

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**GIDA OLARAK TÜKETİLEN ÇEŞİTLİ SIVI YAĞLARIN
TOPLAM ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN VE
TOPLAM FENOL İÇERİKLERİNİN İN VİTRO
ÖLÇÜLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Salih GÜZEL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Özcan EREL

Bu tez, HR.Ü Araştırma Fon Saymanlığı Tarafından **548** proje numarası ile desteklenmiştir

ŞANLIURFA

2005

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bitkisel Yağlar	3
2.1.1. Yağların Bileşimi ve Yapıları	3
2.1.2. Bitkisel Yağların Rafinasyonu	8
2.2. Serbest Radikaller	10
2.2.1. Radikal Kavramı Ve Oksijen Radikalleri	10
2.2.2.Oksijen Radikalleri	11
2.2.3. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikal Oluşturan Mekanizmalar	14
2.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri	15
2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	20
2.3.1 Antioksidan Etki Tipleri	20
2.3.2. Enzimatik Antioksidanlar	21
2.3.3. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	23
2.3.4. Enzimatik Olmayan Diğer Antioksidanlar	28
2.3.5. Polifenoller	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Gereç	33
3.1.1. Örneklerin Hazırlanması	33
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33
3.1.3. Kullanılan Araç Ve Gereçler	34
3.2. Yöntem	34
3.2.1.Toplam Fenol Ölçümü	34
3.2.2. Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü (TAK) Erel-1	34
3.2.3. Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü (TAK) Erel-2	35
3.2.4. Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü (TAK) Frap	35
3.2.5 İstatiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA SONUÇ	41
6. KAYNAKLAR	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil-1 Yağın içerisindeki renk veren maddelerden bazılarının açık formülleri	6
Şekil-2 Doğal oksijenden türeyen oksidan moleküller	11
Şekil-3 Lipid peroksidasyonu aşamaları	18
Şekil-4 Vitamin E'nin diğer antioksidanlarla ilişkisi	23
Şekil-5 Vitamin E nin Antioksidan Etkisi	24
Şekil-6 Singlet Oksijenin β -karoten üzerine etkisi	26
Şekil-7 Fenollerin rezonans etkileşimleri	29

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik No	Sayfa No
Grafik-1 Yağ Ekstraktlarının Toplam fenol İçeriğinin grafiği	35
Grafik-2 Yağ Ekstraktlarının EREL-1'e göreTAK (Toplam Antioksidan Kapasite)	35
Grafik-3 Yağ Ekstraktlarının EREL-2'e göreTAK (Toplam Antioksidan Kapasite)	36
Grafik-4 Yağ Ekstraktlarının FRAP'a göreTAK (Toplam Antioksidan Kapasite)	36
Grafik-5 Yağ Ekstraktlarının FENOL TAK(Erel-1) ile karşılaştırma grafiği	37
Grafik-6 Yağ Ekstraktlarının FENOL TAK(Erel-2) ile karşılaştırma grafiği	37
Grafik-7 Yağ Ekstraktlarının FENOL TAK(Frap) ile karşılaştırma grafiği	38

TABLULAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo-1 Reaktif oksijen partikülleri	11

TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın her aŐamasında ve Yüksek Lisans Eđitimim süresince bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı BaŐkanı tez hocam Sn. Prof. Dr. zcan EREL'e, Prof. Dr. Abdurrahman KOÇYİĞİT'e ve Doç. Dr. Nurten AKSOY'a, tezin oluşumunda katkıları bulunan Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya labrotuvarının tüm personellerine, ekonomik destekte bulunan HÜBAK'a, Harran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü elamanlarına ve yaŐamımın her alanında desteklerini yanımda hissettiğim aileme teŐekkür ederim.

Salih GÜZEL

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Mardin'in Dargeçit ilçesinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Batman'da tamamladı. 1997 yılında Harran üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2001 yılında Biyolog ünvanı ile lisans eğitimini tamamladı. Yüksek Lisans Eğitimi Süresince Üniversite de Araştırma görevlisi olarak çalıştı. Evli ve bir çocuk babasıdır.

ÖZET

Gıda Olarak Kullanılan Bazı Bitkisel Yağların Toplam Antioksidan Kapasiteleri ve Toplam Fenol İçeriklerinin *In vitro* Ölçümü

Salih GÜZEL

Biyokimya, Yüksek Lisans Tezi

Bu çalışmamızda amacımız gıda olarak kullanmakta olduğumuz bazı bitkisel sıvı yağların toplam antioksidan kapasitelerini ve toplam fenol içeriklerini *in vitro* olarak tespit etmek. Daha önceleri yapılan epidemiyolojik çalışmalar bitkisel gıdalarla beslenmenin hastalıkların oluşumunda, seyrinde ve tedavisinde önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir. Bitkisel gıdaların antioksidan içerikleri hastalıklardan korunmada yardımcı olur. Çünkü bitkisel gıdalar yapılarında bir çok farklı sınıf ve tipte antioksidan bulundurur. Ve bunlar toplam antioksidan kapasite olarak bilinirler. Bitkisel gıdaların yapılarındaki bu total antioksidanlar epidemiyolojik amaçlar için serbest radikal toplayıcısı olarak kullanılırlar.

Sekiz çeşit bitkisel sıvı yağın toplam fenol içeriğini Folin Ceucalteu yöntemiyle toplam antioksidan kapasitelerini farklı kimyasal temellere dayanan üç farklı metodla çalıştık. Bu metodların ikisi bay Erel'in geliştirmiş olduğu Total Antioksidan Respons(TAR) ve Toplam Antioksidan Kapasite(TAK) üçüncü metod ise FRAP'ın geliştirmiş olduğu yöntemdi. Yapılan ölçümlerde toplam fenol ve total antioksidan kapasite en fazla saf zeytin yağı ve sızma ve zeytin ve riviera zeytin yağında bulunurken en düşük miktarlar soya ve fındık yağlarında bulundu.

Sonuç olarak antioksidan içeriği ve toplam fenol içeriği en fazla olan saf zeytin yağı ve diğer zeytin yağları olduğunu tespit ettik Bunların gıdalarda kullanımının artırılması ilerde oluşabilecek hastalıkları önlemede ya da geciktirilmesinde yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Polifenol, Bitkisel Yağ

ABSTRACT**Measuring of in vitro Total Antioxidant Capacity and Total Phenol Capacity of Some Vegetable Oils**

Salih GÜZEL

Biochemistry, Master Tezz

The aims of this study were to determine the total phenol content and total antioxidant capacity of vegetable oils. Epidemiologic studies have demonstrated an inverse association between consumption of plants and morbidity and mortality from degenerative diseases. The antioxidant content of plant foods may contribute to the protection they offer from disease. Because plant foods contain many different classes and types of antioxidants, knowledge of their total antioxidant capacity (TAC), which is the cumulative capacity of food components to scavenge free radicals, would be useful for epidemiologic purposes.

Eight vegetable oils, total phenols contents were measured with Folin Ciocalteu method and total antioxidant capacity were analyzed using three different assays, i.e total antioxidant capacity (TAC) and total antioxidant response (TAR) against potent free radical reactions is described and ferric reducing-antioxidant power (FRAP). These assays, based on different chemical mechanisms, were selected to take into account the wide variety and range of action of antioxidant compounds present in actual foods. Among vegetable oils, extra virgin olive oil, olive oil had the highest antioxidant capacity, followed by extra virgin olive oil, whereas soybean oil and hazelnut oil was less effective.

Such data, coupled with an appropriate questionnaire to estimate antioxidant intake, will allow the investigation of the relation between dietary antioxidants and oxidative stress-induced diseases.

Keywords: Antioxidant, Polyphenol, Vegetable Oil

1- GİRİŞ

Sürekli gelişmekte olan teknoloji, oluşan çevre kirliliği, sigara, UV ve pek çok diğer etken sürekli olarak çeşitli toksik maddelerle karşı karşıya kalmamıza neden olmaktadır. Bu etkiler kendini serbest radikal oluşumuyla gösterir. Tüm bu nedenlerden dolayı dış etkilerle oluşan hastalıklar artmakta, genetik hastalıkların da çevresel etkilerle daha çok belirginleşmesine neden olmaktadır. Bu hastalıklara çözüm getirmek öncelikle bu hastalıkların oluşumunu engellemekle gerçekleşebilir.

Bunun için de ilaçlardan öte alınan besinler önem kazanmaktadır. Temel gıdalarımızdan biri olan yağlar, yağ asitlerinin birleşiminden ve içerdikleri çeşitli antioksidan vitaminler ve fenollerden oluşurlar. Yağlar yapılarındaki vitamin E ve fenollerden dolayı antioksidan özellik gösterirler. Yağların yapılarındaki bu antioksidan moleküller vücudun oksidan-antioksidan dengesi açısından önemlidir. Yetişkin bir insanın günlük aktiviteleri için 2000-3000 kalori gereklidir. Dengeli ve sağlıklı beslenmenin gereği olarak da bu miktarın 650-900 kalorisinin yağlardan karşılanması gerekmektedir.

İnsan vücudu serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşı birçok savunma mekanizmasına sahiptir. Organizmada normalde oksidan - antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur. İnternal veya eksternal faktörlere bağlı olarak üretilen reaktif oksijen radikallerine karşı organizmada internal ve eksternal antioksidan savunma sistemleri vardır. Antioksidan savunma sisteminde herhangi bir yetmezlik dengenin oksidanlar lehine kaymasına neden olmaktadır(1).

İnsanların sağlıklı bir şekilde yaşayarak yaşamın gerektirdiği çok çeşitli işlevleri yerine getirebilmeleri için gereksinim duydukları besinler 6 ana grupta toplanabilir. Bunlardan en önemlileri ise başta proteinler olmak üzere yağlar ve karbonhidratlardır. Canlı yaşamında büyük bir öneme sahip olan yağların, beslenme fizyolojisi bakımından vücuttaki görevleri kalorik ve kalorilik olmayan fonksiyonlar şeklinde gruplandırılabilir(2).

Protein ve karbonhidratların 1 gr 4,0 kkal. enerji verirken aynı miktardaki yağ 9,00 kkal.'lik enerji sağlar. Yağların bu denli kalori vermeleri yapılarında bulunan asit karbon zinciri içermelerine karşın, bünyelerinde çok az miktarda oksijen olması nedeniyle daha uzun süre yanmalarından kaynaklanmaktadır. Yağların kalorik

olmayan fonksiyonlarının başında ise, insan vücudu tarafından sentezlenemeyen bu nedenle de vücuda hazır olarak alınması gereken esas yağ asitlerince zengin olmalarından kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan yağlar A,D,E,K. vitaminleri gibi yağda çözünen vitaminleri, hormonal steroidleri, enzimleri, bazı antioksidanları, etkileri değişik olan terpen ve alkaloid gibi aktif maddeleri metal ve metaloitleri de içerirler(3).

Bitkisel gıda kaynaklarımız geniş çeşitlilikte serbest radikalleri emen vitaminleri (E ve C), fenolik bileşikleri (örneğin fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar, stilbeneler, ve taninler gibi), nitrojen bileşiklerini (alkaloidler, aminler, gibi) terpenoidler (karotenoidler gibi) ve antioksidan aktivite bakımından zengin bazı diğer endojen metabolitleri içerebilirler. Epidemiyolojik çalışmalar bu antioksidan bileşiklerin çoğunun az veya çok miktarda antienflamatuvar, antiaterosklerotik, antitümör, anti-mutajenik, antikarsinojenik, antibakteriyel ve antiviral faaliyetleri içerdiklerini göstermiştir(1).

Bitkisel yağlar, önemli esansiyel yağ asitlerini içermelerine karşın yapılarında kolesterol içermezler. Vücutta yapılamayan ve mutlaka dışardan alınması gerekli olan oleik, linoleik ve linolenik asit gibi doymamış ve esansiyel yağ asitleri, bitkisel yağların bünyesinde fazla oranda yer alırlar(4).

Biz bu çalışmamızda insan beslenmesinin temel kaynaklarından biri olan bitkisel yağların (ayçiçek, zeytin, fındık, mısır, soya, pamuk) antioksidan kapasitesini ve fenol içeriklerini kıyaslayıp insan sağlığı açısından yararlı ve ekonomik olanını tespit etmeye çalıştık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkisel Yağlar

Katı ve sıvı yağlar insan ve hayvan diyetlerinde temel bileşen olarak yer alan bileşiklerdir. Yağlar, gıda maddelerini oluşturan çeşitli bileşikler içerisinde enerjice en konsantre kaynağı teşkil ederler. Esansiyel niteliğe sahip çeşitli yağ asitlerini içerirler. Yağlar, yağda çözünen vitaminler için taşıyıcı fonksiyona sahiptirler.

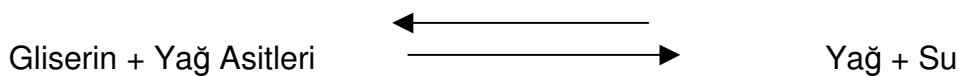
Katı ve sıvı yağlar gliserol ve yağ asitlerinden oluşan trigliseritlerin hakim olduğu bileşikler grubudur. Bu bileşikler suda çözünmediği halde pek çok organik çözücüde çözünür. Oda sıcaklığında katı formda iseler katı yağlar(fats), sıvı formda iseler sıvı yağlar(oils) olarak tanımlanırlar(5).

2.1.1. Yağların Bileşimi ve Yapıları

Yağlar, önemli bir besin grubunu oluşturan çift karbon sayılı (4-24 C'lu) doymuş ve doymamış yağ asitlerinin gliserin triesterleridir. Yağlar suda çözünmezler. Yağların kimyasal yapıları, karbon, hidrojen ve oksijen elementlerinden ibarettir.

A-Yağların Yapısı

Yağlar, yüksek molekülü yağ asitlerinin, bir triol gliserinle meydana getirdikleri esterlerdir; yani trigliseritlerdir. Yağ asitlerinin gliserinle esterleşmesi ise, aşağıdaki formülde gösterilmiştir:



Trigliseritler normal yağların % 95'lik kısmını oluşturmaktadır. %5'lik kısmı ise, mono ve digliseritler, serbest yağ asitleri, fosfatitler, steroller, yağ alkolleri, yağda çözünen vitaminler ve diğer maddelerdir.

Bir trigliserit 3 mol yağ asidi ve 1 mol gliserin'den oluşmaktadır. Bu trigliseritteki yağ asitlerinin hepsi aynı ise, *basit trigliserit* olarak adlandırılır. Bununla birlikte, iki ya da üç çeşit yağ asidi molekülünün karışımıyla oluşanlara *karışık trigliseritler* denmektedir.

Bir yağın fiziksel ve kimyasal özellikleri yapısına katılan yağ asitlerinin cinsine bağlıdır. Yağ asitleri orta ve uzun zincir formundaki karbonik asitlere dahildirler.

B-Yağların Sınıflandırılması

Yağlar, fiziksel özelliklerine, kimyasal bileşimine veya fizyolojik görevlerine göre sınıflandırılabilir. Yağlar, orjinlerine göre, bitkisel ve hayvansal yağlar olarak ikiye ayrılırlar.

Bitkisel yağların bünyesinde fitosterinler, hayvansal yağlarda zoosterinler ve özellikle kolesterin bulunur. Yağlar, fiziksel özelliklerine göre, sıvı ve katı yağlar olarak ayrılırlarsa da, ayırım kesin değildir. Sıcaklıkla ilgili olarak her iki özelliği de gösterebilirler.

