağına eklenerek yapılan fırın testi sonuçlarına göre en düşük değer 500 bar basınçta, 45°C sıcaklıkta (31.18 meqO₂/kg) elde edilen karışımın 1. gününe ait analizde gözlemlenir iken en yüksek değer ise 500 bar basınçta, 65°C sıcaklıkta (829.95 meqO₂/kg) elde edilen karışımın 21. güne ait olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizlerin tamamında belirlenen basınç ve sıcaklık değerlerine göre karışımlara ait analiz verilerinde 14. gün sonunda hepsinde ciddi bir artış gözlemlenmiştir.

"Lipid" terimi, bazen yağlarla eşanlamlı olarak kullanılsa da bunlar trigliseridler adı verilen lipidlerin bir alt grubunu oluşturur. Lipidler, doymuş veya doymamış yağ asitleri gibi molekülleri içerir. Beslenme açısından önemli olan ve kolestrolü azaltma

yeteneğine sahip oleik asit gibi doymuş yağ asitleri, kan basıncı ve vasküler hastalık riskini azaltmada, linoleik asit (omega 6) ve linolenik asit (omega 3) gibi çoklu doymamış yağ asitleri etkilidir (Simopoulos, 2008). Özellikle, çoklu doymamış yağ asitleri memelilerde biyolojik fonksiyonları sürdürmek için oldukça önemlidir. Günümüzde, insanlar ve birçok diğer hayvanın vücutlarında bulunan şekerlerden monounsaturated yağ asitleri elde edebildiği ancak $\Delta 12$ -desaturaz enzimi eksikliği nedeniyle oleik asidi linoleik ve linolenik aside çeviremediği açıkça kabul edilmektedir. Bu tür yağ asitlerine esansiyel yağ asitleri denir (Ruxton ve diğerleri, 2005; Lin, 2006; Hennessy, 2009; Calder ve Yaqoob, 2009 ; Tvzicka ve diğerleri, 2011;).

Solati ve ark. (2012) yaptığı çalışma SCO_2 ekstraksiyonu ile elde ettiği ekstraktların yağ içindeki başlıca yağ asidi, sırasıyla linoleik asit (%60.74), oleik (%23.21) ve palmitik asit (%12.53) olmuştur. Tunus ve İran *N. sativa L.* hegzan ekstraktı, Cheikh-Rouhou ve ark. çalışmasında sırasıyla linoleik içeriği 50.31 ve 49.15 g/100 g ekstrakt, oleik içeriği 25 ve 23.7 g/100 g ekstrakt, palmitik içeriği ise 17.2 ve 18.4 g/100 g ekstrakt olarak gösterilmiştir. Bassim Atta'nın (2003) çalışmasına göre, linoleik içerik sırasıyla soğuk preslenmiş ve çözücü ekstrakte edilmiş yağ için %47.5 ve %49, oleik içerik %18.9 ve %20.1, palmitik içerik ise %12.1 ve %9.9 olarak bulunmuştur. Khoddami ve ark. (2011) çalışmasında linoleik, oleik ve palmitik içerikler sırasıyla %56.71, %21.55 ve %14.11 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçtan açıkça görülmektedir ki, *N. sativa L.* tohum yağı oldukça doymamış bir yağdır ve tüketimi insan sağlığı için faydalı olabilir. Süleymanifar ve ark. (2018), çörek otu yağının yağ asidi bileşimini %79'dan fazlası doymamış yağ asidi olarak bulmuşlardır; bunların arasında en yüksek miktarda yağ asidi linoleik asit ve oleik asitten olduğu bilinmektedir. Çörek otu yağının (%18,59) doymuş yağ asitleri esas olarak palmitik asit (%8,38) ve stearik asit (%2,26) olarak tespit etmişlerdir.

Farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen çörek otu yağı numunelerinin yağ asidi kompozisyon sonuçları (%) olarak Çizerge 4.7. da verilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen çörek otu yağı numunelerinin yağ asidi kompozisyon sonuçları (%).

