

ÖZET

TİP II DİYABET RİSKİNİ AZALTMA ÖZELLİĞİNE SAHİP FONKSİYONEL GIDA KATKI MADDESİ

- 5 Buluş, tip II diyabet riskini azaltma özelliğine sahip fonksiyonel (antimikrobiyal, antikanser aktivite gösteren, fenolik ve antioksidanca zengin) karaçam ağaç kabuk ekstralarını içeren gıda sanayisinde katma değeri yüksek yeni bir gıda katkı maddesinin elde edilmesi yöntemi ve hedef sağlık etkinlikleri ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. TİP II diyabet riskini azaltan fonksiyonel gıda katkı maddesi olup özelliği; karaçam ağaç (*Pinus nigra*) kabuğundan ekstrakte edilen biyoaktif bileşenleri içermesidir.
- 5 2. İstem 1'e uygun gıda katkı maddesi olup özelliği; sıvı veya toz formunda olmasıdır.
3. İstem 2'e uygun toz formda gıda katkı maddesinin hazırlanma yöntemi olup özelliği;
 - a) Karaçam ağaç kabuklarının parçacık boyutu 1 mm'den küçük olacak şekilde öğütülmesi,
 - 10 b) Ultrasonik destekli ekstraksiyon sistemi ile ekstraksiyon sıcaklığı 20-40 °C, ekstraksiyon süresi 3-9 dk. ve ultrasonik güç 50-150 W koşullarında ayarlanarak alkol: su karışımı içerisinde karaçam ağaç kabuklarından biyoaktif bileşenlerin elde edilmesi
 - c) Dondurucu kurutucuda kurutularak içerisindeki alkolün uzaklaştırılması ve toz haline getirilmesi
- 15 İşlem adımlarını içermesidir.
4. İstem 3'e uygun yöntem olup özelliği; b adımıdaki ekstraksiyon koşullarının 34.33°C ekstraksiyon sıcaklığı, 6.89 dk ekstraksiyon süresi ve 98.45 W ultrasonik güç olarak ayarlanmasıdır.
5. Gıda ürünü olup özelliği; İstem 1 veya 2'ye uygun gıda katkı maddesini içermesidir.
- 20 6. İstem 2'ye uygun gıda katkı maddesi olup özelliği; α -D-glukozidaz enzimini inhibe etmesidir.
7. İstem 2'ye uygun gıda katkı maddesi olup özelliği; antimikrobiyal ajan olarak kullanılmasıdır.
8. İstem 2'ye uygun gıda katkı maddesi olup özelliği; antikanser ajan olarak
- 25 kullanılmasıdır.
9. İstem 2'ye uygun gıda katkı maddesi olup özelliği; antidiyabetik ajan olarak kullanılmasıdır.

TARİFNAME

TİP II DİYABET RİSKİNİ AZALTMA ÖZELLİĞİNE SAHİP FONKSİYONEL GIDA KATKI MADDESİ

Buluşun İlgili Olduğu Alan

- 5 Buluş, tip II diyabet riskini azaltma özelliğine sahip destekleyici ve takviye edici olarak kullanılabilecek gıda katkı maddesi ve onun hazırlanma yöntemi ile ilgilidir.

Buluşla ilgili Tekniğin Bilinen Durumu (Önceki Teknik)

- 10 Türkiye bulunduğu coğrafi konum ve iklim özellikleri nedeniyle çok çeşitli bitki türlerine sahiptir. Tedavi edici alternatifler olarak hastalıkların tedavisinde ve sağlığın korunmasında şifalı bitkilerin rolü dünya çapında ve ülkemizde de hızla ilerlemektedir. İnsan sağlığı için bitkilerin ne kadar önemli olduğu ve hastalıklara şifa bulma noktasında insanlık tarihinin ilk zamanlardan günümüze kadar el üstünde tutulduğu bilinmektedir.

- 15 Ülkemiz sahip olduğu ekolojik koşullar sebebiyle birçok bitki türünün ana vatanı konumundadır. 11 binin üzerinde bitki çeşitliliği ile büyük bir zenginliğe sahip Türkiye’de, tıbbi ve aromatik bitkiler, bu zenginliğin önemli bir parçasıdır. Onlarca çeşidi ticarete konu olan tıbbi ve aromatik bitkilerin ihracatından Türkiye 300 milyon dolardan fazla kazanç sağlamaktadır. Ülkemizde doğadan toplanan tür ve çeşitler ile iç piyasada ticarete konu olan bitki sayısı yaklaşık 350 kadardır.

- 20
- Bu bitkilerden de yaklaşık 100 kadarının ihracatı yapılmaktadır.
 - Yıllar içinde değişim göstermekle birlikte Türkiye’de 20 çeşit tıbbi ve aromatik bitkinin 1,3 milyon dekar alanda tarımı yapılmaktadır.
 - Üretim miktarı bakımından siyah çay, kırmızıbiber, haşhaş, kimyon, nane, kekik, yağlık gül ve anason ilk sıralarda yer almaktadır.
- 25
- Bu bitkilerden 53 tanesi doğal bitki çayı olarak tüketilmektedir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler ilaç olarak geleneksel ve modern tıpta hastalıkların önlenmesi, iyileştirilmesi ve sağlığın sürdürülmesi için kullanılmaktadır. Aynı zamanda besin takviyeleri, bitkisel çay, tat, çeşni olarak beslenmede de faydalanılmaktadır. Parfüm, vücut bakım ürünleri olarak parfümeri ve kozmetikte kullanılmasının yanı sıra, parlaticılar hatta böcek ilaçları olarak

sanayinin farklı kollarında geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Bu bitkilerin kurutulmuş olarak hazırlanmış kök, yaprak, kabuk, çiçek, tohum, meyve kısımlarından yararlanılmaktadır.