C-Yağların Bileşenleri

Hemen her hücrede yağın yanında bir dizi yağ benzeri maddeler bulunmaktadır ve çözünürlükleri bakımından yağlara benzerler. Yapı bakımından heterojen bir yapı gösterirler. Bunların önemli olanlarından kısaca söz edilmiştir.

C.1.Fosfatidler

Fosfatidler yapısında polihidrik bir alkole(genellikle gliserol) bağlı olarak yağ asitleri, fosforik asit ve nitrojen içeren bileşiklerdir. Yemeklik yağlarda genel olarak bulunan fosfatid, lesitin ve sefalindir. Lesitinte nitrojenli baz olarak kolin, sefalinde ise hidroksi etilamin yer alır. Ayrıca yağlarda bulunan diğer bir fosfatidik bileşik fosfatidil inositol'dur.

Yağların bileşiminde fosfatidler farklı oranlarda bulunur. Örneğin saf soya yağı fosfatidi yaklaşık %20 lesitin, %31 sefalini ve %40 inositol fosfatid bulunmaktadır(5).

C.2. Steroller

Steroller steroid alkoller olarak da tarif edilirler. Kristal, nötral ve yüksek erime noktalarına sahip sabunlaşmayan alkollerdir. Steroller, steroid iskeletine ilaveten, 8-10 karbonlu bir yan zincir ve bir alkol grubu içeren bileşiklerdir. Steroller tabiatta yaygın olarak, çoğunlukla da yağlı maddeler içinde bulunurlar.

Steroller hem hayvansal katı yağlarda hem de bitkisel sıvı yağlarda bulunsada, hayvansal ve bitkisel steroller arasında önemli biyolojik farklar vardır. Kolesterol birincil hayvansal katı yağ sterolüdür, bunun yanında iz miktarda bitkisel sıvı yağlarda da bulunmuştur. Bitkisel sıvı yağ sterollerini genel olarak fitosterol olarak isimlendirilirler. Sitosterol ve stigmasterol en iyi bilinen bitkisel yağ sterolleridir. Bitkisel sıvı yağlarda mevcut sterollerin miktarı ve tipi, yağın kaynağı ile değişkenlik arzeder(5).

C.3. Ergosterinler

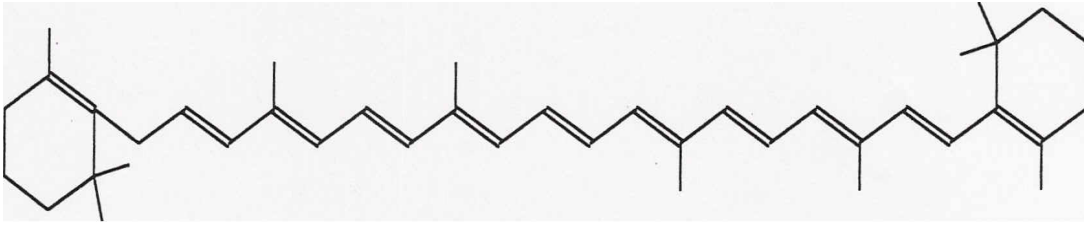
Basit bitkilerde bulunduğu fitosterinler sınıfına girmektedir. Ultraviyole ışık etkisi ile ergokalsiferole (vitamin D₂) dönüşür. Kolekalsiferol (vitamin D₃), ışık karşısında 7-dehidrokolesterol'den elde edilir. Bu insan organizmasında bulunan vitamin D'ler de yağda çözünen vitaminlere dahildir.

C.4. Renk Maddeleri (Lipokromlar)

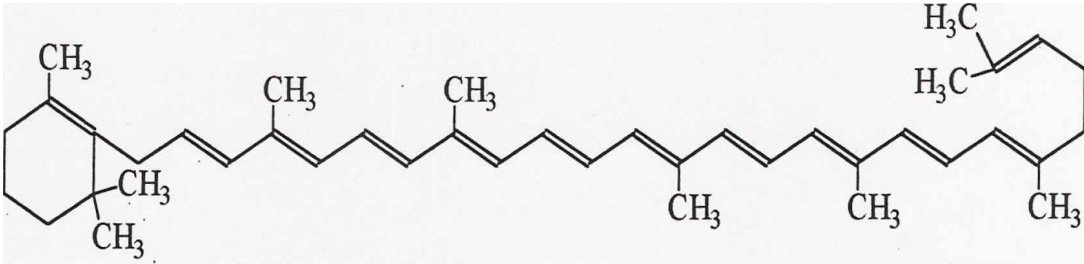
Yağların renkli olmasına sebep olan bileşikler tam olarak bilinmemektedir. En iyi bilinen pigmentler karotenoidlerdir. Karotenoidlerin en önemlilerinden birisi β -karotendir. Karotenoidler ısıya dayanıksız olduğundan dolayı deodorizasyon işleminde de yağın rengi açılabilir. Karotenoidler sınıfında en yaygın olarak bulunan ve tanınmış bileşikler karotenlerdir. Yağların sarı rengini bu bileşikler vermektedir. Karotenler A vitamininin pro-vitaminidirler(5).

Renk maddeleri yağlarda serbest veya ester halinde bulunabilirler. Ester yapısında olan renk maddeleri, ya ksantofil'de olduğu gibi renksiz bir asitle renkli bir alkolün, ya da klorofil'de olduğu gibi renksiz bir alkolle renkli bir asidin esterleşmesinden oluşurlar.

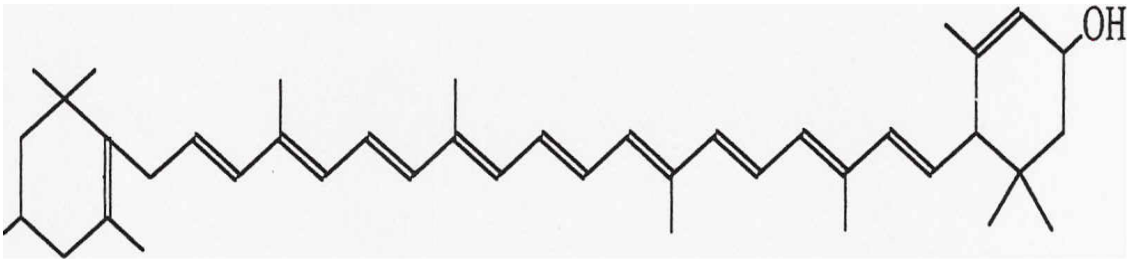
Yağlardaki renk maddeleri düşünüldüğünde genelde karotenoidler anlaşılır. Karotenoidler yağda çözünen hidrokarbonlar veya alkoller olup, çok sayıda konjuge bağ içerirler ve renkleri bu bağlardan ileri gelir. Aşağıda yağın içerisindeki renk veren maddelerden bazılarının açık formülleri verilmiştir:



f3-Karoten



Likopen



HO

Ksantofil II

Şekil-1 Yağın içerisindeki renk veren maddelerden bazılarının açık formülleri

Karotenoidlerden en önemlisi karotin'dir. Karotin provitamin A olarak da adlandırılır. Bu maddeden bağırsak yüzeyinde vitamin A meydana gelir. Ksantofil-II (Lutein) daha çok buğday embriyo yağında bulunur. Mısır renk maddesi Zeaksantin Karotinin dehidroksi türevleridir. Onun için yapısı birbirine benzer.

Biksin tropik bir bitki olan anotto meyvesinin sarı rengini meydana getirir. Bu margarin renk maddesi olarak kullanılır.

C.5. Doğal Antioksidanlar

Tüm doğal yağlar çok düşük miktarlarda da olsa yapılarında otoksidasyon reaksiyonlarını önleyici veya yavaşlatıcı olan bileşikler içerirler ki, bunlar *doğal antioksidanlar* olarak adlandırılırlar. Yağlarda stabiliteyi sağlayan bilinen önemli antioksidanlar tokoferol, sesamol, gossipol ve ferulik asit gibi bileşiklerdir. Nötral katı ve sıvı yağlar yapılarında bulunan bu bileşiklerden dolayı saf trigliseritlere oranla oksidatif buzulmaya karşı daha dayanıklıdırlar. Tokoferol bir çok bitkisel yağda doğal olarak bulunan önemli iz bileşenlerdir. Bunlar oksitlenmeyi geciktirici olarak görev yaparlar. Tokoferoller ayrıca yağda çözünen vitamin E'nin kaynağıdırlar.

Tokoferoller; pek çok bitkisel yağda doğal olarak bulunan ve işleme sırasında kısmi olarak azalan bileşiklerdir. Tokoferoller veya diğer antioksidanlar son üründe oksidatif stabiliteyi düzeltmek için işlemeden hemen sonra yağa ilave edilebilmektedirler(5).

Yaygın olarak bulunan tokoferollerin yanı sıra bazı yağlarda özel antioksidanlar vardır. Bunlar susam yağında bulunan sesamolin, sesamin ve sesamol ham pamuk yağında bulunan gossipol'dür. Gossipol kompleks fenolik bir bileşiktir. Çok kuvvetli bir antioksidan olan gossipol rafinasyon ile yağdan uzaklaştırılır. Gossipolün toksik etkisi de bulunduğundan dolayı yemeklik yağlarda bulunmamalıdır.

Fosfatidlerde yağda squalen, ferulik asit, tokoferol veya diğer fenolik tipteki bileşiklerle birlikte bulunduğu antioksidan aktiviteye sahiptir(5).

C.6. Tat ve Koku Maddeleri

Bugüne kadar yağlarda tat ve kokuyu oluşturan maddelerden pek azının özellikleri ve yapısı belirlenebilmiştir. Bununla beraber taze ve fazlaca yapısal değişikliğe uğratılmaksızın elde edilen yağlardaki spesifik tat ve koku maddelerinin büyük bir kısmını hidrokarbonların oluşturduğu bilinmektedir. Genellikle yağların sabunlaşmayan maddeler kısmında yer alan ve eser miktarlarda bulunan bu hidrokarbonlar polietilenik yapıdadırlar. Ayrıca aynı maddeler kapsamında yağlarda terpenik bileşiklere de rastlanmaktadır. Diğer taraftan hurma çekirdeği ve hindistan cevizi gibi yağlardaki tipik aromanın, içerdikleri ketonlardan, balık yağlarındaki tipik tat ve kokunun ise, içerdikleri polietilenik yapıdaki yağ asitlerinden ileri geldiği belirlenmiştir.

Yağlar, doğal olarak içerdikleri bu tat ve koku maddeleri yanında, yapılarında gerek teknolojik işlemler, gerekse oksidatif bozulmalar sonucu sonradan oluşan tat ve koku maddelerini de içerebilirler. Aynı şekilde otooksidasyona uğraması sonucunda yağların yapısında aldehit, keton, alkol ve kısa zincirli yağ asitleri gibi yağın doğal aromasını bozan tat ve koku maddeleri oluşmaktadır. Diğer yandan, hayvanların fazlaca aromalı yemlerle beslenmesi, gerek süt yağlarında, gerekse vücut yağlarında doğal halinden farklı tat ve *koku* oluşumuna sebep olmaktadır.

2.1.2. Bitkisel Yağların Rafinasyonu

Rendering, presyon veya solvent ekstraksiyonu ile üretilen ham yağlar gliserit olmayan bileşikler değişik oranda içerir. Düşük kaliteli maddelerden rendering işlemiyle elde edilen yağların pek çoğunda diğer bileşenler önemli miktarda bulunur. Örneğin ham pamuk yağında sakızsız ve müsilaçlı maddelerin yanı sıra yağ asitleri, gliseritler, fosfatidler, steroller, tokoferoller, hidrokarbonlar, pigmentler (gossipol ve klorofil), sterol glukozitler ve protein fragmentleri içerir.

Ham yağda çoğu safsızlık bileşeninin bulunması istenmez. Steroller renksiz, ısıya dayanıklı ve inörttür. Bundan dolayı ham yağda önemli miktarda bulunmadıkça önemsiz sayılırlar.

A. Degumming

Bu işlem, nötralizasyon öncesi tüm yağlara uygulanır. Burada elde edilen en önemli yan ürün lesitindir. İşlem oldukça basittir. Ham bitkisel yağa, yaklaşık olarak %3'ü kadar su ilave edilir ve çok yavaş bir şekilde karıştırılır. Amaç zankımsı safsızlığı hidratlayarak ayırmaktır. Ayırma işleminde sürekli santrifüjler kullanılır. Oluşan yağ film (Gurn) kurutucularda kurutulurken lesitin elde edilir. İşlem sırasında yağ asidi veya kalsiyum klorür gibi akışkanlığı düzenleyici katkıları ilave edilir.

B. Nötralizasyon

Ham yağda, direkt yemeklik olarak kullanılmasını engelleyecek kadar yüksek oranda bulunan serbest yağ asitlerinin giderilmesi işlemine "*Nötralizasyon*" denir. Burada sodyum hidroksit veya sodyum karbonat çözeltileri kullanılır. Nötralizasyon

sonucu serbest yağ asitlerinin yanı sıra, ham yağda bulunan pigmentler, fosfolipitler, sülfürlü bileşikler, yağda çözünmeyen ve suda çözünen maddeler uzaklaştırılır.

C. Ağartma

Yemeklik yağlarda ağartma, çoğunlukla asitle aktive edilmiş killer (%1-2) kullanılarak yapılır. Bu işlem sayesinde, renk veren maddeler, sabun, zatk (gurn), demir ve nikel metalleri ile okside bileşikler giderilir. Filtreden temizlenen aktif toprak % 20-40 oranında yağ içerir. Bu yağı almak için filtre pastası içinden buhar geçirilir veya sıcak su sirküle edilir.

D. Koku Giderme (Deodorizasyon)

Koku giderme işlemi; sıvı ve katı yağlarda arzu edilmeyen koku ve aromanın meydana gelmesine sebep olan parçacıkların arınmasını esas alan bir işlemdir. Bu işlem normal olarak nötralizasyon ve ağartma işleminden sonra yapılır. Uygun bir koku giderme işlemi, yüksek kaliteli, bozulmaz, yumuşak ve kokusuz özelliklere sahip sıvı yağ üretimine imkan sağlar. Bu yağlardan margarin, kızartmalık ve salatalık yağların imalatında faydalanılır. Sıvı ve katı yağlarda deodorizasyon, direkt buhar kullanma suretiyle, sıvı ve katı yağlarda nisbeten uçucu olan koku verici unsurların giderilmesi işlemidir. Katı ve sıvı yağlara kötü koku veren maddelerin, uçuculuk farkları çok değişik olduğundan, bu işlem uygun olmaktadır. Uçucu safsızlıkların uçucu olmayan katı ve sıvı yağlardan temizlenmesi için özel bir cihaz kullanılır. Bu cihaz, damıtmayı kolaylaştırmak için 200-260 C° gibi yüksek sıcaklıklara kadar ısıtılıp, vakum altında tutulan yağın içine enjeksiyonla direkt buhar verilmesini temin eder. Buharın iyi bir verimle kullanılması, sıcak yağın atmosferik oksidasyondan korunması ve yağın muhtemel hidrolizinin önlenmesi için deodorizasyon, düşük vakumda yapılır.

Yağın içinde koku verici maddelerin konsantrasyonu düşüktür. Pamuk yağında %0.1 den daha azdır. Şayet koku alma işlemi uygun bir şekilde uygulanırsa yağda kötü koku yayan maddeler tamamen temizlenebilir. Kötü koku yayan maddelerin temizlenmesinin yanı sıra deodorize serbest yağ asidi miktarı da %0.04 ve %0.02'ye kadar düşürülür. Ayrıca ağartmadan sonra hala peroksit mevcutsa, bu deodorizasyon esnasında yağın içinden alınarak yağın aynı zamanda stabilitesi de

geliştirilmiş olur. Deodorizasyon işlemi yalnız bir su buharı damıtma işlemi değildir. İstenmeyen koku ve tat veren aroma bileşiklerin arınması işine ek olarak bir takım kimyasal reaksiyonlarda gerçekleştirilir. Bunlar deodorize edilen yağın stabilitesi ve kalitesi için gereklidir.