Yağ Asitleri	300 bar			500 bar		
	45°C	55°C	65°C	45°C	55°C	65°C
Tridekanoik asit (C13:0)	T.E	13.16	0.51	T.E	T.E	T.E
Pentadesenoik asit (C15:1 cis-10)	1.12	T.E	T.E	0.74	0.35	0.30
Palmitik asit (C16:0)	26.01	11.68	12.74	19.33	16.52	15.89
Palmitoleik asit (C16:1 Δ ⁹)	T.E	11.77	0.57	T.E	T.E	0.27
Heptadekanoik asit (C17:0)	T.E	12.29	0.54	T.E	T.E	T.E
Heptadekanoik asit (C17:1 cis-10)	T.E	T.E	0.57	T.E	T.E	T.E
Stearik asit (C18:0)	3.41	T.E	3.46	3.46	3.29	3.34
Oleik asit (C18:1n9c)	19,14	T.E	23.59	23.32	24.62	23.52
Elaidik asit (C18:1n9t)	T.E	T.E	T.E	0.32	0.33	T.E
Vaksenikk asit (C18:1n7)	1,21	16.59	T.E	T.E	T.E	T.E
Linoleik asit (C18:2n6c)	49,11	34.51	58.02	52.83	54.33	56.08
Araşidik asit (C20:0)	T.E	T.E	T.E	T.E	0.56	T.E
Eikosenoik asit (C20:1n9)	T.E	T.E	T.E	T.E	T.E	0.60

T.E.: Tespit edilememiştir.

Farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen çörek otu yağı numuneleri incelendiğinde; Palmitik asit ve Linoleik asit bütün numunelerde tespit edilirken, miktarları farklılık göstermektedir. Numunelerin palmitik asit (C16:0) oranı, %11.68- %25.45 arasında bulunmuştur. En yüksek oran 300 bar basınçta ve 45°C sıcaklıktaki elde edilen çörek otu yağında olduğu gözlemlenmiştir. Numunelerin linoleik asit (C18:2n6c) içeriğinin %34.50- %58.08 arasında değiştiği gözlemlenirken, 300 bar basınç ve 55°C sıcaklıktaki numunede düşük miktarda linoleik asit %34.50 tespit edilmiştir. Örneklerin oleik asit içeriği ise %19,14-23.99 değerlerinin arasında değiştiği görülmüştür. 300 bar basınç ve 55°C sıcaklıktaki örnekde tespit edilememiştir.

Palmitoleik asit (C16:1 Δ⁹) yüzdesinde üç numunede (300 bar-55°C, 300 bar-65°C ve 500 bar-65°C) olduğu gözlemlenirken, en yüksek değerdeki (300 bar-55°C) numune %11.77 bulunmuştur. Tridekanoik asit (C13:0) 300 bar basınç ve 55°C sıcaklıkta %13.16 bulunurken, 300 bar basınç ve 65°C sıcaklıkta %0.51 tespit edilmiştir. Tridekanoik asit (C13:0) diğer numunelerde tespit edilememiştir. Pentadesenoik asit (C15:1 cis-10) %0.30-1.12 aralığında gözlemlenirken, 300 bar basınç ve 55°C sıcaklık ile 300 bar basınç ve 65°C sıcaklıkta tespit edilememiştir. Heptadekanoik asit (C17:0) 300 bar basınç ve 55°C sıcaklık %12.29 ve 300 bar basınç ve 65°C sıcaklıkta %0.54 tespit edilmiştir. Diğer numunelerde tespit edilememiştir. Heptadekanoik asit (C17:1 cis-10) sadece 300 bar basınç ve 65°C sıcaklıkta (%0.57) tespit edilmiştir. Stearik asit (C18:0) %3.46-3.29 aralığında bulunurken, 300 bar basınç ve 55°C sıcaklıkta tespit edilememiştir. Elaidik asit (C18:1n9t) 500 bar basınç ve 45°C sıcaklık, 500 bar basınç ve 55°C sıcaklıkta sırasıyla %0.32 ve %33 tespit edilmiştir. Diğer numunelerde tespit edilememiştir. Vaksenik asit (C18:1n7) 300 bar basınç ve 45°C sıcaklık (%1.21), 300 bar basınç ve 55°C sıcaklıkta (%16.59) tespit edilmiştir. Araşidik asit (C20:0) 500 bar basınç ve 55°C sıcaklıkta %0.56 ve eikosenoik asit (C20:1n9) 500 bar basınç ve 65°C sıcaklıkta %0.60 tespit edilirken, diğer numunelerde tespit edilememiştir.

Sonuç olarak farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen çörek otu yağı numuneleri, doymamış yağ asitleri linoleik asit (%34.50-58.02) ve oleik asit (%19.14-24.62) ana doymuş yağ asidi ise palmitik asit (%11.68-26.01) olarak belirlenmiştir.