Tıbbi ve aromatik bitkilerin hemen hemen her alanda kullanımı mevcut olup bunlar biyolojik kültürel ve endüstriyel kaynaklar olarak değerlendirilmektedir. Yapılan araştırmalara göre son yıllarda bu kaynaklara talebin oldukça arttığı bilinmekte ve gelecekte artmaya devam edeceği öngörülmektedir. Bunun başlıca nedeni, bu bitkilerin tıp ve sağlık alanında sentetik yolla elde edilen etkin maddelerine göre çok yönlü etkiye sahip olması ve yan etkilerinin bulunmamasıdır.

Her sektörde olduğu gibi ülkelerin gelişmişlik düzeyine göre bitkilerin tedavi amaçlı kullanımı değişiklik göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i tedavi amaçlı bitkisel ürünlerden faydalanmaktadır. Asya, Afrika ve Orta Doğu gibi bölgelerin bazı ülkelerinde bu oran %95'e kadar çıkmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise bu oran daha az olup Almanya'da %40-50, ABD'de %42, Avustralya'da %48 ve Fransa'da %49'dur. (Titz, 2004, s: 72-80) Ancak tıbbi bitkilerin en önemli ticaret merkezleri de Almanya, ABD, Japonya ve İngiltere'de bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından ilerleyen yıllarda dünya genelinde bitkilerle tedavilerin artacağı öngörülmektedir. Genel olarak tıbbi ve aromatik bitkilerin ticareti en fazla kurutulmuş şekilde, daha sonra uçucu yağ ve taze olarak yapılmaktadır.

Dünya çapında tip 2 diyabetli kişilerin yaklaşık %90-95'i insülin direncine bağlı olarak yüksek ve/veya dalgalı kan şekeri seviyeleri ile karakterizedir. Obezite ve uygun bir yaşam tarzına ve özellikle beslenme özelliklerine sahip olmama yoğun olarak kandaki glikoz konsantrasyonunun artmasına ve ardından yüksek kan kolesterolü ve kan basıncını içeren vasküler bozukluklara neden olabilmektedir.

GI (Glisemik indeks), çeşitli gıdalardan tespit edilen karbonhidratlardan oluşur. Bazı gıdalar kan şekerini hızlı bir şekilde yükseltirken, bazıları bunu hafifçe artırabilir. Bazılarında glikoz gibi basit şekerler, bazılarında ise modifiye ve dirençli nişastalar, lifler vb. içeren karmaşık gıdalar içeren temel gıdalarla ilgilidir. Bu bileşenler, yukarıda belirtilen enzimler tarafından basitçe parçalanan nişasta hariç, ekstrakte edilmiş polisakkaritlerin karmaşık yapısı ile ilgili olan glikoz sentezini düşürmek için yükselebilir. GI tahmini 40'tan az olan karbonhidratlar, balkabağı ekmeği, makarna, baklagiller ve yarı haşlanmış pirinç gibi düşük glisemik indeksli gıdalarda sınıflandırılır. Yulaf lapası gibi GI değeri 40 ile 70 arasında olan karbonhidratlar orta bölgeye aittir ve patlamış mısır, çikolata ve gofret gibi GI tahmini 70'in üzerinde olanlar yüksek glisemik indeksli karbonhidratlar olarak kabul edilebilir.