E. Vinterizasyon

O C° dolayında veya daha düşük sıcaklıklarda, yemeklik sıvı yağlarda doymuş yağ asitleri ve trigliseritleri kristallendirerek çöktürüp, süzmekle yapılan ayırma işlemine "*Vinterizasyon*" denir. Böylece soğuğa dayanıklı, özellikle kış aylarında bile berrak bir görünüme sahip yemeklik yağ elde edilir(6).

2.2. Serbest Radikaller

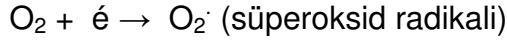
2.2.1. Radikal Kavramı ve Oksijen Radikalleri

Bilindiği gibi atomların çekirdekleri etrafında dönen elektronlar; belirli enerji düzeylerinde, birbirine zıt momentli çiftler şeklinde bulunmaya eğilimlidirler. En dış yörüngede bulunan elektron çiftinin dengesi, yörüngeye bir elektron girmesi ya da çıkmasıyla bozulursa, momenti dengelenmemiş bu tek elektron; atoma(ya da moleküle) büyük bir aktiflik kazandırır. En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan molekül ya da molekül gruplarına "radikal" adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir(7-12).

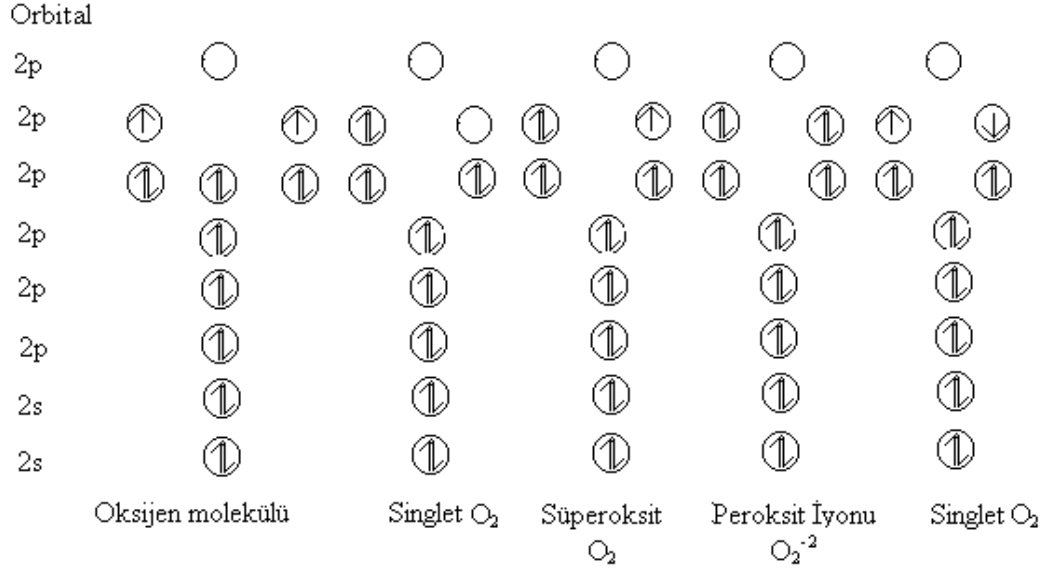
2.2.2. Oksijen Radikalleri

Oksijen doğada dioksijen (O₂) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Bu kararsız konumu, enerji düzeylerinde bulunan elektronlarının yapısıyla ilişkilidir. Bu elektronların orbital yapısı şekil 1'de gösterilmiştir(8,10).

Oksijen molekülündeki aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2p son orbitali önemlidir. Bu orbitallerden herhangi birindeki elektron, bir orbitali bırakıp diğerine geçtiğinde veya farklı yönde döndüğünde "singlet oksijen" oluşur. Orbitallerden birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse "oksijen radikali" elde edilir. Reaksiyon oluşumu aşağıda gösterilmektedir.



Doğal oksijenden türeyen oksidan moleküller Şekil-2 'de verilmiştir (8,10,11).



Şekil-2 Doğal oksijenden türeyen oksidan moleküller

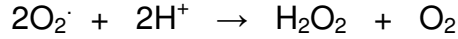
Oluşan radikal eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle çok dengesizdir ve hızla ortamdan kaybolur. Bu yüzden bu radikaller tek elektronlarını bir başka moleküle verebilir(redüksiyon) ya da bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler(oksidasyon). Sonuçta radikal olmayan yapıyı radikal şekle dönüştürebilirler. Bu özellikleri ile reaktif oksijen partikülleri iki ana başlık altında tablo -1 deki gibi incelenmektedir(8,10).

Tabl-1. Reaktif oksijen partikülleri

Radikaller		Nonradikaller	
Süperoksid radikal	O ₂ ⁻	Hidrojen Peroksid	H ₂ O ₂
Hidroksil radikal	(OH [·])	Lip. Hidroksiperoksid	LOOH
Peroksil radikal	(ROO [·])	Hipohaloz Asit	HOX
Alkoksil radikal	(RO [·])	N Halojenli Aminler	R-NH-X
Semikinon radikal	(HQ [·])	Singlet Oksijen	O ₂
		Ozon	O ₃
		Azot Dioksid	NO ₂

A. Hidrojen Peroksit

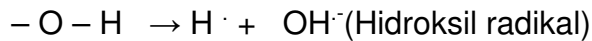
Hidrojen peroksit eşleşmiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. $O_2\cdot$ 'nin hidrojenle yaptığı reaksiyona "Dismutasyon" adı verilir ve reaksiyon şu şekilde ifade edilir;



Dismutasyon hızı asidik pH değerlerinde hızlanır(13,14). Bazı enzimler ya tekli (NADPH oksidaz) ya da çiftli (Glukoz oksidaz) elektron eklenmesini katalize ederek $O_2\cdot$ veya H_2O_2 oluşmasını sağlarlar.

B. Hidroksil Radikaller

Kimyacılar ve biyologlar; radyasyona maruz bırakılan hücrelerde oluşan hasarlarda serbest radikal reaksiyonlarının rolünü detaylı bir biçimde incelemişlerdir. Örneğin; dokular, γ radyasyona maruz kaldıklarında, enerjinin çoğu hücre içindeki su tarafından absorblanır ve radyasyon oksijen-hidrojen arasında kovalent bağa neden olur. Sonuçta şekilde görüldüğü gibi iki radikal meydana gelir.

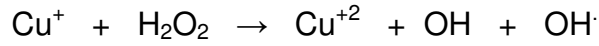
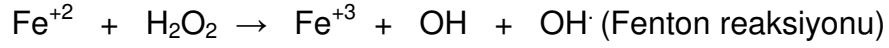


Bu radikallerden biri hidrojen ($H\cdot$) ve diğeri ise hidroksil ($OH\cdot$) radikalidir. Hidroksil radikalleri en reaktif radikal olarak bilinir ve $OH\cdot$ her moleküle hücum ederek hasar meydana getirebilir. Oldukça reaktif $OH\cdot$ nin biyolojik moleküllerle reaksiyonu nonradikal bir tepkimedir. $OH\cdot$ reaksiyonları DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile etkileşir, ayrıca tiyol grubu içeren biyolojik moleküllerden H atomu çıkarabilir. Örneğin;

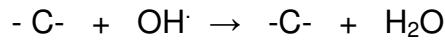


Sonuçta oluşan sülfür radikalleri ilginç kimyasal özelliklere sahiptir. Sülfür radikalleri, O_2 ile kombine olabilir ve oksijen sülfür radikallerini oluşturur. $RSO_2\cdot$ ve RSO gibi bunların bir çoğu da biyolojik moleküllerde hasara neden olurlar.

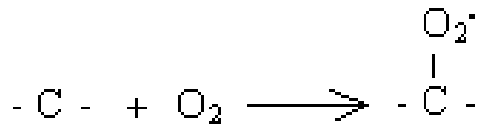
OH[·] Radikali hidrojen peroksitten Fe⁺² veya Cu⁺² yardımıyla da oluşabilir. OH[·] çok hızlı bir şekilde komşu moleküllerle reaksiyona girer.



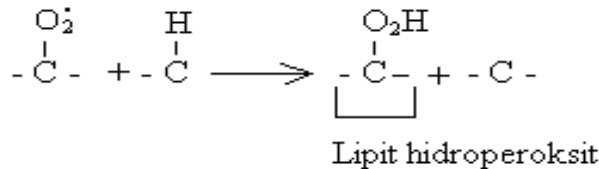
OH[·]'in sebep olduğu en iyi karakterize edilmiş olan biyolojik hasar lipid peroksidasyon olayıdır. OH[·], membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asit yan zincirlerine hücum eder. Bu özellikle araşidonik asitleri gibi doymamış yağ asit yan zincirlerinin (C) atomunun birinden H atomunu çıkartır ve sonuçta su oluşumunu sağlar.



Bu reaksiyon sonunda membranda (-C-) radikali kalır. Bu -C- radikali oksijen ile kombine olarak peroksil radikalini oluşturur.



Peroksit radikaller reaktiftir ve yakınındaki doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerine saldırır;



Böylece OH[·] radikalleri, yüzlerce yağ asitlerinin yan zincirlerini lipit hidroperoksitlere dönüştürür. Membranda lipit hidroperoksitlerinin birikimi membran fonksiyonunu bozar. Peroksil radikaller ve sitotoksik aldehitler, membran

proteinlerinde ciddi bir hasara neden olurlar ve membrana bağılı bazı enzimleri ve reseptörleri inaktive edebilirler(10,13,15).

2.2.3. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikal Oluşturan Mekanizmalar

Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir(16).

A. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Normal olarak metabolizmada, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır.

Biyokimyasal mekanizmalar arasında şunlar sayılabilir:

- Hücrel oksijen metabolizması (Mitokondriyel elektron transportu)
- Fagositoz
- Lipit peroksidasyonu
- Enzimatik aktivite (Çeşitli oksidazlar ve dehidrogenazlar)
- Otooksidasyon
- Çeşitli hastalık durumları (Örneğin Yangı)
- Bazı metabolik olaylar (Hipoksi, iskemi)

B. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller, eksojen nedenlerle de oluşabilir.

- Radyasyon
- Sigara dumanı
- Zehirli gazlar
- İlaçlar
- Karsinojen maddeler
- Pestisitler en önemli ekzojen serbest radikal üretim kaynağını oluşturur(16,17).

2.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

A. Proteinlere Etkileri

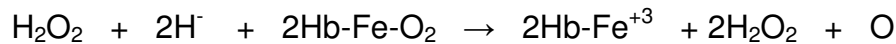
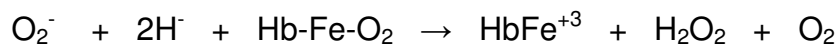
Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır.

- 1) Amino asitlerin modifikasyonu
- 2) Proteinlerin fragmantasyonu
- 3) Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalar (18-20).

Aromatik aminoasitlerde(fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar olduğundan oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfürlü amino asitler olan sistein ve sistin de serbest radikal atağına hassas aminoasitlerdir. Proteinin temel yapısındaki değişme, antijenitesindeki değişmeye ve proteolize hassasiyete yol açabilir. Radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girebilirler ve enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilirler(19,21).

Serbest radikaller etkisiyle IgG ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Yine bir protein olan α_1 PI (α -1 Proteinaz İnhibitör)'ün, oksijen radikalleri tarafından inhibisyonu amfizem gelişimiyle sonuçlanır(18).

Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin O_2 veya H_2O_2 ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna sebep olur (22,23).



B. Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri

Oksijen radikalleri oksidatif uyarılma ile DNA hasarına yol açabilir, DNA zincirlerinin kopması, DNA çift sarmalı ayrılması sonucu hücrede mutasyonlar ve ölüm gelişebilir(22,24,25). DNA molekülleri nükleusta bulunur ve sıkı heliks yapısında düzenlenmiştir, ayrıca histonlarla da korunur. Bundan dolayı serbest radikallerle temasa bağlı değişiklikler azdır(19).

C. Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıkların patolojik proseslerinde önemli rol oynarlar(21).

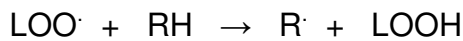
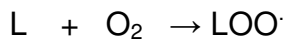
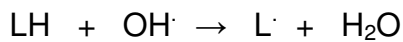
Enflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya geçen PML'lerden extrasellüler sıvıya salınan H₂O₂ ve O₂ buradaki mukopolisakkarit olan hiyalüronik asidi parçalarlar. Gözün vitröz sıvısında bol miktarda hiyalüronik asit bulunur. Bununda oksidatif hasarı katarakt oluşumuna katkıda bulunur(17,23).

D. Membran Lipidlerine Etkileri

Oksijen radikalleri, poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek lipid peroksidasyonuna yol açarlar. Membran kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyona uğrayabilirler. Lipid proksidasyonu, serbest radikallerin poliansature yağ asitlerinin metilenik karbonlarından hidrojen atomunu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar ve zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür.

Demir, lipid peroksidasyonunda zincir reaksiyonunun başlangıcında önemli rol oynayarak süperoksit ve hidrojen peroksidin daha güçlü oksidanlara dönüşümünü katalizler(18,26,27).

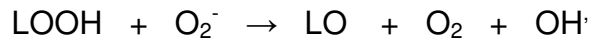
Hidroksil radikali, fosfolipaz A₂'yi stimüle ederek araşidonik asit salınımına yol açar. Araşidonik asitten bir hidrojen atomu çıkararak lipid peroksidasyonunu başlatabilir(18,19,26).



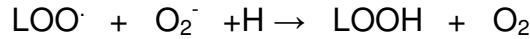
Hidrojen atomunun birden çıkarılması, karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron bırakır ve sonuçta karbon merkezli radikal oluşur. Bu radikal sıklıkla

konjuge dien şekline çevrilir ve sonra moleküler oksijenle reaksiyona girerek peroksi radikali($\text{LOO}\cdot$) oluşturur. Oluşan peroksi radikali başka bir peroksi radikaliyle veya membran proteinleriyle etkileşebilir(22).

O_2^- nin lipid peroksitlerle(LOOH) reaksiyonu ile yeni radikal reaksiyonları başlayabilir.



Bunun yanında süperoksit lipid peroksidasyonunu bitirici etki de gösterebilir(17,21).