TK çörek otunda bulunan önemli antioksidan etkiye sahip olan aktif bir bileşiktir (Padhye ve ark., 2008). TK hidrofobik bir molekül olduğundan dolayı yağ içerisinde çözünmektedir. Asidik ortamda stabil olduğu tespit edilmiştir (Sicker ve ark., 2019). Rao ve ark. (2007), farklı basınç (100 bar,200 bar,300 bar ve 400bar) ve sıcaklıklarda (40°C,50 °C,60°C ve 70°C) yaptıkları ekstraksiyon çalışmasında en yüksek TK verinini 40°C

sıcaklıkta ve 300bar basınçta elde ettiklerini bildirmişlerdir. Gurgenova ve Wawrzyniak (2012), SCO₂ yöntemini kullanarak 6 farklı çörek otu ekstraktı elde etmişlerdir. Bu örneklerden en iyi TK verimi, 300 bar basınç ve 45°C sıcaklık kombinasyonunda elde etmişlerdir. Aynı çaişmada 500 bar basınç ve 55°C sıcaklık kombinasyonu yine en çok TK verimini sağlayan uygulamalardan biri olarak bildirilmiştir. Solati ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada çörek otundan SCO₂ yöntemiyle 150 bar, 250 bar ve 350 bar basınç altında, 40°C, 50°C ve 60°C sıcaklıkta, 60, 90, 120 dakika süreyle ekstraktlar elde etmişlerdir. TK içerikleri bakımından birçoğunda yakın veriler elde etmiş olmakla birlikte en yüksek TK içeriğini (4,09 mg/g yağ), 150 bar, 40 °C'de 120 dakika süreyle uyguladıkları SCO₂ ekstraksiyon koşulunda elde ettiklerini bildirmişlerdir. Salea ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada basınç farklılığı (150, 200 ve 250), sıcaklık farklılığı (40, 50°C ve 60°C) ile CO₂ akış hızı farkı (10, 15 ve 20 gpm) parametrelerindeki değişimleri soksheletle hekzan ekstraksiyonu, metanol (%96'lık) ve ayrıca yüksek basınçlı sokshelet CO₂ ekstraksiyonu ile çörek otunun ekstraktındaki farklılıkları karşılaştırmışlardır. 150 bar basınç, 60°C sıcaklık ve 20 gpm CO₂ akış hızı şartlarında maksimum TK verimi (20,8 mg/g yağ) aldıklarını bildirmişlerdir. Salea ve ark. (2013) yapmış olduğu çalışma ile Solati ve ark. (2012)'nin yapmış oldukları çalışmalar birbirine benzer parametrelerde uygulanmış görünmesine rağmen maksimum TK verimi yaklaşık 5 kat farklılık göstermiştir. Bu farklılığın deney koşullarındaki küçük farklılıklardan etkilenebileceği de düşünülmüş olup, kullanılan çörek otu örneğinin çeşit ve yetiştirme şartları ve iklimsel farklılıklarda da etkilenebileceği düşünülmüştür.

SCO₂ ekstraksiyonu parametreleri ile elde edilen ekstraktlardaki TK (mg/gr ekstrakt) içeriklerine ait varyans analiz tablosu verilmiştir (Çizelge 4.8.).

Çizelge 4.8. SCO₂ ekstraksiyonu parametreleri ile elde edilen ekstraktlardaki timokinon (mg/gr ekstrakt) içeriklerine ait varyans analiz tablosu

Varyans kaynağı	SD	Timokinon (mg/gr ekstrakt)	
		KO	Faktör
A	1	2.73	2.11**
B	2	14.95	5.77**
A*B	2	3.29	1.27**
Error	12	15.56	
Total	17	36.53	

A, Basınç; B, Sıcaklık; A*B, Basınç*Sıcaklık interaksyonu *,P<0.05; **, P<0.01; ns, istatistiksel olarak önemlidenil.

Analiz sonuçlarında elde edilen çörek otu ekstraktlarının TK içeriklerine ait verilerin istatistiksel olarak önemli olduğu (p<0.01) gözlemlenmiştir.