- Şeker hastalarında tokluk hiperglisemiye azaltmak için kullanılan akarboz, miglitol ve vogliboza (α -glukozidaz ve α -amilaz inhibitörleri) rağmen mide rahatsızlığı, ishal, şişkinlik, bulantı gibi yan etkiler ve rahatsızlıklar görülmüştür. Bu nedenle nişastalı gıdalarda insüline benzer etkileri olan doğal maddeler elde etmek için birçok çalışma yapılmış ve polifenollerden zengin diyetlerin bazı sindirim enzimlerinin aktivitesini engelleyerek kan şekerini düşürdüğü kanıtlanmıştır. Bahsedilen polifenollerin özellikle ekstraksiyon ve saflaştırma ile ilişkili inhibisyon etkileri, yüksek karbonhidrat içeren gıdalarda glisemik indeks düşürmüştür. Polifenol bileşenleri, nişastayı parçalamaya katılan kilit enzimleri etkileyebilir ve akabinde amilolitik enzimlerin inhibisyonu yoluyla glisemik kontrolü iyileştirebilir.
- 10 Ülkemizde DSÖ'nün 2030 yılı için öngördüğü diyabet görülme sıklığı rakamlarına bu yıllarda ulaşmış olmamız diyabetle ilgili kritik hamlelerin de yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Ülke sağlık harcamalarının %25'ine yakın bir kısmının, diyabet ve ilişkili hastalıklara harcanması diyabetin vatandaşlarımızın sağlığı kadar ülke ekonomisine getirdiği yük açısından da oldukça önemli olduğu gerçeğini karşımıza çıkarmaktadır. Bu anlamda 1.Basamak
- 15 Koruyucu Sağlık Hizmetleri sunumunda diyabetin önlenmesi ve kontrolü için etkin önlemlerin alınması erken tanı ve uygun tedavisinin yapılması, diyabetle ilişkili hastalıkların ve komplikasyonları önlenmesi konusunda farkındalığın artırılması çalışmalarının yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.
- Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), dünya genelinde 382 milyon yetişkinin diyabet hastası olduğunu tahmin etmektedir. Diyabet görülme prevalansı epidemik oranlara ulaşmış olup ve 2035 yılına kadar bu rakamın 592 milyona ulaşması beklenmektedir. Şu an Türkiye'de 7
- 20 7 milyonu aşkın diyabet hastası olduğu tahmin edilmektedir. Teşhis edilen diyabet hastalarının sadece %11'i (800 bin kişi) hedeflenen tedavi sonuçlarına ulaşarak komplikasyonsuz bir hayat sürebilmektedir. 2009'da IDF Türkiye'nin diyabetle ilişkili sağlık harcamalarının 2030 yılına
- 25 kadar 6.5 milyar \$'a ulaşacağını tahmin etmiştir. Ancak bu rakama daha 2010 yılında ulaşılmıştır. Diyabet komplikasyonlara neden olduğunda, tedavi ve sağlık hizmeti maliyetleri tek başına diyabet tedavisinin 5 katından fazla olabilir. 2013'e ait güncel IDF istatistikleri Türkiye'de diyabet hastası bir kişi için yıllık ortalama tedavi maliyetinin 866 \$ olduğunu göstermektedir (IDF, 2013).
- 30 Geçtiğimiz 15 yıl içinde, Türkiye'de diyabet hastalarının sayısı neredeyse üç katına çıkarak 1998'de 2.5 milyon kişiden 2013'te yaklaşık 7 milyona yükselmiştir. Türkiye'de 1998 ve 2010

yıllarında gerçekleştirilen toplum temelli iki diyabet çalışması yetişkin nüfusta bu dönemde diyabetin yaklaşık %90 oranında arttığını ve artmaya devam ettiğini göstermektedir. Türkiye’de diyabet hastası sayısının çok yüksek olması nedeniyle, Avrupa’daki diyabet yükünün neredeyse %13’ünü taşımaktadır. Bu istatistiklere ilaveten Türkiye’de yaklaşık 3.7 milyon kişide de tip II

5 diyabetin öncüsü olarak adlandırılan bozulmuş glukoz toleransı (IGT) vardır. IDF öngörülerine göre diyabet hastası bireylerin sayısı 2035 yılı itibariyle yaklaşık 12 milyona ulaşacaktır.

Yapılan çalışmalar beslenme dahil sağlıklı yaşam tarzı değişiklikleri ile %44-58 oranında diyabet riskinin azalması sağlanarak, hastalığın önlenebileceğini veya en kötümser tahminle geciktirilebileceğini göstermiştir. Dolayısıyla, tip II diyabet riskini azaltma özelliğine sahip

10 gıda katkı maddeleri ve bu katkı maddelerinin eklenmesiyle üretilen gıdaların tüketilmesiyle diyabet riskinin ve bu hastalığın tedavisi için harcanan maliyetlerin azaltılmasına yardımcı olunacak ve ülke ekonomisine dolaylı yoldan katkı sağlanabilecektir.

Sağlıklı beslenme ve yaşam tarzı gibi değişikliklerle diyabet riskinde %44-58’lik azalma sağlanması mümkün olduğundan dolayı günlük tüketim alışkanlığına sahip olunan gıdaların

15 tip-II diyabet riskini azaltma özelliğine sahip fonksiyonel gıda katkı maddeleri ile zenginleştirilmesi gerekmektedir.

Türkiye’de yaygın dağılım gösteren Karaçam Ağaç kabukları, ağacın kuru maddede ağırlıkça %13-21’ini teşkil etmektedir. Kabuk, ağaç kesildikten sonra odundan ayrılmakta ve atık olarak açığa çıkmaktadır. Ağaç kabuğu, dericilik endüstrisi ve biyoyakıt üretimi gibi alanlarda

20 değerlendirilmektedir. Ancak ağaç kabuğunda bulunan değerli bileşenlerin elde edilerek gıda endüstrisinde değerlendirilmesi teknikte bilinmemektedir.

Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları

25 Buluşun öncelikli amacı, orman endüstrisi atığı olan Karaçam (*Pinus nigra*) ağaç kabuklarından gıda sanayi için değerli katma değeri yüksek, fonksiyonel özellikte gıda katkı maddesinin üretilmesi ve antidiyabetik, antioksidan, antikanser etkinliğinin kanıtlanmasıdır.