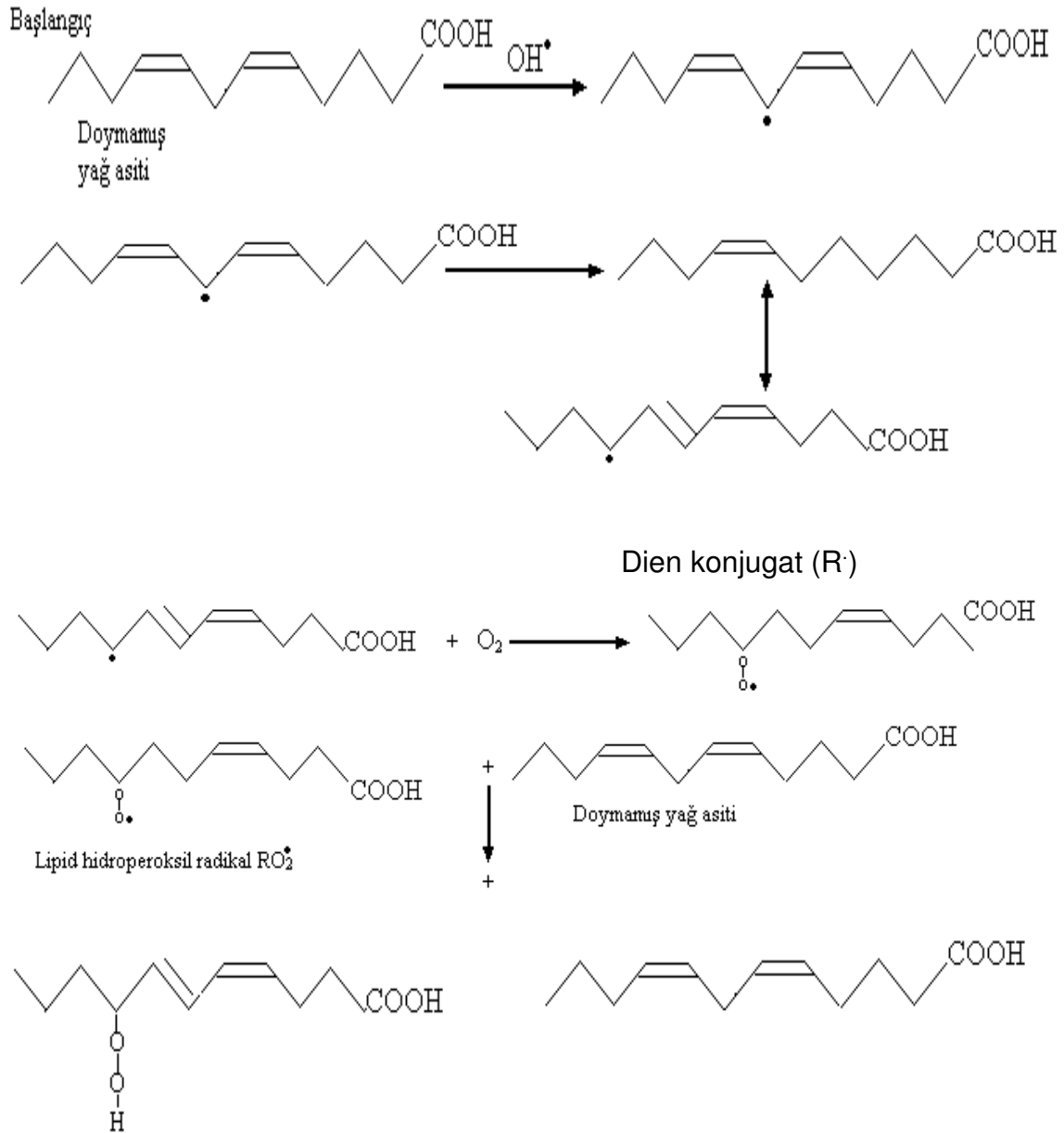


Membran fosfolipitlerinin peroksidasyonu, permeabilitede ve membran akışkanlığında değişikliklere yol açar. Permeabilite özelliklerinin değişmesi anormal Ca^{+2} girişine yol açarak hücre fonksiyonlarının disregülasyonuna ve oksidasyonla fosforilasyonun ayrılmasına yol açar. Sinir lifleri etrafındaki miyelin kılıfı peroksidasyonu nörolojik hastalık sebebi olabilir. Akciğer sürfaktanının peroksidasyonu atalektazi ve pulmoner disfonksiyona yol açabilir(18,24,28).

Hasarlı dokularda lipit peroksidasyonu sağlıklı olanlardan daha hızlı ilerler. Bu dokularda peroksidasyona yatkınlıktaki artış, antioksidanların inaktivasyonunun ve metal iyonlarının(Fe ve Cu) hücre içinden serbestleşmesinin neticesidir. Metal iyonları lipid peroksitlerin sitotoksik ürünlere değişimini kolaylaştırır(29).

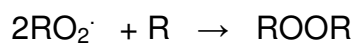
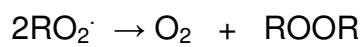
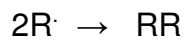
Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşur. Bu bileşikler, hücre düzeyinde metabolize edilirler veya diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayabilirler. Üç ya da daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asidlerinin peroksidasyonu, malondialdehid (MDA) meydana getirir. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, ancak lipid peroksidasyonunun derecesi ile korelasyon gösterir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin

agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar(25,30,31,32).



Lipid Hidroperoksit

Sonlanma



Şekil-3. Lipid peroksidasyonu aşamaları(33).

2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikalleri metabolize eden enzimler, toplayıcılar veya serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran maddelere antioksidan denir(17). Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Antioksidanlar, endojen kaynaklı ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilirler(34).

2.3.1 Antioksidan Etki Tipleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler:

- Toplayıcı etki (scavenging etki)
- Bastırıcı etki (quencher etki)
- Onarıcı etki (repair etki)
- Zincir kırıcı etki (chain breaking etki)

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf bir moleküle çevirme işlemine toplayıcı etki denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşial mukus ve küçük moleküller bu tip bir etki gösterirler.

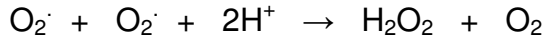
Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya bastırıcı etki adı verilir. Vitaminler ve flavanoidler, bu tarz bir etkiye sahiptirler.

Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye zincir kırıcı etki denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler(36,37).

2.3.2. Enzimatik Antioksidanlar

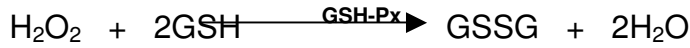
A. Süperoksid Dismutaz

SOD'lar bir grup metalloenzimdir. Süperoksid radikalinin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalizleyerek, süperoksid radikalinin zararlı etkilerine karşı hücreleri korurlar. Aynı zamanda lipit peroksidasyonunu da inhibe ederler. SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD'nin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür(38,39).



B. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz (GPx) hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Oluşan H_2O_2 , GPx veya katalaz aracılığı ile suya indirgenir. Selenyum bağımlı GPx, H_2O_2 ve organik hidroperoksitlerin glutatyon tarafından indirgenmesini katalize eden peroksidazlardan biridir. Tetramerik 4 selenyum atomu ihtiva eden sitozolik bir enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler;



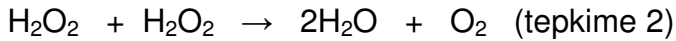
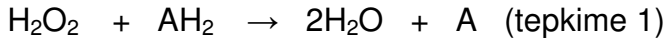
Eritrositin Se içeriği GSH-Px ile bağlantılı olmakla beraber diğer dokular özellikle karaciğer enzimi Se bağımsız tipinde içermektedir. H_2O_2 ve organik peroksitlerin glutatyon varlığında indirgenmesiyle oksitlenen glutatyon, glutatyon redüktaz enzimi ve başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar.

Glutatyon peroksidaz fagositik hücrelerde önemli fonksiyonlara sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de

GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar(40-44).

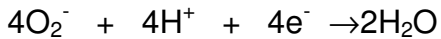
C. Katalaz

Katalaz yapısında protoporfirin hem grubu içerdiğinden bir hemoprotein olarak kabul edilmiştir(45). Kan, kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoz membranda yüksek miktarda bulunmaktadır(46). H₂O₂ oluşum hızının düşük olduğu durumlarda peroksidatif tepkimeyle(tepkime 1) veya H₂O₂ oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkime(tepkime 2) yaparak hidrojen peroksiti suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır(47,48).



D. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, aşağıdaki reaksiyonla süperoksidi detoksifiye eder.

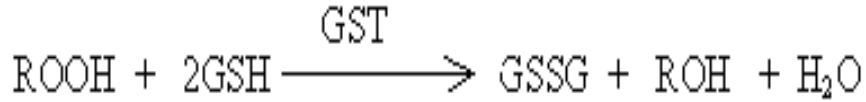


Bu reaksiyon, fizyolojik şartlarda sürekli cereyan eden normal bir reaksiyon olup bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak, süperoksid üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar. Bu durumda, diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin zararlı etkilerine engel olurlar(23).

E. Glutation -S-Transferazlar

Ksenobiotiklerin(yabancı maddeler) biotransformasyonunda önemli rol almalarından dolayı biyokimyacılar genetikçiler, klinisyenler, farmakolojistler ve toksikolojistlerin ilgisini çeken bir enzimdir.

Başta araşidonik asid ve lineolat hidroperoksidleri olmak üzere lipid peroksidlerine karşı GST'lar Se-bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek bir defans mekanizması oluştururlar(23).



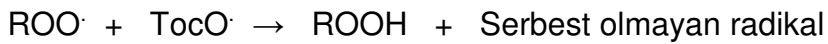
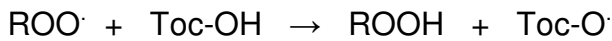
2.3.3. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

A. Vitamin E (α -Tokoferol)

Vitamin E nin biyolojik olarak en aktif formu α -Tokoferoldür.

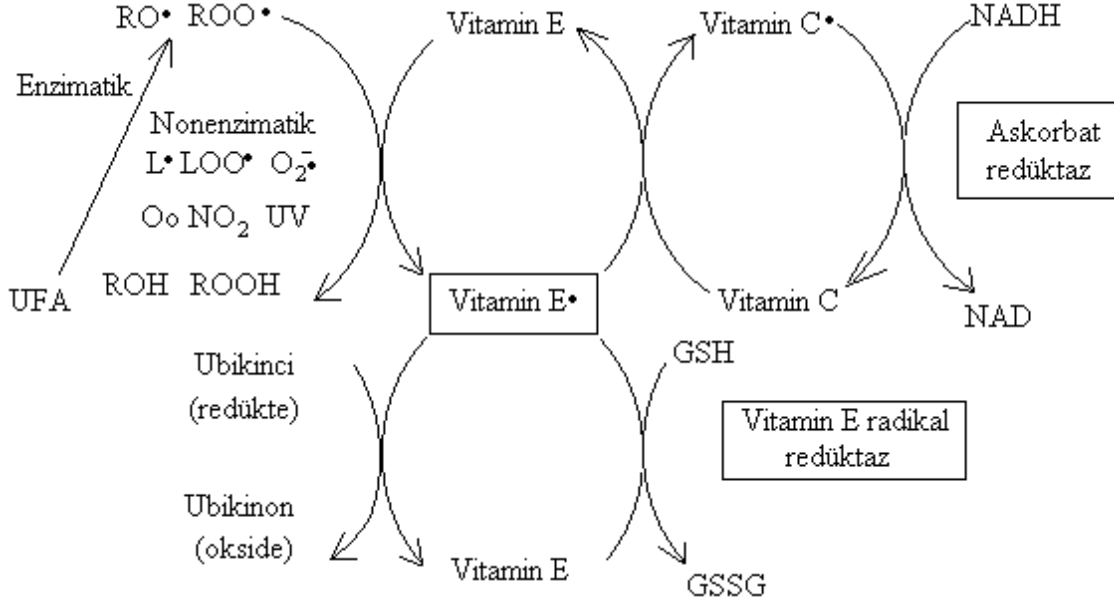
α -Tokoferol lipoproteinler ve biyolojik membranlar içinde bulunan yağda çözünen bir bileşiktir(17,47).

Vitamin E yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır. Mitokondri endoplazmik retikulum ve plazma membran fosfolipitlerinin α -tokoferole karşı çok yüksek affinitesi vardır. Tokoferoller fenolik bir hidrojeni peroksidasyona uğramış bir doymamış yağ asidindeki serbest peroksit radikale aktarırlar(49). Bunun sonucunda serbest radikal zincir reaksiyonları kırılır.



Oluşan serbest α -tokoferol radikali bundan sonra yeni bir serbest peroksit radikaliyle reaksiyona girer. Böylece α -tokoferol kolay rezervibl oksidasyona uğramaz. Kroman halkası ve yan zincir şeklindeki serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü ikinci konumundaki hidroksil grubu üzerinden glukuronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yoluyla atılır(50).

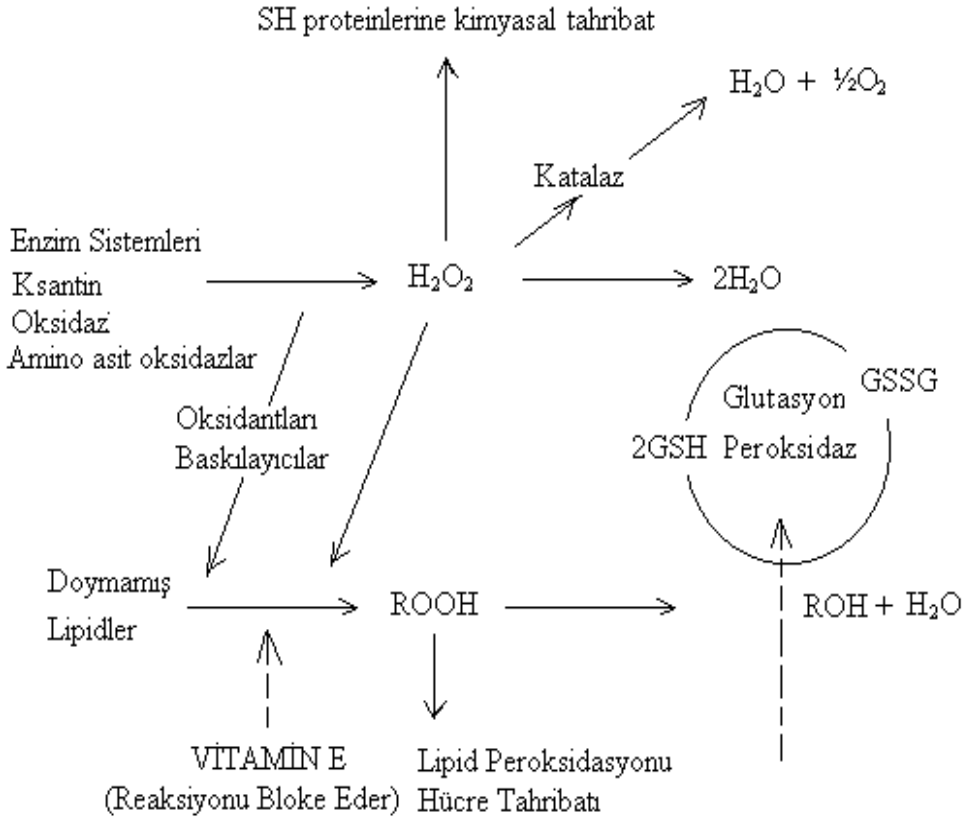
α -Tokoferol radikali glutatyon ve askorbik asidin bulunduğu ortamlar da dejenere olabilir ve tekrar α -tokoferol şekline geçebilir.



Şekil-4. Vitamin E'nin diğer antioksidanlarla ilişkisi

Tokoferolün antioksidan etkisi yüksek oksijen konsantrasyonlarında etkilidir. Bundan dolayı en yüksek oksijen kısmi basınçlarına maruz kalan lipid yapılarında örneğin eritrosit ve solunum sistemi membranlarında etkileri belirgindir(50,51).

α -Tokoferol peroksit radikalleri için doymamış yağ asitlerinden daha hızlı yarışır ve küçük bir miktarı çok miktarda doymamış yağı koruyabilir. Biyolojik membranlardaki α -tokoferolün konsantrasyonları lipid moleküllerinin 1/1000'i kadardır(52,53).