Çörek otu ekstraksiyonunun basınç farklılığının ele alındığı TK sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.9.'de sunulmuştur

Çizelge 4.9.Farklı basınçta elde edilen çörek otu ekstraktlardaki timokinon (mg/gr ekstrakt) içeriklerine ait sonuçların ortalamaları

Varyans kaynağı	SD	Timokinon (mg/gr ekstrakt)
300 bar	9	59.21±25.62 ^a
500 bar	9	37.38±5.96 ^b

** Farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın ifadesidir. **, P<0.01

TK (mg/gr ekstrakt) bakımından SCO₂ ekstraksiyonu ile farklı basınçlar altında elde edilen ekstraktlar incelendiğinde 300 bar basınç da elde edilen ekstraktların TK miktarının 500 bar basınç elde edilen ekstraktlara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çörek otu ekstraksiyonunun sıcaklık farklılığının ele alındığı TK sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.10.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. Farklı sıcaklıkta elde edilen çörek otu ekstraktlardaki timokinon (mg/gr ekstrakt) içeriklerine ait sonuçların ortalamaları

Varyans kaynağı	SD	Timokinon (mg/gr ekstrakt)
45 °C	6	63.67±29.03 ^a
55 °C	6	50.29±6.51 ^b
65 °C	6	30.92±0.38 ^c

** Farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın ifadesidir. **, P<0.01

Çizelge 4.10. de SCO₂ ekstraksiyonu ve farklı sıcaklık değerleri ile elde edilen TK (mg/gr ekstrakt) verileri bakımından ekstraktlar incelendiğinde 45°C sıcaklıkta elde edilen ekstraktların TK miktarının diğer sıcaklık değerlerine kıyasla yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük değer ise 65°C sıcaklıkta olduğu tespit edilmiştir. Sıcaklıklarına göre değerlendirdiğimizde sıcaklık arttıkça TK miktarında azalma olduğu gözlemlenmiştir.

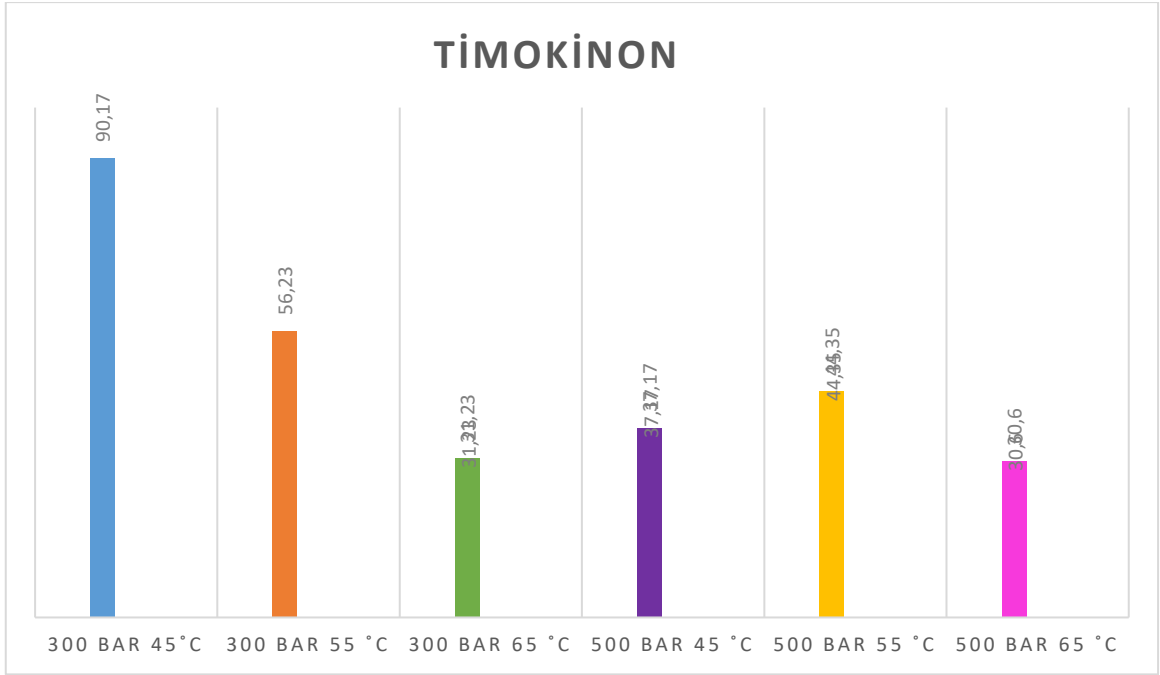
Çörek otu ekstraksiyonunun sıcaklık-basınç farklılığının ele alındığı TK sonuçlarının ortalamalarına ait TUKEY Çoklu Karşılaştırma Testi sonuçları Çizelge 4.11.'de ve Şekil 4.5.'de ise şekil grafikte ortalamalar sunulmuştur.