Buluşun amacı, Karaçam (*Pinus nigra*) ağaç kabuklarından ekstrakte edilen toz halindeki biyoaktif bileşenleri içeren antidiyabetik, antikanser ve antioksidan özellikli fonksiyonel gıda

30 katkı maddesinin elde edilmesidir. Buluş ile kısa sürede ve düşük sıcaklıklarda gıda sanayisinde

kullanılmayan karaçam ağaç kabuklarından gıda sanayisi için katma değeri yüksek fonksiyonel özellikte ve tip-II diyabet riskini azaltan gıda katkı maddesi hazırlanmıştır.

5 Buluşun bir diğer amacı, orman ürünleri üretiminde genel olarak atık olarak değerlendirilen ya da katma değeri düşük alanlarda kullanımı olan karaçam (*Pinus nigra*) endüstriyel ağaç kabuklarının gıda endüstrisinde kullanım olanakları sağlamak ve yeni/katma değeri yüksek kullanım alanlarının ortaya konulmasıdır. Türkiye’de diyabetli hasta sayısındaki öngörülen artış hızı göz önüne alındığı zaman, günlük tüketim alışkanlığına sahip olunan gıdaların tip II diyabet riskini azaltma özelliğine sahip fonksiyonel gıda katkı maddeleri (biyoaktifçe zengin çözünür ağaç kabuk ekstresi) ile zenginleştirilmesi ile bu hastalık riskinin azaltılmasında 10 yardımcı olunabilecektir.

Buluşun diğer bir amacı, “SIFIR ATIK” yaklaşımı kapsamında çevreye bırakılan atıkların değerlendirilerek çevre kirliliğinin önlenmesine yönelik katkıda bulunmaktır.

Buluş diyabetik hastanın kan glukoz konsantrasyonunu kontrol etmek ve insülin benzeri etkiler sunmak için bazı farmakolojik prosedürler olmasına rağmen, gıda formülasyonunda doğal 15 ürünlerin potansiyelini dahil etmek, α -glukozidazın inhibisyonu yoluyla kan glukoz konsantrasyonunu kontrol etmek için yeni bir yaklaşımdır ve gıda-sağlık ilişkisi açısından önem arz etmektedir.

Günlük tüketim alışkanlığına sahip olunan gıdaların tip-II diyabet riskini azaltma özelliğine sahip fonksiyonel gıda katkı maddeleri (biyoaktifçe zengin suda çözünür ağaç kabuk ekstraları) 20 ile zenginleştirilmesi ile;

(i) hastalık riskinin azaltılmasında yardımcı olmakla birlikte,

(ii) fonksiyonel özellikte gıda katkı maddesi üretimi ile destekleyici gıda katkı maddesi üretimi

(iii) ülke ekonomisi açısından yaygın dağılım gösteren karaçam kabuklarından gıda sanayisi için katma değeri yüksek yeni ürünler elde edilmesine de imkan sağlanmaktadır.

25 Yeni ekstraksiyon yöntemlerinden olan ultrases kullanılarak elde edilen karaçam kabuk ekstraları tip-II diyabet tedavisinde kullanılan akarboza karşı daha düşük dozda kan glikoz seviyesini azaltmıştır. Aynı zamanda bağışıklık güçlendirici antioksidan özelliği ile de destekleyicidir.

Buluş ile orman endüstrisi atığı olan, karaçam ağaç kabuklarından, biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktların, tip-II diyabet hastalığı riskini azaltmada etkili, bağışıklık güçlendirici antioksidan zengin fonksiyonel gıda katkı maddesi olarak kullanılması gösterilmiştir.

- 5 Gıda katkı maddeleri ve yardımcı maddeleri, gıdaların üretiminde, özelliklerinin iyileştirilmesinde ve düzenlenmesinde, endüstriyel üretim tekniklerine uyarlanmasında, raf ömürlerini uzatarak katma değerinin arttırılmasında ve son gıda ürünlerinin duyu özelliklerinin korunmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda sanayinin girdileri arasında önemli bir maliyet kalemi oluşturan bu maddeler, ülkemizde yeterli üretimleri olmadığı için
- 10 büyük oranda ithalatla karşılanmaktadır. Ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmaya yönelik gıda katkı maddeleri ve yardımcı maddelerin geliştirilmesi, üretilmesi ve iyileştirilmesi önem taşımaktadır.

- Tüketici talepleri doğrultusunda, kimyasal/sentetik katkı maddeleri yerine doğal kaynaklardan elde edilen katkı maddeleri ve yardımcı maddelerinin geliştirilmesi hızla önem kazanmakta ve
- 15 bu nedenle sanayiye yönelik çalışmaların yapılması açısından buluş önem arz etmektedir.

Şekillerin Açıklaması

Şekil 1: Karaçam (*Pinus nigra*) kabuğundan TİP II diyabet riskini azaltan fonksiyonel gıda katkı maddesinin hazırlanması yöntemi akış şeması.

- 20 **Şekil 2:** Karaçam kabuk ekstraktlarının uygulandığı CaCo-2, HEK ve MiaPaCa-2 hücrelerinde hücre canlılığı (Cell Viability) sonuçlarının karşılaştırılması.