Şekil-5 Vitamin E nin Antioksidan Etkisi

B. Beta Karoten(Vitamin A Ön Maddesi)

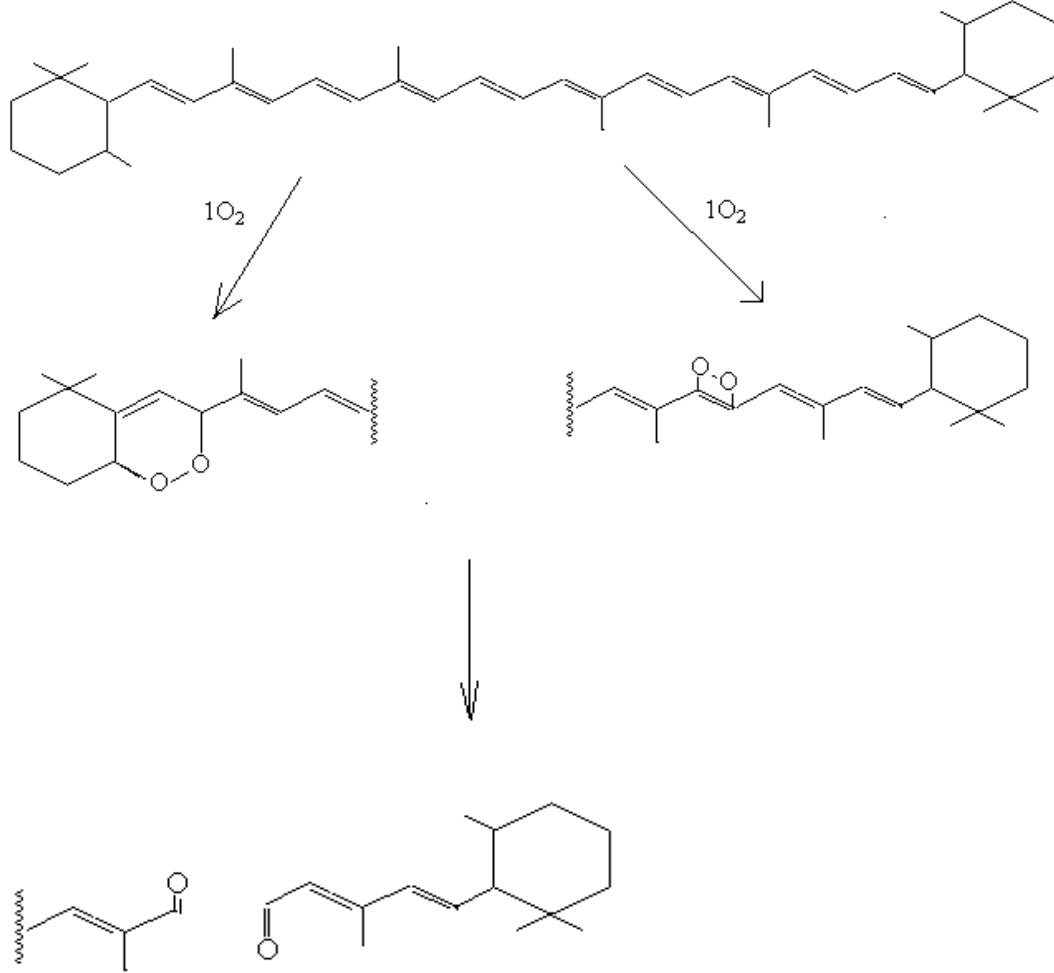
Beta-karoten yağda çözünen bir antioksidan olarak serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyona girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikallerin oluşumunu önler(54,55).

Karotenoidler özel kimyasal yapılarından dolayı singlet oksijeni tutabilirler. Bunun içinde öncelikle singlet oksijenden β -karotene eksitasyon enerjisi transfer edilir. Bu kazandığı enerji sayesinde β -karotenin çift bağları açılır ve sonuçta enerjice zengin β -karoten radikali oluşur. Bu radikal radikal olmayan formuna dönüşürken enerji, ısı olarak salınır(55).

Bu olaylar vasıtasıyla β -Karoten molekülünün kendi orijinal enerji düzeyi yeniden düzenlenirken singlet oksijen reaktif olmayan oksijene dönüşür(55).

Tek bir β -Karoten molekülü 1000 singlet oksijen molekülünü etkisiz hale getirebilir. Bu özellik β -karoteni çok kuvvetli bir singlet oksijen yok edicisi yapar(54).

Karotenoidlerin singlet oksijen yok etme kabiliyeti, içerdikleri konjuge çift bağ sayısına bağlıdır. Etkili bir yoketme için dokuz yada daha fazla çift bağa sahip olmak zorunludur. β -karoten onbir konjuge çift bağa sahiptir. Bu da onun singlet oksijen yok edici etkisini arttırmaktadır(54).



Şekil-6. Singlet Oksijenin β -karoten üzerine etkisi

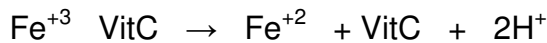
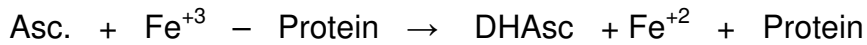
C. C Vitamini

C vitamini kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Suda eriyebilir vitaminlerden olan askorbik asid, özellikle yeşil renkli sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. İnce barsaklardan kolayca emilir. Isıtılmaya dayanıksız, dondurmaya ise dayanıklıdır. Plazma konsantrasyonu 0.5-1.5 mg/dl kadardır.

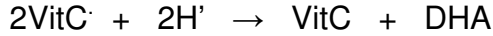
C vitamini organizmada birçok hidroksilasyon reaksiyonlarında indirgeyici ajan olarak görev yapar. Kollagen sentezinde lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir. Tirozinden epinefrin sentezinin dopamin β -hidroksilaz basamağında, ve lizinden karnilin sentezinde rol alır. Katekolamin sentezinde dopamin β -monooksijenaz reaksiyonunda kofaktör olarak etkilidir. Demirin emiliminde enzimatik olmayan bir yol ile indirgeyici bir rol oynar. Midede ferri demiri ferro demire indirgeyerek emiliminde görev alır. İmmunite ve yara iyileşmesinde etkilidir.

Çok güçlü bir indirgeyici ajan olan askorbik asid semidehidroaskorbat radikal ürünü üzerinden kolaylıkla dehidroaskorbik aside okside olur. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı güçlü bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikali ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Semidehidroaskorbat da antioksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller, tokoferoksil radikalinin, α -tokoferole redüklenmesini sağlar. C vitamininin bitkisel ve hayvansal yağları balık, margarin ve süt gibi yağ ihtiva eden yiyecekleri oksidatif bozulmaya karşı koruduğu bilinmektedir.

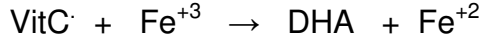
C vitamininin diğer bir özelliği, antioksidan etkisi yanında okside etki de göstermesidir. Çünkü C vitamini, ferri demiri ferro demire indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek sellüler ajandır. Bu yolla askorbat, proteine bağlı ferri demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan ferri demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro demire dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir.



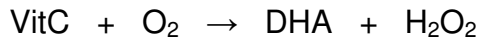
Görüldüğü gibi, C vitamininin ferri demirle doğrudan reaksiyonunda C vitamini radikali(dehidroaskorbat radikal anyonu vit C) de meydana gelmektedir. Bu şekilde meydana gelen C vitamini radikali pek reaktif değildir. Ya NADH redüktaz tarafından indirgenir veya iki proton alarak serbest radikal reaksiyonlarının ilerlemesini durdurur.



Ancak, aynı radikal başka bir ferri demiri indirgeyerek kendisi dehidroaskorbata dönüşürken bu arada yine Fenton reaksiyonu için gerekli olan ferro demiri açığa çıkarabilir.



Bunların dışında, C vitamininin oksidasyonunda doğrudan H_2O_2 de meydana gelebilir.

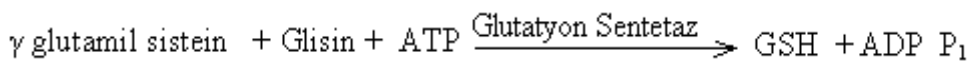
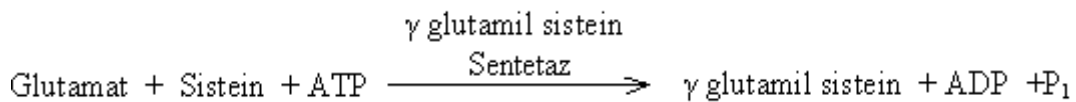


Böylece C vitamini tarafından hem H_2O_2 hem de ferro demir sentezi Fenton reaksiyonuna, yani radikal üretimine katkıda bulunur. Ancak, bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda (0,2 mM'dan az) görüldüğü daha yüksek konsantrasyonlarda ise güçlü bir aktioksidan olarak etki gösterir(23).

2.3.4. Enzimatik Olmayan Diğer Antioksidanlar

A. Glutasyon (Gsh)

Bir çok türün hemen hemen tüm hücrelerinde bulunan glutasyon, metabolizma da önemli rol oynayan bir tripeptittir. GSH; Glutanik asit, sistein ve glisin aminoasitlerin den oluşur. GSH sentezi ATP kullanılan iki basamaklı bir reaksiyonla gerçekleşir(34,56).



Molekülün aktif kısmı sisteinin sülfhidril grubudur. γ glutamil kısmı hücre içi stabilizeyi ve peptidazlara direnci sağlar. Canlı hücrelerde 0.5-8 mM konsantrasyonda bulunur(57).

Glutasyonun önemli işlevleri

- Hücre zarlarından aminoasitlerin hücre içine taşınması
- Koenzim olarak enzim yapısına katılmak
- Proteinlerdeki sülfhidril gruplarını korumak
- Peroksit, serbest radikaller ve reaktif toksik ara maddelerin detoksifikasyonu(7,57).

B. Melatonin

Melatonin -OH radikalini ortadan kaldıran en güçlü antioksidandır. Melatonin, OH[·] radikali ile reaksiyona girdikten sonra bir indolil katyon radikaline dönüşür ki bunun da ortamdaki O₂⁻ radikalini tutarak antioksidan aktivite gösterdiği kaydedilmiştir.

Serbest oksijen radikalleri oluşturmak suretiyle kansere sebep olan safrol'ün DNA üzerindeki hasarının melatonin tarafından çok etkili bir şekilde inhibe edildiği gösterilmiştir.

Melatonin'in, antioksidan olarak diğer önemli bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin bariyeri gibi bariyerleri de kolayca geçer. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir(23).

2.3.5 Polifenoller

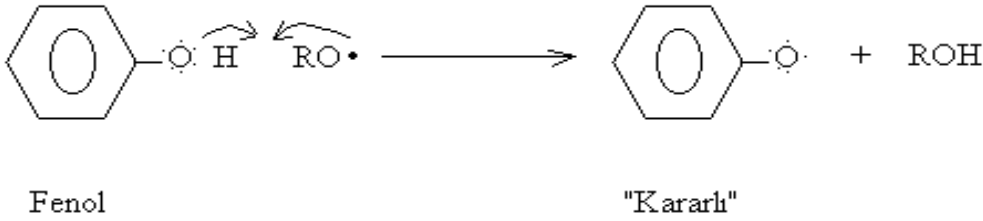
Fenolik bileşikler daha yaygın olarak kullanılan ismiyle polifenoller, benzen halkası içeren maddelerdir. Bilindiği gibi hidroksi benzen, çoğunlukla fenol adı ile anılır. Buna göre en basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzen yani fenoldür. Diğer tüm fenolik maddeler bundan türemişlerdir. Bitkisel fenoliklerin sağlık açısından yararlı ve önemli bileşikler olduğu saptanmıştır. Nitekim klorojenik asit ve kateşinler gibi çok yaygın olarak bulunan fenolik bileşiklerin antimutajen ve antikanserojen özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir(31).

Bütün bitkiler metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak, ancak bu maddelerin bitkilerin kendi metabolizmalarındaki rolleri yeterince bilinmeyen, çok sayıda fenolik madde oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, bitkisel kökenli bütün gıdalarda daima farklı nitelikte ve miktarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır. Fenolik bileşikler meyve ve sebzelerin kendilerine özgü buruk tadını verirler.

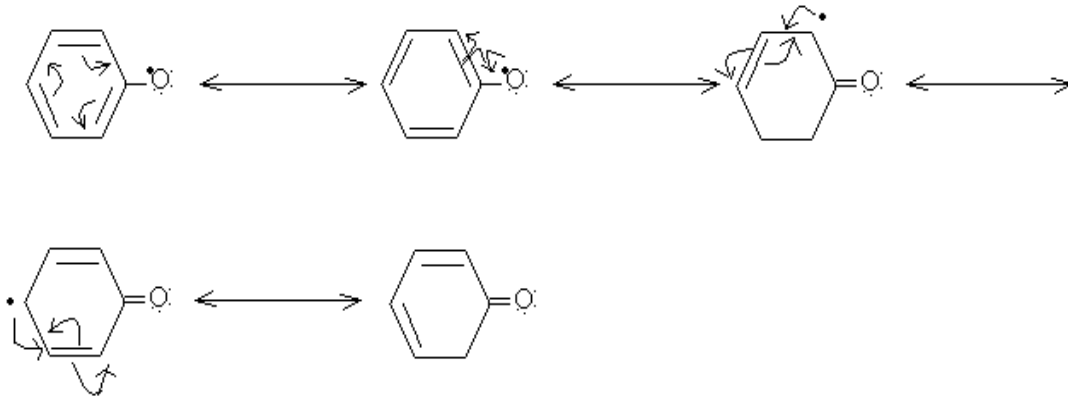
Fenolik bileşikler 80 monomerli bileşiklere kadar kondanse olabilirler ve proteinlerle kompleks oluşturarak tortu yaparlar. Bu özelliklerinden meyve suyu endüstrisinde yararlanılmaktadır. Bitkilerde fenolik bileşikler; fenolik asitler(veya fenol karbonik asitler), flavonoidler ile küçük moleküllü ve çoğunlukla uçucu olan bileşiklerdir. Bunlarda gıdaların yapılarında yer alan fenolik asitler ve flavonoidler önem taşımaktadır.

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları ,antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadır.

Fenolik bileşiklerin diğer bir özelliği de antioksidan etkileridir. Antioksidan etki fenol halkasında –OH grubu sayısı artıçça artmakta ve aynı bileşikte ise bu etki, meta, orto, para, sırası ile yükselmektedir. Aromatik halkaya bağlı OH grubu içeren fenoller, etkili antioksidanlardır, çünkü bu bileşiklerden oluşan radikaller, rezonans kararlılığına sahiptir, bu nedenle diğer radikallere göre etkin olmayan radikallerdir(58).



Fenol Radikalinin Rezonans yapıları;



Şekil-7 Fenollerin rezonans etkileşimleri

Fenolik bileşikler içinde en fazla antioksidan etkiyi gallik asit, floroglusitik asit, kafeik asit ve gentisik asit göstermektedir. Serbest radikallerin lipid, protein ve nükleik asitlere oksidatif hasar yaptığı ve kanser ile arteroskleroz dahil birçok hastalığın patogenesinde önemli olduğu bilinmektedir. Serbest radikalleri nötralize eden antioksidanlar ise, hastalıkları önlemede çok önemli rol oynamaktadır. Bazı flavonoidlerin, antioksidan aktivitesi kuvvetli olan sebze ve meyvelerde yoğun olarak bulunmaktadır. Bitkisel kökenli materyallerde bulunan fenolik bileşikler, “fenolik asitler“ ve “flavonoidler“ olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Fenolik asitler de, a) sinamik asitler (veya hidroksisünamik asitler), b) benzoik asitler (veya hidroksi benzoik asitler) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır (58).