Çizelge 4.11. Farklı sıcaklık ve basınç parametreleri ile elde edilen çörek otu ekstraktlarındaki timokinon (mg/gr ekstrakt) verilerine ait sonuçların ortalamaları

Varyans kaynağı	SD	Timokinon (mg/gr ekstrakt)
300 bar 45 °C	3	90.17±0.12 ^a
300 bar 55 °C	3	56.23±0.10 ^b
300 bar 65 °C	3	31.23±0.22 ^c
500 bar 45 °C	3	37.17±0.14 ^d
500 bar 55 °C	3	44.35±0.04 ^e
500 bar 65 °C	3	30.60±0.13 ^f

** Farklı harfler istatistiksel olarak farklılığın ifadesidir. **, P<0.01

Çizelge 4.11. te SCO_2 ekstraksiyonu elde edilen ekstraktların TK (mg/gr ekstrakt) verileri bakımından incelendiğinde en yüksek değerin 300 bar basınç altında 45°C sıcaklıkta üretilen ekstrakta olduğunu saptanmıştır. En düşük değerin ise 500 bar basınç altında 65°C sıcaklıkta olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde basınç değişimi ile 300 bar da sıcaklık artışı ile azalan TK miktarı, 500 bar da 55°C sıcaklıkta diğer iki sıcaklığa göre yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.5. SCO_2 farklı ekstraksiyon parametrelerinden elde edilen ekstraktlardaki timokinin (mg/gr ekstrakt) içeriklerine ait sonuçların ortalamaları

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Tez çalışmasında çörek otu tohumu kullanılarak yapısındaki önemli bileşen olan timokinonun farklı SCO₂ ekstraksiyon parametreleriyle ekstraksiyonuyla ortaya çıkan ekstraktların peroksit değeri, indüksiyon periyodu, serbest radikal süpürücü, toplam fenolik madde miktarı ve yağ asitleri kompozisyonlarının özellikleri kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

- SCO₂ ekstraksiyonu ile farklı sıcaklık basınç parametreleri uygulamaları ile alınan ürünler değerlendirildiğinde, TK (mg/gr ekstrakt) içeriği en yüksek 300 bar basınç ve 45°C'deki ürünlerin olduğu tespit edilmiştir. En düşük TK değeri 500 bar basınç ve 65°C'de olduğu gözlemlenmiştir.
- Ekstratların yağ asidi kompozisyonu incelendiğinde Palmitik asit ve Linoleik asit ekstrakt numunelerinin tümünde tespit edilirken, miktarlarında farklılıklar gözlemlenmiştir. 300 bar basınç ve 55°C sıcaklıktaki numunede düşük miktarda linoleik asit %34.50 tespit edilmiştir. Örneklerin oleik asit içeriği 300 bar basınç ve 55°C sıcaklıktaki numune haricinde tespit edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen numunelerin verileri incelendiğinde serbest yağ asitliği, peroksit ve indüksiyon periyodu, toplam fenolik madde miktarı ve serbest radikal süpürücü etki kapsamında farklılıklar mevcut olup, bu durum beklenen bir netice olmakla birlikte, ekstratlardan elde edilen yağlar ise yağ asidi bileşimi bakımından birbirinden farklılık göstermiştir. Yağ asidi bileşimindeki değişiklikliğin ekstraktların farklı parametrelerden elde edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.
- 500 bar basınç ve 65 °C sıcaklıkta elde edilen ekstratın düşük peroksit değeri elde edilmesi, aynı sıcaklıkta en yüksek indüksiyon periyodu sonuçlarının gözlemlenmesi, 500 bar ve 65 °C'nin oksidasyona karşı dayanıklılık açısından elde edilen ekstratın diğer basınç ve sıcaklık parametrelerine göre olumlu yönde etki yaptığı anlaşılmıştır.
- 300 bar ve 45 °C' de elde edilen ekstratın antioksidan aktivitesi diğer ekstraktlara göre daha yüksek çıkmıştır. Aynı basınç ve sıcaklık değerinde timokinon değeri de en yüksek tespit edilmiştir. Bu da timokinonun antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

5.2 Öneriler

Tıbbi aromatik bitkiler arasında yer alan çörek otunun en önemli bileşği olan timokinonun elde edilmesinde kullanılan SCO₂ yönteminde farklı parametreler kullanılarak daha fazla çalışma yapılmalıdır. Çünkü literatür bilgilerini incelendiğinde çörek otundaki timokinon ekstraksiyon ile elde edilebilir miktarının artırılması çalışmaları mevcut olup, doğal bitkisel bileşen olarak daha etkin elde ediliş metotlarının belirlenmesinin sağlık problemlerinde kullanımı açısından bu biyoaktif bileşenin değerlendirilme kabiliyetleri artmış olacaktır.