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

- Buluş, karaçam ağaç (*Pinus nigra*) kabuğundan ekstrakte edilen biyoaktif bileşenleri içeren bir TİP II diyabet riskini azaltan fonksiyonel gıda katkı maddesidir. Gıda katkı maddesi sıvı veya
- 25 toz formunda olabilmektedir.

Karaçam (*Pinus nigra*), çamgiller (Pinaceae) familyasından bir çam türüdür. Buluşta karaçam ağaç kabuklarından fonksiyonel biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için modern ekstraksiyon tekniklerinden olan ultrasonik destekli ekstraksiyon sistemi kullanılmış olup, biyoaktif maddelerin *in vitro* biyolojik gıda-sağlık ilişkisini destekleyici, antidiyabetik-antikanser-

antioksidan aktivitesi belirlemiştir. Buluşta gerekli olan karaçam ağaç kabukları Isparta-Eğirdir bölgesinden temin edilmiştir.

5 Buluş ile karaçam (*Pinus nigra*) ağaç kabuklarından elde edilen suda çözünür biyoaktif maddelerin, kandaki şeker seviyesinin düzenlenmesinde α -D-glukozidaz enziminin üzerinde inhibe edici etkisi nedeniyle etkili olduğu tespit edilmiştir.

Orman endüstrisinde odun olarak değerlendirilen ağaçların birçoğu kesildikten sonra ağaç kabukları odun gövdesinden soyulmakta veya büyük ölçüde atık olarak değerlendirilmekte ya yakıt olarak ya da nispeten farklı endüstri dallarında (biyoyakıt üretimi, dericilik vs.) hammadde olarak kullanılmaktadır. Ağaç kabuğu bileşimine bakıldığında, gıda bilimi ve teknolojisinde 10 büyük önem taşıyabilecek değerli bileşenleri içerdiği görülmüştür. Gıda atığı olarak değerlendirilen meyve/sebze posaları ile kıyaslandığında, ağaç kabuklarının daha yüksek düzeylerde fenolik madde ve antioksidan içerdiğinin görülmesi, buluşun çıkış noktasını oluşturmuş ve gıda endüstrisi için değerlendirme imkânı olabilecek farklı bir endüstri dalı atığı olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

15 Buluş kapsamında hazırlanan ağaç kabuk ekstralerinden üretilen *in vitro* testlerle kan şekerini düşürme özelliği tespit edilmiş fonksiyonel katkı maddesi elde edilmiştir.

TİP II diyabet riskini azaltan fonksiyonel gıda katkı maddesinin hazırlanmasının akış diyagramı Şekil 1’de gösterilmektedir.

TİP II diyabet riskini azaltan fonksiyonel gıda katkı maddesinin hazırlanması;

- 20
- Karaçam ağaç kabuklarının temini ve parçacık boyutu 1 mm’den küçük olacak şekilde öğütülmesi,
 - Yanıt yüzey yöntemi ile ultrasonik ekstraksiyonda; sıcaklığı 20-40 °C, ekstraksiyon süresi 3-9dk. ve ultrasonik güç 50-150 W olarak optimize edilen koşullarda öğütülen kabuklardan ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile alkol: su karışımı içerisinde karaçam
- 25
- Ekstrelerin liyofilizatörde (dondurucu kurutucuda) kurutularak içerisindeki alkolün uzaklaştırılması ve toz haline getirilmesi işlem adımlarını içermektedir.

Ultrasonik ekstraksiyon ile optimize edilen koşullar kullanılarak (sıcaklığı 20-40 °C, ekstraksiyon süresi 6-9 dk. ve ultrasonik güç 50-150 W) elde edilen ekstraktlarının antidiyabetik aktivitesi belirlenmektedir. Antidiyabetik aktivitesi yüksek bulunan ekstraktların antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktivite ve HPLC'de fenolik asit kompozisyonu ile karakterizasyonu yapılmaktadır. Son olarak ağaç kabuk ekstraktları fonksiyonel gıda ürünlerine eklenerek ve glisemik indeksin düşürülmesi üzerindeki etkisi belirlenmektedir. Örneğin; beyaz ekmek ve makarnaya belirli konsantrasyonlarda suda çözünür liyofilize toz karaçam ağaç kabuk ekstresi ilave edilerek, kontrol beyaz ekmeğe göre glisemik indeksi düşürülmüştür.

Örnek olarak kullanılacak karaçam ağaç kabukları, ağaçların orman oluşturduğu bölgedeki en düzgün forma sahip olan ağaçlardan analizin yapılacağı dönemden hemen önce TAPPI T 257 cm-02 standardına göre temin edilmektedir. Örnekler ağaç kesiminden sonra hızlı bir şekilde laboratuvara alınıp ön parçalama işlemi ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrıldı. Freeze-dryer (liyofilizatör, dondurarak kurutma) cihazında kurutulan örnekler laboratuvar tipi Wiley değirmeninde parçacık boyutu 1 mm'den küçük olacak şekilde öğütüldü.