Bitkiler (meyveler, sebzeler, tıbbi bitkiler vb) geniş çeşitlilikte serbest radikalleri emen fenolik bileşikleri (örneğin fenolik asitler, flavonoidler, quinonlar, coumarinler, lignanlar, stilbeneler, ve taninler gibi), nitrojen bileşiklerini (alkaloidler, aminler, betalainler gibi) vitaminler, terpenoidler (Kardonoidler gibi) ve anti oksidan faaliyet bakımından zengin bazı diğer endojen metabolitleri içerebilirler(59).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Hazırlanması

Şanlıurfa'da bulunan büyük marketlerde yemeklik olarak satılmakta olan mısır, ayçiçeği, fındık, soya, pamuk, naturel zeytin, riviera zeytin ve işlenmemiş saf zeytin yağlarını aldık. Alınan bu yağ örneklerinden 1/1 oranında olacak şekilde %50 (metanol-su) çözeltisi ile karıştırdık. Hazırlanan bu karışım oda sıcaklığında 1 saat boyunca vorteksle karıştırıldı. Daha sonra 5000 rpm de 20 dakika santrefüj edildi. Santrefüj sonucunda karışımımızda iki ayrı faz oluştu. Oluşan fazlardan metanollü kısmını yağ ekstraktı olarak aldık. Aldığımız bu ekstraktan yağların total fenol içeriklerini ve total antioksdant kapasitelerini ölçtük.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 1-Gallik asit (Sigma)
- 2-Folin-ciocalteu reaktifi(Sigma)
- 3-Na₂CO₃ (Merk)
- 4-Metanol(Merk)
- 5-O-Diasidine(Sigma)
- 6-ABTS (Sigma)
- 7-KCl(Merk)
- 8-H₂O₂(Merk)
- 9-Sodyum Asetat(Merk)
- 10-Asetik asit(Merk)
- 11-Trolox(Sigma)
- 12-TPTZ (Sigma)

Kullanılan kiyasallar en yüksek saflıkta idi.

3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

- 1- Abbott marka Aeroset model otomatik analizör
- 2- Jasco marka V-530 model UV/VIS spektrofotometre

- 3- Hettich marka Universal 30 RF model santrifüj
- 4- Vorteks
- 5- Sartorius marka 0.0001 g'a duyarlı hassas terazi
- 6- Hanna Marka pH metre

3.2. Yöntem

3.2.1. Toplam Fenol Ölçümü

200 µL örnekten pipetle alındı. 1000 µL 1/10 dilüe edilmiş folin-ciocalteau reaktifi üzerine bırakıldı. Tüp içersine 800 µL % 7,5 Na₂CO₃ eklendi. Standart olarak örnek yerine tüpe 1 mili molar konsantrasyonda hazırlanmış olan Galik asit eklendi. Kör olarakta %50 metanol-su solusyonundan örnek yerine eklendi. Örnekler bu işlemlere tabi tutulduktan sonra kapakları kapatılarak iki saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İki saat inkübasyonun ardından 750 nm'de spektrofotometre ile kör, standart ve numunelerinin absorbanları ölçüldü. Birim çevirimini standart olarak kullanılan milimolar Gallik asit Ekvivalent/L şeklinde çevirildi.

3.2.2. Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü (TAK) Erel-1

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur.

Fe²⁺ –o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksid ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidin radikallerini oluştururlar. Dianisidin radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir Standart olarak geleneksel olarak kullanılan vit E nin suda çözünür analogu olan Trolox kullanıldı. Ve sonuçlar mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edildi. (60).

3.2.3. Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü (TAK) Erel-2

Örneklerin toplam antioksidan kapasitesi Erel tarafından geliştirilen yöntemle ölçüldü(61). Bu yöntemde uzun ömürlü dayanıklı ABTS radikal katyonu oluşturuldu.

Karakteristik olarak mavi-yeşil renkli bu radikalın rengi antioksidantlarca redüklenerek kaybolmaktadır. Numunedeki antioksidantların renk açıcı ve/veya renksizleştirme etkisi onların toplam antioksidan kapasitesi olarak değerlendirildi. Standart olarak geleneksel olarak kullanılan Vit E nin suda çözünür analogu olan Trolox kullanıldı. Ve sonuçlar mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edildi.

3.2.4. Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü (TAK) Frap

FRAP toplam antioksidan kapasite Benzie ve Strain'in geliştirdiği metoda göre çalışıldı. 20 mikrolitre örnek 600 mikrolitre taze hazırlanmış çalışma reaktifi ile karıştırıldı (Çalışma reaktifi: 10 hacim 300 mM asetat tamponu pH 3.6 + bir hacim 10 mM TPTZ solüsyonu). 37°C de 5 dakika inkübe edildi ve absorbansı okundu. Standart olarak geleneksel olarak kullanılan vit E nin suda çözünür analogu olan Trolox kullanıldı. Sonuçlar mmol Trolox Equiv./L olarak ifade edildi(62,63,64,65).

3.2.5. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar SPSS(11) istatistik programında korelasyonlar yapıp barr grafikleri ile karşılaştırma yapılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmamızda piyasada yemeklik bitkisel yağ olarak satılan riviera, sızma ve saf zeytin yağı, fındık yağı, ayçiçek yağı, mısır yağı, pamuk yağı ve soya yağları satın alınarak metanollü ekstraktları hazırlandı. Hazırlanan bu ekstraktlarda Erel-1, Erel-2 ve Frap yöntemleriyle total antioksidan kapasiteleri ve Folin-ciocalteau reaktifiyle polifenoller ölçülmüştür.

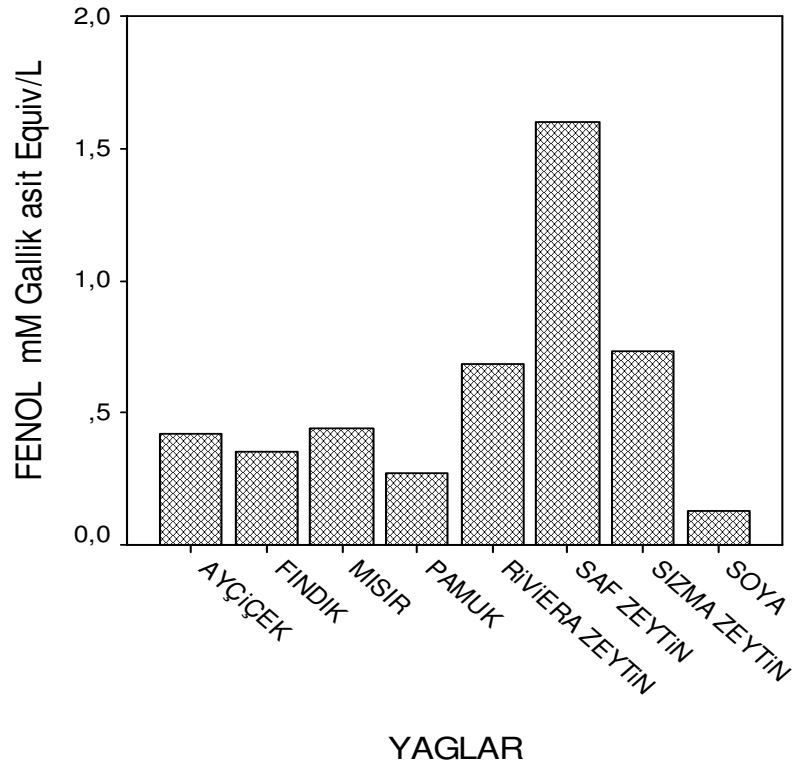
Yağ ekstraktlarında bulunan polifenol miktarlarının ölçülmesi sonucunda en fazla miktarda polifenol, saf zeytin yağında tespit edildi. Bunu sızma zeytin yağı, riviera zeytin yağı, mısır yağı, ayçiçek yağı, fındık yağı, pamuk yağı ve en az olarak soya yağında olduğu tespit edildi. Bunu birim olarak mMol Gallik Asit Equivalent/L şeklinde grafiklendirdik.(Grafik-1)

Yağ ekstraktlarında Erel-1 metoduyla yaptığımız total antioksidan kapasite ölçümünde antioksidan kapasite sıralaması en yüksek olarak saf zeytin yağı, mısır yağı, ayçiçek yağı, sızma zeytin yağı, pamuk yağı, soya yağı, riviera zeytin yağı, şeklinde olup en az fındık yağında ölçüldü. Bu ölçümler birim olarak mMol Troloks Equivalent/L şeklinde grafiklendirildi.(Grafik-2)

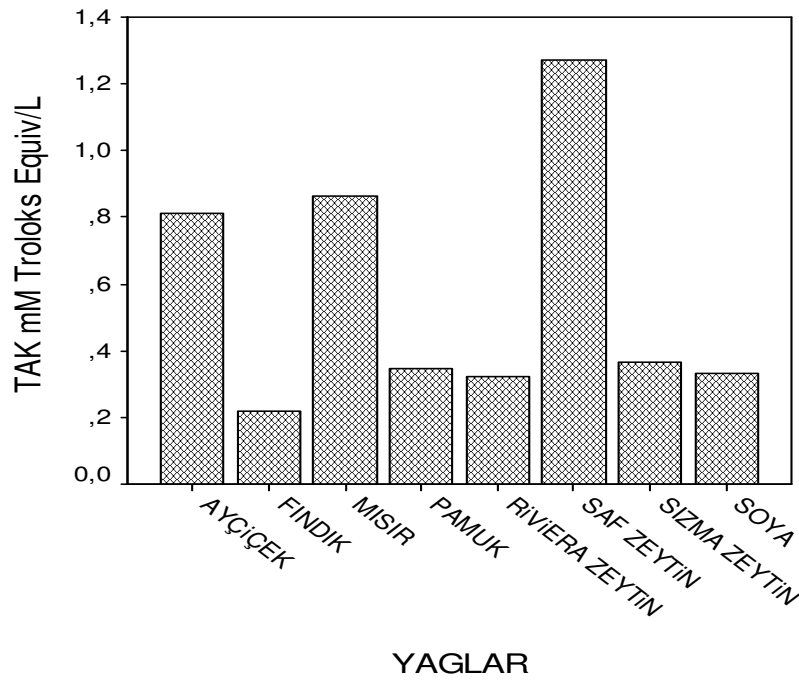
Yağ ekstraktlarında Erel-2 metoduyla yaptığımız total antioksidan kapasite ölçümünde ise antioksidan kapasite sıralaması en yüksek olarak saf zeytin yağı, ayçiçek yağı, pamuk yağı, mısır yağı, sızma zeytin yağı, riviera zeytin yağı, fındık yağı şeklinde olup en az antioksidan kapasite soya yağında ölçüldü. Bu ölçümler birim olarak mMol Troloks Equivalent/L şeklinde grafiklendirildi.(Grafik-3)

Yağ ekstraktlarında Frap metoduyla yaptığımız total antioksidan kapasite ölçümünde ise antioksidan kapasite sıralamasında en yüksek olarak mısır yağı, ayçiçek yağı, riviera zeytin yağı, saf zeytin yağı, sızma zeytin yağı, pamuk yağı, soya yağı şeklinde olup en az antioksidan kapasite fındık yağında ölçüldü. Bu ölçümler birim olarak mMol Troloks Equivalent/L şeklinde grafiklendirildi.(Grafik-4)

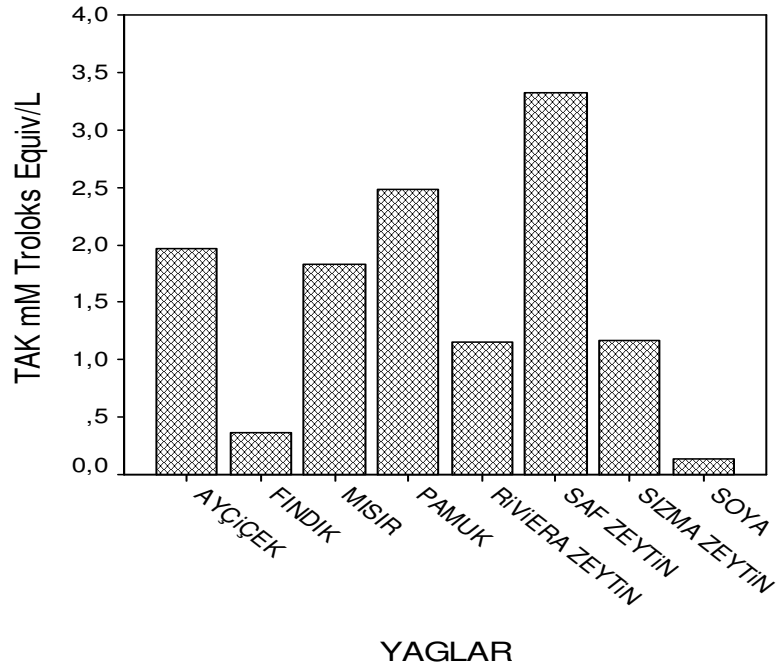
Yağ ekstraktlarımızda çalıştığımız üç ayrı TAK metodunun Fenol içerikleri ile korelasyonları yapılmış olup en yüksek değer ($r=0,700$) olarak Erel-1 ile olup bunu ($r=0,649$) Erel-2 ve en az korelasyonda ($r=0,143$) ile Frap metodunda bulundu.(Grafik-5,6,7)



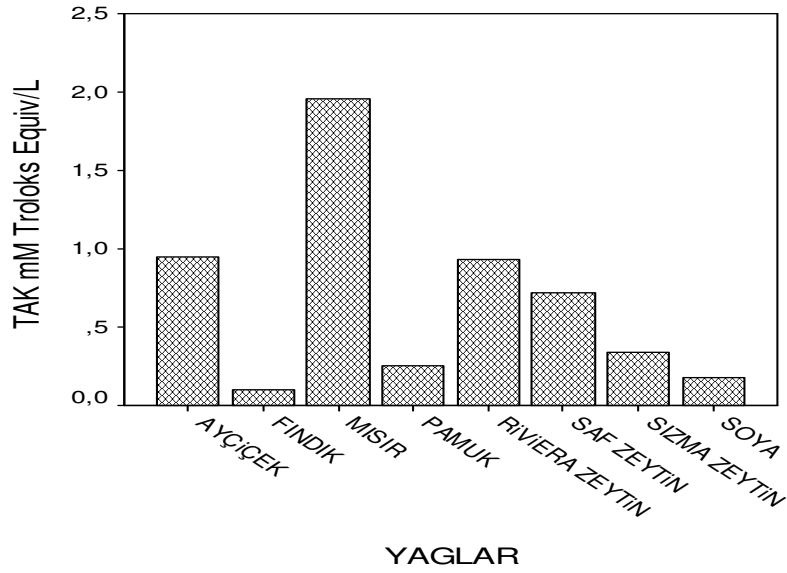
Grafik -1 Yağ Ekstraktlarının Toplam fenol İçeriğinin grafiği