Özellikle 300 bar basınç ve 45°C’de ve 500 bar basınç ve 55°C’de farklı sürede ve CO₂ akış hızı denene bilir ve bu parametreler daha da detaylandırılabilir.



6. KAYNAKLAR

- Ahmad, T., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gull, A., 2019, Supercritical fluid extraction: A review. *J. Biol. Chem. Chron*, 5(1), 114-122.
- Akanda M. J. H., Sarker M. Z. I., Ferdosh S., Manap M. Y. A., Rahman N. N. N. A., and Kadir M. O. A., 2012, Applications of supercritical fluid extraction (SFE) of palm oil and oil from natural sources, *Molecules* 17, no. 2, 1764–1794.
- Akinlua, A., Torto, N. & Ajayi, T. R., 2008, Supercritical fluid extraction of aliphatic hydrocarbons from Niger Delta sedimentary rock, *J. Supercrit. Fluids*, 45(1), 57–63
- Albakry, Z., Karrar, E., Mohamed Ahmed, I. A., Ali, A. A., Al-Maqtari, Q. A., Zhang, H., ... & Wang, X., 2023, A comparative study of black cumin seed (*Nigella sativa* L.) oils extracted with supercritical fluids and conventional extraction methods. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2429-2441.
- Al-Haj, N. A., Shamsudin, M. N., Alipiah, N. M., Zamri, H. F., Ahmad, B., Siddig, I., & Rasedee, A., 2010, Characterization of *Nigella sativa* L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5(1), 52-57.
- Al-Saleh, I., Billedo, G. ve El-Doush, I. I., 2006, Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds, *J Food Compos Anal.*, 19, 167–175.
- Ali, BH ve Blunden, G., 2003, *Nigella sativa*'nın farmakolojik ve toksikolojik özellikleri, Fitoterapi Araştırması: Doğal ürün türevlerinin farmakolojik ve toksikolojik değerlendirmesine adanmış uluslararası bir dergi, 17 (4), 299-305.
- Amin, B., & Hosseinzadeh, H., 2016, Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta medica*, 82(01/02), 8-16.
- Anonim, 2023a. <http://www.biologyreference.com/Re-Se/Secondary-Metabolites-in-Plants.html>
- Anonim, 2023b. https://en.wikipedia.org/wiki/Nigella_sativa
- Anonymous, 2006, Official methods and recommended practices of the American. American Oil Chemists' Society, Fourth Edition, Methods: Cd8-53, Ch5-91 and Cd 12b, 92.
- Arslan, N., Baydar, H., Kızıl, S., Karık, Ü., Şekeroğlu, N., & Gümüştü, A., 2015, Tibbi aromatik bitkiler üretiminde değişimler ve yeni arayışlar. Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi, 12, 16.