Tablo1, Tablo2 ve Tablo3'de; ekstraksiyon sıcaklığı 20-40 °C, ekstraksiyon süresi 3-9 dk. ve ultrasonik güç 50-150 W koşullarında ayarlanarak 17 farklı nokta çalışılmıştır. Maksimum verim için öngörülen ekstraksiyon koşulları 34.33°C, 6.89 dk ve 98.45 W olarak belirlenmiştir. Bu noktaları, analiz sonuçlarını Tablo2'de verilen dataları programa girerek Tablo3'de verilen R2 değerlerine göre program; Maksimum verim için öngörülen ekstraksiyon koşulları 34.33°C, 6.89 dk ve 98.45 W olarak yanıt vermektedir.

Karaçam ağaç kabuklarından biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda solvent olarak %80'lik metanol:su kullanılmıştır. Kabuk:solvent oranı 1:10 (m:v) olarak ön denemelerle belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemleri, ultrasonik destekli olarak gerçekleştirilmiş olup optimizasyon çalışmasında 3 faktörlü (ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve ultrason genliği) ve 3 seviyeli (düşük, orta ve yüksek) Yanıt Yüzey Yönteminin (RSM) Yüzey Merkezli Kompozit Tasarımı ile elde edilen ve Tablo 1'de görülen deney tasarımından faydalanılmıştır. Mevcut çalışmada, bir Box Behnken Design (BBD) oluşturmak için Design Expert Version 7.0.0 (Stat-Ease Corporation, Minneapolis, MN, ABD) yazılımı kullanıldı. Bağımsız değişkenlerin etkisini değerlendirmek için BBD kullanıldı; yani ekstraksiyon sıcaklığı (X1, 20-40 °C), ekstraksiyon süresi (X2, 3-9 dk.) ve verimde ultrasonik güç (X3, 50-150 W) belirlendi. Proses değişkenlerinin seviyeleri, laboratuvarda yapılan ön denemelere ve ilgili literatür araştırmasına

dayalı olarak belirlenmiştir. 3 tekrarlı ve 3 faktörlü 17 rastgele deneme olarak kodlanmış ve kodlanmamış olarak deney tasarımı Tablo 1'de verilmiştir.

Yanıt olarak verim ve toplam fenolik madde içeriği, toplam tanen içeriği ve antioksidan metotlarından olan FRAP (Ferric Antioxidant Power) ve ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) değerlendirmeye alınmış ve elde edilen değerler Tablo 2 de verilmiştir. 17 farklı örnekte yanıtlarının tamamının maksimum olduğu nokta ekstraksiyonun optimum koşulu olarak program yardımı ile belirlenmiştir.

Maksimum verim için öngörülen ekstraksiyon koşulları **34.33°C, 6.89 dk ve 98.45 W** olarak belirlenmiştir. 6.89 dk gibi kısa bir sürede antioksidan ve fenolikçe zengin, antimikrobiyal, antikanser ve antidiyabetik etkili ekstrakt elde edilmiş olup deney sonuçları ile ispatlanmıştır. Fonksiyonel açıdan zengin olan karaçam ağaç kabuk ekstresinin tip-II diyabet riskini azaltma özellikli olarak gıda sanayisine katma değeri yüksek yeni bir gıda katkı maddesi kazandırılmıştır. Sonuç olarak, karaçam ağaç (*Pinus nigra*) ağaç kabuk ekstresi, önemli fenolik bileşen içeriğiyle antioksidan durumu güçlendirebileceği ve α -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri sayesinde nutrasötik olarak yemek sonrası hiperglisemiye önleyebileceği, tip-II diyabet riskini azaltıcı olarak kullanılabileceği sonucuna varılabilir.

Tablo 1 Yüzey Merkezli Kompozit Tasarımı (RSM) ile hazırlanan ultrasonik ekstraksiyon deney tasarımı

Örnek	Kodlanmış değerler			Gerçek değerler		
	X ₁	X ₂	X ₃	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Ultrasonik Güç (Watt)
1	-1	1	0	20	9	100
2	1	1	0	40	9	100
3	0	0	0	30	6	100
4	0	1	1	30	9	150
5	0	0	0	30	6	100
6	-1	-1	0	20	3	100
7	0	0	0	30	6	100
8	1	0	-1	40	6	50

9	-1	0	1	20	6	150
10	0	-1	1	30	3	150
11	1	0	1	40	6	150
12	-1	0	-1	20	6	50
13	0	1	-1	30	9	50
14	0	0	0	30	6	100
15	1	-1	0	40	3	100
16	0	-1	-1	30	3	50
17	0	0	0	30	6	100

X1, X2 ve X3 model parametreleri sırasıyla ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve ultrasonik güç.

Tablo 2 Karaçam (*Pinus nigra*) kabuğu örneklerinin ekstraksiyon verimi ve biyoaktif özellikleri

Run	Ekstraksiyon verimi	Biyoaktif Özellikler			
	Yield (%)	Toplam fenolik içerik (mg GAE/g kurutulmuş ağaç kabuğu ekstresi)	Toplam tanen içeriği (mg CE/g kurutulmuş ağaç kabuğu ekstresi)	FRAP (mg TEAC/g kurutulmuş ağaç kabuğu ekstresi)	ABTS (mg TEAC/g kurutulmuş ağaç kabuğu ekstresi)
1	7.59	78.84	15.93	550.36	660.75
2	13.57	120.46	21.58	600.56	760.35
3	14.39	125.71	20.14	640.78	710.16
4	11.46	102.36	22.35	578.34	810.42
5	15.03	126.43	21.78	650.78	790.72
6	7.03	70.37	12.49	571.03	580.28
7	12.35	126.85	22.16	650.35	830.46
8	12.24	100.78	17.94	566.13	650.25
9	7.56	74.62	15.38	540.37	601.37