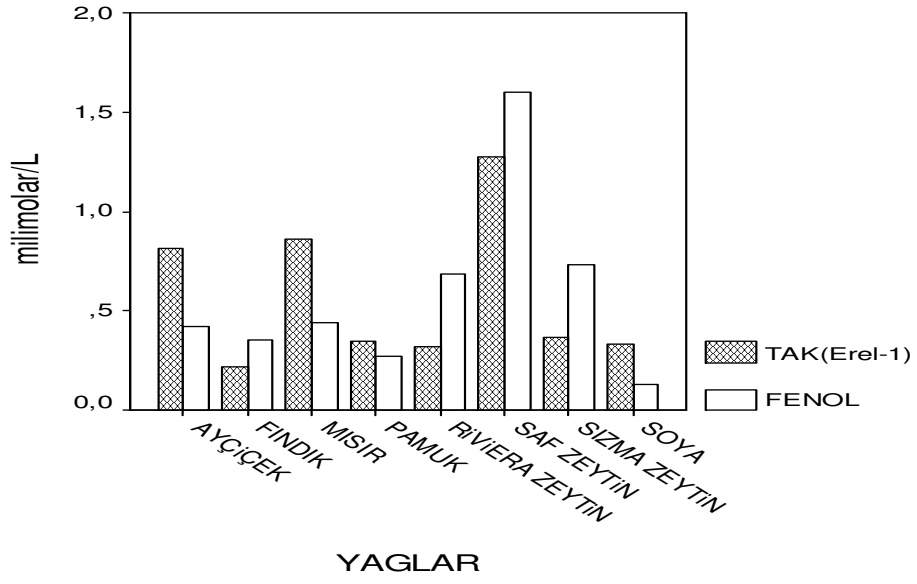
Grafik -2 Yağ Ekstraktlarının EREL-1'e göre TAK (Toplam Antioksidan Kapasite)



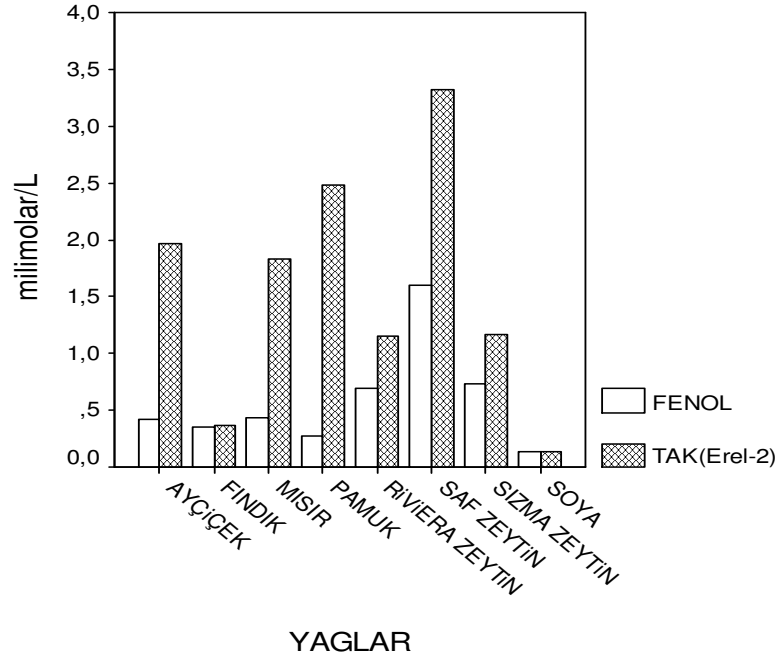
rafik -3 Yağ Ekstraklarının EREL-2' e göre TAK (Toplam Antioksidan Kapasite)



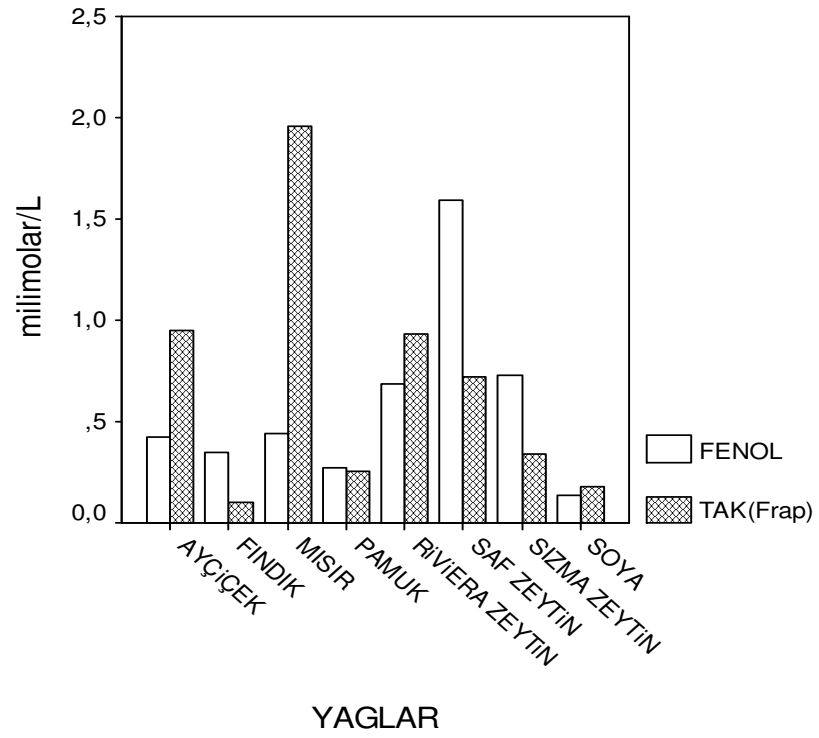
Grafik -4 Yağ Ekstraklarının FRAP'a göre TAK (Toplam Antioksidan Kapasite)



Grafik -5 Yağ Ekstraklarının FENOL- TAK(Erel-1) ile karşılaştırma grafiği



Grafik -6 Yağ Ekstraklarının FENOL- TAK(Erel-2) ile karşılaştırma grafiği



Grafik -7 Yağ Ekstraklarının FENOL- TAK(Frap) ile karşılaştırma grafiği

5. TARTIŞMA SONUÇ

Temel gıdalarımızdan olan yağlarda stabiliteyi etkileyen en önemli bileşikler antioksidan olarak bilinen tokoferol, sesamol, gossipol ve ferulik asit gibi bileşiklerdir. Nötral katı ve sıvı yağlar yapılarında bulunan bu bileşiklerden dolayı saf trigiliseritlere göre oksidatif bozulmaya daha dayanıklıdırlar. Tokoferoller pek çok bitkisel yağda doğal olarak bulunan önemli iz bileşenlerdir. Bunlar oksitlenmeyi geçiktirici olarak görev yaparlar. Tokoferoller ayrıca yağda çözünen E vitamininin kaynağıdırlar. Bunlar aromatik tokol halkasına bağlanan $-CH_3$ gruplarının yeri ve sayısı değişerek meydana gelen yedi çeşit tokoferolden oluşan bileşiklerdir(5).

Tokoferoller arasında α -tokoferol en yüksek E vitaminine sahiptir. Tokoferollerin antioksidan aktivitelerinin azalış düzeni delta, beta, gama ve alfa sırasını takip eder(5). Yağlarda yaygın olarak bulunan tokoferollerin yanı sıra bazı yağların özel antioksidanları vardır. Susam yağında az miktarda tokoferol yanında sesamolin, sesamin ve sesamol içerir. Susam yağındaki bu antioksidanların etkinlik dereceleri sesamol, sesamolin ve sesamin şeklindedir. Özel antioksidanlardan biride ham pamuk yağında bulunan gossipol'dür. Gossipol kompleks fenolik bir bileşiktir. Çok kuvvetli bir antioksidan olan gossipol toksik etkisinden dolayı rafinasyon ile yağdan uzaklaştırılır. Fosfatidlerde yağda squalen, ferulik asit, tokoferol veya diğer fenolik tipteki bileşiklerle birlikte bulunduğu antioksidan aktiviteye sahiptir(5).

İnsan vücudu serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşı birçok savunma mekanizmasına sahiptir. Organizmada normalde oksidan ve antioksidanlar arasında bir denge söz konusudur. İnternal veya eksternal faktörlere bağlı olarak üretilen reaktif oksijen radikallerine karşı organizmada internal ve eksternal antioksidan savunma sistemleri vardır. Antioksidan savunma sisteminde herhangi bir yetmezlik dengenin oksidanlar lehine kaymasına neden olmaktadır(1).

Yağların yapılarındaki bu antioksidan bileşikler vücudun oksidan-antioksidan dengesi açısından önemlidirler. Bir çok hastalığın etiolojisinde vücudun antioksidan aktivitesinin azaldığı ileri sürülmektedir. Vücudun antioksidan düzeyinin yüksek olması aterosikloris, kanser, erken yaşlanma ve lipit peroksidasyonunu önlemede etkin rol oynar(1).

Yapmış olduğumuz çalışmada üç farklı metodla yapılan ölçümde Erel'in geliştirmiş olduğu iki ayrı yöntemde saf zeytin yağının toplam antioksidan kapasitesi en yüksek olarak bulunurken Frap'ın yönteminde ise mısır yağının toplam antioksidan kapasitesi en yüksek olarak bulundu.

Daha önce yapılan çalışmalar farklı ölçüm metotlarında antioksidan aktivitelerin farklılık gösterebileceğini ortaya koymuştur(66).

Bizim çalışmamızda toplam antioksidan kapasite(TAK) farklı metodlarda saf zeytin yağı ve mısır yağında en fazla bulunurken Pellegrini ve arkadaşları bitkisel yağların (TAK)'ları ile ilgili yapmış oldukları bir çalışmada en yüksek TAK'ın soya yağında ardından saf zeytin yağında en az olarak yer fıstığı yağının geldiğini belirtmişler(67).

Buna benzer Valavanidis ve arkadaşlarının bitkisel yağlarda yapmış oldukları bir çalışmada soya yağının TAK'nın saf zeytin yağından daha yüksek olduğunu ve bunun da soya yağının bileşimindeki gamma ve delta tokoferollerden kaynaklandığını belirtmişlerdir(68).

Jose ve arkadaşlarının bitkisel yağlardan saf zeytin yağı, rafine zeytin yağı ve ayçiçek yağı ile yapmış olduğu bir çalışmada (TAK)nın en fazla saf zeytin yağı sonrasında sıralamanın ayçiçek yağı ve rafine zeytin yağı şeklinde olduğunu ortaya koymuşlar. Yalnız yağların kızartma işlemine tabi tutulmasından sonra sıralamada ayçiçek yağı ile rafine zeytin yağının sıralamasının değiştiğini ve bunun nedeninin yağların yapısındaki fenolik bileşiklerin farklılığından ileri geldiğini belirtmişler(69).

Yapmış olduğumuz çalışmada üç farklı metodla toplam antioksidan kapasite ölçümlerinde Erel'in geliştirmiş olduğu iki metotta en yüksek antioksidan kapasite saf zeytin yağında bulunurken bunu sızma ve riviera zeytin yağıtakip ederken en az antioksidan kapasite ise soya ve fındık yağlarında tespit edildi. Frap'ın metodunda ise en yüksek antioksidan kapasite mısır ve ayçiçek yağların da en az antioksidan kapasite ise soya yağında tespit edildi.

Juan Carlos ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada fındık yağı ile zeytin yağının benzer yapıda yağ asidi içerdiğinden zeytin yağına alternatif

olabileceğini ve bununda ötesinde fındık yağının yapısındaki tokoferol içeriğinden dolayı güneş ışığından zeytin yağına oranla daha az etkilendiğini. Buna ilaveten fındık yağının serbest radikal toplama lak fazının daha uzun olduğunu ve bu özelliklerinden dolayı fındık yağının sağlık açısından büyük öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir(72).

Yaptığımız çalışmada saf zeytin yağı, sızma zeytin yağı, riviera zeytin yağı, mısır yağı ve ayçiçek yağının hem toplam antioksidan kapasiteleri hem de toplam fenol içerikleri fındık yağından fazla olduğunu tespit ettik. Bundan dolayı saf zeytin yağı, sızma zeytin yağı, riviera zeytin yağı, mısır yağı ve ayçiçek yağının fındık yağından sağlık açısından daha fazla yarar sağlayacağını düşünüyoruz.

Daha önce yapılan çalışmalar farklı ölçüm metotlarında antioksidan aktivitelerin farklılık gösterebilecekleri söylenmişti(66). Bunun yanı sıra çalışmamızda yağların toplam fenollerini ile toplam antioksidan kapasitelerini üç farklı metodla ayrı ayrı korelasyonu yapıldı bu ilişki Erel metodlarıyla ($r = 0.700$ ve $r = 0.649$) iken Frap ile korelasyon da ($r = 0.143$) olarak bulundu. Yağların antioksidan özelliklerinin büyük çoğunluğu yapılarındaki fenolik bileşiklerden kaynaklandığı bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada fenollerle pozitif korelasyonundan dolayı Erel metodlarının toplam antioksidan kapasitelerinin ölçme hasasiyetinin daha fazla olduğunu söyleyebiliriz.

Bu çalışmamızı destekleyen benzer bir çalışma Shela ve arkadaşlarının zeytin yağlarını kullanarak yapmış oldukları ve dört ayrı metotla yapılan antioksidan kapasite ölçümlerinin tümünde en fazla antioksidan kapasitenin saf zeytin yağında olduğunu gözlemişler(70).

Yağ ekstraktarında bulunan polifenol miktarlarının ölçülmesi sonucunda en fazla miktarda polifenol, saf zeytin yağında tespit edildi. Bunu sızma zeytin yağı, riviera zeytin yağı, mısır yağı, ayçiçek yağı, fındık yağı, pamuk yağı ve en az olarak soya yağı şeklinde olduğunu tespit edildi.(Grafik -4-1)

Briante ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada. Fenol bileşiklerinin serbest radikalleri toplayarak antioksidan özellik gösterdiklerini. Fenollerden 3,4 veya 2,5 dihidroksil fenollerin bakır şelatörlüğü yaparak Cu^{+2} yi redükleyerek oksidan reaksiyonları önlemede etkili olduklarını ortaya koymuşlardır(71).

Moschandreas ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada plazma toplam antioksidan direncinin, protein oksidasyon markırı olan protein-SH konsantrasyonunun lipit oksidasyonu markırı malondialdehit ve lipit hidroperoksit konsantrasyonunun yüksek fenol içerikli zeytin yağıyla yapılan diyetle önemli bir ilişkinin olduğunu belirtmişlerdir(74).

Carmen ve arkadaşlarının yapmış olduğu in vivo bir çalışmada Periferel damar hastalığı olan kişilerde saf zeytin yağının LDL oksidasyonunu önlemede rafine edilmiş zeytin yağından daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır(75).

Farklı gıdalarda antioksidan içeren farklı bileşiklerin var olduğunu ve bu antioksidan içeren gıdalarla beslenmenin hastalıkların oluşumuna karşı koruyucu etkisi olduğu bilinmektedir(73).