- Bendre, A. M. (2010). A Text Book of Practical Botany-1 (Vol. 1). Rastogi Publications.
- Benkaci-Ali F, Baaliouamer, A, Meklati BY, Chemat F., 2007, Chemical composition of seed essential oils from Algerian *Nigella sativa* extracted by microwave and hydrodistillation. *Flavour Frag. J.* 22: 148-153.
- Boskabady, MH, Shirmohammadi, B., Jandaghi, P. ve Kiani, S., 2004, *Nigella sativa*'dan elde edilen sulu ve yumuşatılmış ekstraktların kobay trakeal zincirleri üzerindeki gevşetici etkisi için olası mekanizmalar, *BMC farmakolojisi*, 4, 1-6.
- Can, O, 2022, Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin çörekotu (*Nigella sativa L.*) yağının timokinon içeriği ve bazı kalite parametreleri üzerine etkisi (Doctoral dissertation, Necmettin Erbakan University (Turkey)).
- Cavero S., Garc'ía-Risco M., Mar'ın F., Jaime L., Santoyo S., Señor'ans F., Reglero G., Ibañez E., 2006, Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano: chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays, *J Supercrit Fluid*, 38(1), 62–9.
- Cheikh-Rouhou, S., Besbes, S., Hentati, B., Blecker, C., Deroanne, C., & Attia, H., 2007, *Nigella sativa L.*: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*, 101(2), 673–681.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G., 2000, Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24, 1250-1319.
- Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H. & Parajó, J. C., 2006, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2441–2469
- Ebinger, K. & Weller, H. N., 2014, Comparative assessment of achiral stationary phases for high throughput analysis in supercritical fluid chromatography. *J Chromatogr A*, 1332, 73-81.
- Edris, A.E., 2021, Timokinon: kimya ve işlevsellik. Çörek Otu (*Nigella sativa*) Tohumları: Kimya, Teknoloji, İşlevsellik ve Uygulamalar, 81-95.
- El-Dakhkny, M., 1963, Studies on the chemical constitution of Egyptian *Nigella sativa L.* seeds. II) The essential oil. *Planta Medica*, 11(4), 465-470.
- El-Tahir, K. E. ve Bakeet, D. M., 2006, Theblackseed *Nigella sativa* Linnaeus-aminefor multi cures: a Plea for urgent clinical evaluation of its volatile oil. *J.TaibahUniv. Med. Sci.*1, 1–19.
- Fadishei M, Ghasemzadeh Rahbardar M, Imenshahidi M ve diğerleri 2020, *Nigella sativa* yağı ve timokinonun sıçanlarda bisfenol A'nın neden olduğu metabolik bozukluğa karşı etkileri. *Fitother Res* 35:2005–2024.
- Fennema, O. R., 1976, Principles of Food Science, Part 1, *Food chemistry*, Marcel Dekker Inc.

- Ghosheh, O., Houdi, A. ve Crooks, P., 1999, High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *J Pharm Biomed Anal.*, 19(5), 757–762.
- Güzelsoy, P., Aydın, S., & Başaran, N., 2018, Çörek otunun (*Nigella sativa* L.) aktif bileşeni timokinonun insan sağlığı üzerine olası etkileri. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, 7(2), 118-135.
- Kabir, Y., Akasaka-Hashimoto, Y., Kubota, K., & Komai, M., 2020, Volatile compounds of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds cultivated in Bangladesh and India. *Heliyon*, 6(10).
- Kiralan, M., Özkan, G., Bayrak, A., & Ramadan, M. F., 2014, Physicochemical properties and stability of black cumin (*Nigella sativa*) seed oil as affected by different extraction methods. *Industrial crops and products*, 57, 52-58.
- Laird, S. A., & Pierce, A. R., 2002, Promoting sustainable and ethical botanicals: strategies to improve commercial raw material sourcing. Rainforest Alliance.
- Magner, L. N., 2002, *The Rise of Experimental Biology: An Illustrated History*.
- M. McHugh, V. 1994, Krukoniş, *Supercritical Fluid Extraction: Principles and Practice*, 2 ed., Butterworth-Heinemann, United States of America.
- Nickavar B, Mojab F, Javidni K, Amoli MAR, 2003, Chemical Composition of the Fixed and Volatile Oils of *Nigella Sativa* L. from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58 (9), 629-631.
- Norsharina I., Maznah I., Latiffah A.L., Musalmah M., Abdalbasit A.M., 2008, Black Cumin Seed (*Nigella sativa* Linn.) Oil and its Fractions Protect against Beta Amyloid Peptide-Induced Toxicity in Primary Cerebellar Granule Neurons. *J Food lipids*. 15(4). DOI: 10.1111/j.1745-4522.2008.00137
- Islam, M. T., Sultana, N., Riaz, T. A., Ferdous, J., Guha, B., Mohagon, S., Mutsuddy, R., Santos, J. V. O., Reis, A. C., Braga, A. L., Cerqueira, G. S., Menezes, A. P. M., ve Melo- Cavalcante, A. A. C., 2016, Thymoquinone is knocking at the door of clinical trial, *International Archives of Medicine Section: Toxicology and Therapeutics*, 9, 122.
- Oubannin, S., Bijla, L., Gagour, J., Hajir, J., Aabd, N. A., Salama, M. A., & Gharby, S., 2022, A comparative evaluation of proximate composition, elemental profiling and oil physicochemical properties of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds and argan (*Argania spinosa* L. Skeels) kernels. *Chemical Data Collections*, 41, 100920.
- Padhye, S., Banerjee, S., Ahmad, A., Mohammad, R. ve Sarkar, F. H., 2008, From here to eternity the secret of Pharaohs: therapeutic potential of black cumin seeds and beyond, *Cancer Ther*, 6, 495-510.
- Parry, J., Su, L., Luther, M., Zhou, K., Yurawecz, M. P., Whittaker, P. ve Yu, L., 2005, Fatty Acid Composition and Antioxidant Properties of Cold-Pressed Marionberry,