10	9.57	90.26	17.85	585.67	729.45
11	9.86	99.28	17.07	560.46	699.43
12	10.25	62.76	13.52	520.76	540.81
13	9.51	86.45	16.11	550.75	700.37
14	13.45	127.65	21.98	680.75	796.34
15	9.11	100.58	18.23	583.78	700.16
16	7.72	90.63	17.18	560.46	640.75
17	14.63	120.34	19.35	660.48	733.84

GAE: gallik asit eşdeğerleri; CE: kateşin eşdeğerleri; TEAC: Trolox eşdeğerleri antioksidan

Karaçam (*Pinus nigra*) kabuk örnekleri için tahmin edilen model denklemleri ve regresyon katsayıları değeri ise Tablo 3'de verilmiştir. R² değerleri anlamlı olup deney tasarımı başarılı olarak yürütülmüştür. P değeri < 0.05 olup model anlamlıdır. Sıcaklığın ve sürenin birlikte artmasıyla verim artmış ama sürenin etkisi sıcaklığa göre daha etkilidir. Ekstraksiyon sıcaklığın 30°C olduğu noktada gücün ve sürenin artmasıyla verim en yüksek noktadadır. Güç ve süre sıcaklığa göre daha etkilidir.

Tablo 3 Karaçam (*Pinus nigra*) kabuk örnekleri için tahmin edilen model denklemleri ve regresyon katsayıları değeri

Parametreler	Öngörülen Model Denklemler	R2
Ekstraksiyon Verimi	$Y = - 22.77000 + 1.21363 * X_1 - 0.021163 * X_1^2 - 0.28097 * X_2^2 - 7.50500E-004 * X_3^2$	0.8588
Toplam Fenolik İçeriği	$Y = - 243.16000 + 14.04843 * X_1 + 12.45775 * X_2 + 1.74929 * X_3 - 0.20449 * X_1^2 - 1.37603 * X_2^2 - 8.23470E-003 * X_3^2$	0.9865
Toplam Tanen İçeriği	$Y = - 28.39625 + 2.28560 * X_1 + 0.60633 * X_2 - 0.032098 * X_1^2 - 7.57900E-004 * X_3^2$	0.8965

FRAP	$Y = -192.95250 + 31.61778 \cdot X_1 - 0.51035 \cdot X_1^2 - 3.24003 \cdot X_2^2 - 0.023465 \cdot X_3^2$	0.9689
ABTS	$Y = -643.52125 + 65.18070 \cdot X_1 + 12.98808 \cdot X_2 + 4.90748 \cdot X_3 - 0.97101 \cdot X_1^2 - 0.020895 \cdot X_3^2$	0.9026

5 **Tablo 4:** Karaçam ağaç kabuklarından elde edilen ekstraktın mineral içeriği (ultrasound maserasyon ekstraksiyonu kıyaslamalı)

Element	Dalga Boyu (nm)	Slit Aralığı (nm)	LOQ (mg/kg)	Yöntem	Karaçam Ultrasound (mg/kg)	Karaçam Su banyosu (mg/kg)
Çinko (Zn)	213.9	0.7	1.23	AOAC 999.10	38.4	14.9
Bakır (Cu)	324.8	0.7	0.94	AOAC 999.10	3.5	2.3
Demir (Fe)	248.3	0.2	2.50	AOAC 999.10	<2.5	<2.5
Kalsiyum Ca	422.7	0.7	3.42	AOAC 985.35	2018	1802
Magnezyum (Mg)	285.2	0.7	3.34	AOAC 985.35	501.7	166.4
Sodyum (Na)	589.2	0.2	3.27	AOAC 985.35	2300	852.9
Potasyum (K)	766.5	0.7	0.40	AOAC 985.35	1705	770.1
Mangan (Mn)	372	0.7	2.15	AOAC 985.35	4.4	<0

Literatürde karaçam ağaç kabuk ekstresine ait mineral profiline ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Karaçam kabuklarının ultrasonikasyon destekli ekstraktlarında bulunan mineral miktarı su banyosu ekstresine göre daha fazladır.

Karaçam Kabuklarının mineral profili her iki ekstraksiyon yöntemi de göz önüne alındığında ultrasonik ekstraksiyonda daha fazladır. Karaçam'da en yüksek miktarda bulunan mineralin sodyum olduğu ve bunu potasyum ve kalsiyumun izlediği görülmektedir (Tablo 4).

Tablo 5 incelendiğinde karaçam ağaç kabuğunda da major bileşen α -Pinene olup, % 27.2 dir. Karaçam ağaç kabuğunda ana bileşenler α -pinene, β -pinene, limonene, β -Caryophyllene ve germacren D'dir. Zengin uçucu aroma profili ile de antimikrobiyal etkisini desteklemektedir. Antimikrobiyal sonuçları ise Tablo 7'de verilmiştir. Antimikrobiyal sonuçları incelendiğinde

Karaçam kabuklarının ultrasonik ekstraksiyonunun, maserasyon örneklerine göre patojen mikroorganizmalara karşı daha etkili olduğu bulunmuştur. Konsantrasyonun düşük olması, daha düşük konsantrasyonda antimikrobiyal etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. En iyi inhibisyon 0.350 mg/mL ile *S. typhimurium* a karşı olmuştur.