Elde edilen sonuçlara göre, bitkisel sıvı yağarda yapmış olduğumuz çalışmanın sonucu olarak antioksidan içeriği ve toplam fenol içeriği en fazla olan saf zeytin yağı ve diğer zeytin yağları olduğunu tespit ettik. Bunların gıda olarak kullanımının artırılması kuşkusuz, aterosikloriz, kanser ve diyabet gibi pek çok aksaklığın açığa çıkmasını önlemede ya da geciktirilmesinde yararlı olabileceği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- 1- Ki Young Lee, Susan T. Weintraub And Byung Pal Yu Isolation And Identification Of A Phenolic Antioxidant From *Aloe Barbadensis*, *Free Radical Biology And Medicine*, Volume 28, Issue 2, 15 January 2000, Pages 261-265.
- 2- Çolakoglu,M.,. Yağların Beslenmedeki önemleri,bileşimleri ve damar sertliği ile ilgileri. Türkiye 2. Yağ Semineri Türkiye Ticaret Odaları, Sanayii Odaları ve Borsaları birliği matbaası. Ankara, 45-58. 1963
- 3- Kayahan, M., a. Sağlıklı Beslenme ile Yenilen Bitkisel Yağ Niteliği arasındaki ilişkiler , İzmir Gıda ve Tarım Fuarı, İzmir. 1981
- 4- Babayan, V.K. ,. Sense and Nonsense About Fats in the Diet. Food Technology. No: 180 Deerfield, ill. 1989
- 5- Nas S, Gökalp H.Y., Ünsal M; Bitkisel Yağ Teknolojisi Üçüncü baskı Mühendislik Fakültesi Yayınları, Denizli, 2001
- 6- Karabulut, F.: Bitkisel Yağ Üretiminde Ele Geçen Atık Vakum Yağından E Vitamini Üretimi; Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniv. Fen Bilimleri , Kimya anabilim Dalı Edirne. 1997
- 7- [Yun Ys, Nakajima Y, Iseda E, Kunugi A.](#), 2003,Determination Of Antioxidant Activity Of Herbs By Esr.Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2003 Feb;44(1):59-62.
- 8- Bilim Ve Teknik Dergisi (1996)Ekim 347:98-100.
- 9- Isbir T.Antioksidan Sistemler.Endotel ,İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu,İzmir: 1994,92-98.

- 10-** Fridovich I.: Superoxide Dismutases. *Adx. Enzymol.* 58: 61-64 (1986)
- 11-** Lunec J, Blake D. Oxygen Free Radicals: Their Relevance To Disease Processes. In: Cohen D, Lewis B, Albert Kgmm. *The Metabolic And Moleküler Basis Of Acquired Disease.* Balliere Tindall, London 1990:189-212
- 12-** [Somova Lo, Nadar A, Rammanan P, Shode Fo.](#), 2003. Cardiovascular, Antihyperlipidemic And Antioxidant Effects Of Oleanolic And Ursolic Acids In Experimental Hypertension. *Phytomedicine.* 2003 Mar;10(2-3):115-21.
- 13-** Nielsen F, Mikkelsen Bb, Nielsen Jb, Andersen Hr, Grandjean P Plasma Malon Dialdehyde As Biomarker For Oxidative Stres: Reference Interval And Effects Of Life-Style Factors *Clin Chem:* (1997), 43 (7):1209-1
- 14-** L. Campanella, A. Bonanni And M. Tomassetti; Determination Of The Antioxidant Capacity Of Samples Of Different Types Of Tea, Or Of Beverages Based On Tea Or Other Herbal Products, Using A Superoxide Dismutase Biosensor, *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis, Volume 32, Issues 4-5, 8 August 2003, Pages 725-736*
- 15-** [Ko Km, Lam By.](#) ,. Schisandrin B Protects Against Tert-Butylhydroperoxide Induced Cerebral Toxicity By Enhancing Glutathione Antioxidant Status In Mouse Brain. *Mol Cell Biochem.* 2002 Sep;238(1-2):181-6.
- 16-** Hochstein P.; Atallah As.: The Nature Of Oxidant And Antioxidant Systems In The Inhibition Of Mutation And Cancer. *Mut. Res.* 1988 202 : 363-75
- 17-** Salin MI, McCoard Jm Free Radical And Inflammation; Protection Of Phagocytosing Leukocytes By superokside Dismutase. *J Clin Invest:* 1975 56, Nov. 1319
- 18-** Cros Ce.; Halliwell B.; Borish Et . Et Al: Oxygen Radicals And Human Disease. *Annals . Int. Med.* 1987, 107: 526 – 45

- 19- [Gebhardt R.](#), Antioxidative, Antiproliferative And Biochemical Effects In Hepg2 Cells Of A Homeopathic Remedy And Its Constituent Plant Tinctures Tested Separately Or In Combination. *Arzneimittelforschung*. 2003;53(12):823-30.
- 20- [El Sn, Karakaya S.](#) Radical Scavenging And Iron-Chelating Activities Of Some Greens Used As Traditional Dishes In Mediterranean Diet. *Int J Food Sci Nutr*. 2004 Feb;55(1):67-74.
- 21- [Zeng Hh, Tu Pf, Zhou K, Wang H, Wang Bh, Lu Jf.](#), Antioxidant Properties Of Phenolic Diterpenes From Rosmarinus Officinalis. *Acta Pharmacol Sin*. 2001 Dec;22(12):1094-8.
- 22- Anderson Me; Meister A.: Glutathione Moesters. *Anal. Biochem*. 1989,183: 16–20
- 23- Halliwell B: Reactive Oxygen Species In Living Systems: Source, Biochemistry And Role In Human Disease. *Am. J. Med*. 1991, 91(3c):145 – 225
- 24- Akkuş İdris (1995): Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri P : 1-3,5
- 25- [Matsingou Tc, Petrakis N, Kapsokefalou M, Salifoglou A.](#), Antioxidant Activity Of Organic Extracts From Aqueous Infusions Of Sage. *J Agric Food Chem*. 2003 Nov 5;51(23):6696-701.
- 26- Cheeseman Kh, Slater Tf. An Introduction To Free Radical Biochemistry. *Br. Med. Bull* 1993;49(3):479-80
- 27- Muggli, D. Physiological Requirements Of Vitamen E As A Function Of The Amount And Type Of Polyunsaturated Fatty Acid. *Fatty Acids Ana Lipids*. 1994;Vol 75, Pp 166 – 168.

- 28-** A23- [Thornhill Sm, Kelly Am.](#), Natural Treatment Of Perennial Allergic Rhinitis. *Altern Med Rev.* 2000 Oct;5(5):448-54. Review
- 29-** A21- [Ozen T, Korkmaz H.](#), Modulatory Effect Of *Urtica Dioica* L. (Urticaceae) Leaf Extract On Biotransformation Enzyme Systems, Antioxidant Enzymes, Lactate Dehydrogenase And Lipid Peroxidation İn Mice. *Phytomedicine.* 2003;10(5):405-15. Pmid: 12834006 [Pubmed - Indexed For Medline.
- 30-** Mccord Jm Human Disease, Free Radicals And The Oxidant/Antioxidant Balance. *Clin Biochem* 1993;26: 351-7
- 31-** Cemeroğlu B.,Yemenicioğlu A.,Özkan M.,Meyve Ve Sebzelerin Bileşimi Soğukta Depolanmaları 2001;76-78
- 32-** D. Bandonien, A. Pukalskas, P. R. Venskutonis And D. Gruzdien; Preliminary Screening Of Antioxidant Activity Of Some Plant Extracts İn Rapeseed Oil, *Food Research International, Volume 33, Issue 9, 2000, Pages 785-791*
- 33-** [Miura K, Kikuzaki H, Nakatani N.](#), Antioxidant Activity Of Chemical Components From Sage (*Salvia Officinalis* L.) And Thyme (*Thymus Vulgaris* L.) Measured By The Oil Stability Index Method. *J Agric Food Chem.* 2002 Mar 27;50(7):1845-51. 02.
- 34-** Halliwell B.; Gutteridge Jmc.: Lipid Peroxidation,Oxygen Radicals, Cell Damage And Antioxidant Therapy. *The Lancet* 1984;June 23: 1396-97
- 35-** Nielsen F, Mikkelsen Bb, Nielsen Jb, Andersen Hr, Grandjean P; Plasma Malon Dialdehyde As Biomarker For Oxidative Stres: Reference İnterval And Effects Of Life-Style Factors *Clin Chem* 1997; 43 (7): 1209-14
- 36-** Arıcıoğlu Aysel : Serbest Oksijen Radikalleri Ve Hücre Hasarı 1994; 2/3. P : 139-242

- 37-** Spallholz Je. Selenium And Glutathione Peroxidase :Essential Nutrient And Antioxidant Component Of The Immune Systems. *Adv Exp Med Biol* 1990;262:145-58
- 38-** Mooradian Ad, Lung Cc, P Innes Jc Glycosylation Enhances Malondialdehyde Binding To Proteins. *Free Radical Biol Med* 1996; 21(5):699-701.
- 39-** A19- [Gulcin I, Kufrevioglu OI, Oktay M, Buyukokuroglu Me.](#), Antioxidant, Antimicrobial, Antiulcer And Analgesic Activities Of Nettle (*Urtica Dioica L.*). *J Ethnopharmacol.* 2004 Feb;90(2-3):205-15.
- 40-** Liebler, C.D.: Antioxidant Reactions Of Carotenoids. *Annals New York Academy Of Sciences* 1994; P: 20–30.
- 41-** Darper Hh, Hadley M. Malondialdehyde Determination As Index Of Lipid Peroxidation. *Methods In Enzymology* 1990;186:421-431.
- 42-** [Baranauskiene R, Venskutonis Pr, Viskelis P, Dambrauskiene E.](#), Influence Of Nitrogen Fertilizers On The Yield And Composition Of Thyme (*Thymus Vulgaris*). *J Agric Food Chem.* 2003 Dec 17;51(26):7751-8.
- 43-** [Stanely Mainzen Prince P, Kamalakkannan N, Menon Vp.](#) Syzigium Cumini Seed Extracts Reduce Tissue Damage In Diabetic Rat Brain. *J Ethnopharmacol.* 2003 Feb;84(2-3):205-9.
- 44-** Seven A, Candan G; Radikal Ve Lipid Peroksid Düzeyini Artıran Etkenler. *Biyokimya Dergisi* 1995; 4:43-56.
- 45-** 86-A25- [Zhang Jt.](#), New Drugs Derived From Medicinal Plants. *Therapie.* 2002 Mar-Apr;57(2):137-50.

- 46- [Ozcan M.](#), Antioxidant Activities Of Rosemary, Sage, And Sumac Extracts And Their Combinations On Stability Of Natural Peanut Oil. *J Med Food*. 2003 Fall;6(3):267-70.
- 47- Halliwell B.; Gutteridge Jmc.: Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metal And Disease *Biochem* 1984; J. 219 : 1 – 14
- 48- Reznick Az, Cross Ce, Hu MI, Suzuki Yj, Khwaja S, Safadi A Et All Modification Of Plasma Proteins By Cigarette Smoke As Measured By Protein Carbonyl Formation. *Biochem J* 1992; 286: 607-611
- 49- [Czinner E](#), [Kery A](#), [Hagymasi K](#), [Blazovics A](#), [Lugasi A](#), [Szoke E](#), [Lemberkovics E.](#), Biologically Active Compounds Of *Helichrysum Arenarium* (L.) Moench. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 1999 Oct-Dec;24(4):309-13.
- 50- A22- [Pieroni A](#), [Janiak V](#), [Durr Cm](#), [Ludeke S](#), [Trachsel E](#), [Heinrich M.](#), In Vitro Antioxidant Activity Of Non-Cultivated Vegetables Of Ethnic Albanians In Southern Italy. *Phytother Res*. 2002 Aug;16(5):467-73.
- 51- Bast A, Goris Rja Oxidative Stres, Biachemistry Anahuman Disease. *Pharm Weekbl (Sci)* 19891;1(6): 199-206
- 52- Santos-Gomes Pc, Seabra Rm, Andrade Pb, Fernandes-Ferreira M., Chemical And Antioxidant Properties Of *Laurocerasus Officinalis* Roem. (Cherry Laurel) Fruit Grown In The Black Sea Region. *J Agric Food Chem*. 2003 Dec 3;51(25):7489-94.
- 53- P. Stanely Mainzen Prince, Venugopal P. Menon And L. Pari Hypoglycaemic Activity Of *Syzigium Cumini* Seeds: Effect On Lipid Peroxidation In Alloxan Diabetic Rats, *Journal Of Ethnopharmacology, Volume 61, Issue 1, May 1998, Page1-7*
- 54- Sies, H., Stahl, W., Sunquist, A.: Antioxidant Functions Of Vitamins *Annals*. New York Academy Of Sciences P 1994; 7- 20.

- 55-** Richardson Js. Oxygen Free Radicals And Brain Dysfunction Intern J Neuroscience 1991; 57:1-17
- 56-** Tappel, A.L, Dillard. J.C.: In vivo Lipid Peroxidation Measurement Via Exhaled Pentane And Protection By Vitamin E. Federation Proceedings 1981;Vol 40 No 2p. 174 – 178
- 57-** Lun G.; Dale Gl.; Butler E.: Transport Accounts For Glutathione Turnover In Human Erythrocytes. Biochem Biophys. Res Comm. 1986;139 : 538 – 44
- 58-** Southorn P., Powis G.: Free Radical In Medicine.II. Involvement In Human Disease. Mayo Clin. Pro. 1988; 63 : 390 – 408
- 59-** Mccord Jm Human Disease, Free Radicals And The Oxidant/Antioxidant Balance. Clin Biochem 1993; 26: 351-7
- 60-** Erel O; A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clinical Biochemistry ; 37; 112– 119
- 61-** Erel, O., *A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation.* Clin Biochem, 2004. **37**(4): p. 277-85.
- 62-** S. Karakaya, S.N. El, A.A. Taş. Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds, International Journal of Food Sciences and Nutrition. 2001; 52, 501-508
- 63-** Benzie, F.F.I., Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant Power: The FRAP Assay. Analytical biochemistry. 1996; 239; 70-76

- 64-** Lena M.Goh, Philip J. Barlow and Chee S. Yong ; Examination of antioxidant activity of Ginkgo biloba leaf infusions; Elsevier Science, 2003 82.2 275-282
- 65-** Ivor E. Dreosti; Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine; Nutrition Volume 16 , Issues 7-8, 2000; 692-694
- 66-** Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, Deemer E. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power(FRAP) assays: a comparative study. J Agric Food Chem 2002;11:3122-8.
- 67-** Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. J Nutr. 2003 Sep;133(9):2812-9
- 68-** Valavanadis A, Nisiotou C, Papageorgiou Y, Kremlí I, Satravelas N, Zinieris N, Zygalki H. Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and after thermal treatment. J Agric Food Chem. 2004 Apr 21;52(8):2358-65
- 69-** Jose L. Quiles, M. Carmen Ramirez- Tortosa, J Alfonso Gómez, Jesus R. Huertas, Jose Mataix. Role of vitamin E and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured by ESR, of virgin olive , olive and sunflower oils after frying Food Chemistry ;76. 461-468
- 70-** Shela Gorinstein, Olga Martin-Belloso, Elena Katrich, Antonin Lojek, Milan Ciz, Nuria Gligelmo-Miguel, Ratiporn Haruenkit, Yong-Seo Park, Soon-Teck Jung, Simon Trakhtenberk. Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. Journal of Nutritional Biochemistry 2003;14. 154-159.

71- Briante R, Febbraio F, Nucci R. Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet. *J Agric Food Chem.* 2003 Nov 19;51(24):6975-81.

72- Juan Carlos Espin, Cristina Soler-Rivas and Harry J. Wichers. Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48, 648-656

73- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr.* 2003; Sep;133(9):2812-9

74- J Moschandreas, MN Vissers, S Wiseman, KP van Putte and A Kafatos. Extra virgin olive oil phenols and markers of oxidation in Greek smokers: a randomized cross-over study *European Journal of Clinical Nutrition* 2002; 56, 1024-1029

75- M. Carmen Ramirez-Tortosa, Gloria Urbano, Maria López-Jurado, Teresa Nestares, Maria C. Gomez, Amalia Mir, Eduardo Ros, Jase Mataix and Angel Gil. Extra-Virgin Olive Oil Increases the Resistance of LDL to Oxidation More than Refined Olive Oil in Free-Living Men with Peripheral Vascular Disease *American Society for Nutritional Sciences* 2002;3166/99