- Boysenberry, Red Raspberry, and Blueberry Seed Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (3), 566-573.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K., 2015, Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.
- Salama, R. H., 2010, Clinical and therapeutic trials of *Nigella sativa*, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 9(5).
- Sarah, B., 2001, Fruits of the Earth. *Resurgence*, 205, 14-15.
- Seçmen Ö., Gemici, Y., Görk. G., Bekat, L. Ve Leblebici E., 2000, Tohumlu Bitkiler Sistematığı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116. İzmir.
- Shah, S. ve Kasturi, S. R., 2003, Study on antioxidant and antimicrobial properties of black cumin (*Nigella sativa* Linn), *Journal Food Science Technology-Mysore* 40, 70-73.
- Singh, R. P., Chidambara, K. N., Jayaprakasha, G. K., 2002, Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 81- 87.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin– Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152– 178.
- Spilimbergo, S. & Bertucco A., 2003, *Biotechnol. Bioeng.*, 84, 627–638.
- Sofowora, A., Ogunbodede, E., & Onayade, A., 2013, The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention, *African journal of traditional, complementary and alternative medicines*, 10(5), 210-229.
- Sultan, M. T., Butt, M. S., Anjum, F. M., Jamil, A., Akhtar, S. ve Nasir, M., 2009, Nutritional profile of indigenous cultivar of Black cumin seeds and antioxidant potential of its fixed and essential oil. *Pak J Bot* 41, 1321-1330.
- Verpoorte, R., & Alfermann, A. W. (Eds.), 2000, *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Springer Science.
- Trigui I, Yaich H, Sila A, Cheikh-Rouhou S, Bougatef A, Blecker C, Attia H, Ayadia MA., 2018, Physicochemical properties of water-soluble polysaccharides from black cumin seeds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 117: 937-946.
- Tonçer, Ö., Kızıl, S., 2004, Effect of seed rate on agronomic and technologic characters of *Nigella sativa* L., *International Journal of Agriculture & Biology* 6(3), 529–532.
- Ramadan, M. F., 2016, Black cumin (*Nigella sativa*) oils. In *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (pp. 269-275). Academic Press.

- Ramadan, M. F., 2021, Introduction to black cumin (*Nigella sativa*): Chemistry, technology, functionality and applications (pp. 1-7). Springer International Publishing.
- Rao, M. V., Al-Marzouqi, A. H., Kaneez, F. S., Ashraf, S. S., & Adem, A., 2007, Comparative evaluation of SFE and solvent extraction methods on the yield and composition of black seeds (*Nigella sativa*). *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 30(17), 2545-2555.
- Paarakh, P. M., 2010, *Nigella sativa* Linn.–A comprehensive review.
- Pokorný J. and Korczak J., Preparation of natural antioxidant, *Antioxidants in Food: Practical Applications*, 2001, no. chapter 13, CRC Press.
- Sihvonen M., Järvenpää E., Hietaniemi V. & Huopalahti R., 1999, Advances in supercritical carbon dioxide technologies, *Trends Food Sci Technol.*, 10(6–7), 217–22.
- Solati Z., Baharin B. S., and Bagheri H., 2014, Antioxidant property, thymoquinone content and chemical characteristics of different extracts from *Nigella sativa* L. seeds, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, no. 2, 295–300.
- Soto C., Chamy R., and Zúñiga M. E., 2007, Enzymatic hydrolysis and pressing conditions effect on borage oil extraction by cold pressing, *Food Chemistry*. 102, no. 3, 834–840.
- Wang, L. & Weller, C., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends Food Sci Technol*, 17(6), 300–12.
- Wang, L., Weller, C., Schlegel, V., Carr, T. & Cuppett, S., 2008, Supercritical CO₂ extraction of lipids from grain sorghum dried distillers grains with solubles. *Bioresour Technol.*, 99(5), 1373–82.