5

Tablo 5: Karaçam ekstresinin GC ile Aroma Profili Analiz Sonuçları

	Karaçam
Bileşik	% Alan
tricyclene	0.03
α -Pinene	27.2
Camphene	0.41
β -Pinene	23.8
limonene	4.01
β -Myrcene	1.33
β -Phellandrene	1.11
α -Terpinolene	6.45
β -Caryophyllene	9.21
Germacrene D	15.78
δ -Cadinene	2.4
hexenal	0.33
α -copaene	1.16

linalool	0.14
α -terpinyl acetate	2.23
trans-pinocarveol	0.68
α -humulene	1.54
α -terpineol	0.56
Methyl eugenol	0.06
trans-methyl isoeugenol	0.13
T-murolol	0.23
farnesyl acetate	0.11
Toplam	98.9

Tablo 6: Kara çam kabuk ekstraktlarının fenolik asit profili (ultrasound maserasyon ekstraksiyonu kıyaslamalı)

Kara Ultrasound			Kara Su Banyosu		
Fenolik Asit	Alıkonma Zamanı	Konsantrasyon	Fenolik Asit	Alıkonma Zamanı	Konsantrasyon
caffeic	15.253	81.256±0.01	caffeic	15.085	67.5355±0.01
syringic	16.345	15.4019±0.01	syringic	16.345	nd
trans4hydroxycinnamic	20.16	10.1636±0.01	trans4hydroxycinnamic	19.673	4.2254±0.01
rutin	21.158	45.7829±0.01	rutin	19.598	16.5312±0.01
ferulic	22.292	67.9655±0.01	ferulic	22.355	25.3474±0.01
trans3hydroxy	24.316	20.3316±0.01	trans3hydroxy	24.354	9.2219±0.01
dcoumaric	27.339	39.3796±0.01	dcoumaric	26.096	11.3796±0.01
myricetin	26.574	96.6588±0.01	myricetin	28.286	36.1174±0.01
quercetin	34.18	90.4200±0.01	quercetin	34.235	62.1762±0.01
chyrsin	41.589	100.0824±0.01	chyrsin	40.779	11.6254±0.01
elagic	21.12	54.2575±0.01	elagic	21.12	nd
m-coumaric	22.292	106.4345±0.01	m-coumaric	22.351	37.4047±0.01

gallic	6.693	78.6742±0.01	gallic	6.693	46.7722±0.01
protocatechic	9.867	nd	protocatechic	9.867	5.1407±0.01

Fenolik asit profili Tablo 6’da verilmiştir. Ekstraksiyon metodu olarak seçilen ultrasonik ekstraksiyon, klasik maserasyon (su banyosu) ekstraksiyonu ile kıyaslanmıştır. Değerler incelendiğinde, ultrasound ekstraksiyon sonuçları, su banyosu ekstraksiyonuna göre daha iyidir. Fenolik asit açısından syringic 15.4019±0.01 (µg/g), elagic 54.2575±0.01(µg/g), bulunurken, maserasyon ekstraktında belirlenememiştir. Karaçam kabuk ekstraktında; caffeic, syringic, rans4hydroxycinnamic, rutin, ferulic, trans3hydroxy, dcoumaric, myricetin, quercetin, chyrsin, elagic, m-coumaric, gallic ve protocatechic olmak üzere toplam 14 fenolik asit belirlenmiştir. Ultrasound gücü fenoliklerin açığa çıkmasında yardımcı olmuştur. Miktarı en yüksek olan fenolik asit, m-coumaric asit olup 104.7304±0.02 (µg/g) olarak bulunmuştur. Karaçam ağaç kabuklarının ultrasound ile ekstraksiyonu su banyosuna göre fenolik asit profili açısından daha zengindir. Yapıda antidiyabetik etkili rutin fenolik asitinin bulunması (Tablo 6) karaçam ağaç kabuklarının tip-II diyabet riskini azaltıcı ve antidiyabetik etkili olmasını sağlamıştır. Rutin’in antihiperglisemik etkisi için önerilen mekanizmalar arasında ince bağırsaktan karbonhidrat emiliminin azalması, doku glukoneogenezinin inhibisyonu, doku glukoz alımının artması, beta hücrelerinden insülin salgılanmasının uyarılması ve Langerhans adacığının dejenerasyona karşı korunması yer alır. Rutin ayrıca sorbitol, reaktif oksijen türleri, gelişmiş glikasyon son ürün öncülleri ve inflamatuvar sitokinlerin oluşumunu azaltır. Bu etkilerin, rutin hiperglisemi ve dislipidemiye bağlı nefropati, nöropati, karaciğer hasarı ve kardiyovasküler bozukluklara karşı koruyucu etkisinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Ghorbani 2017).

Tip-II diyabet riskini azaltma özelliği ve antidiyabetik etkisi, α-glukozidaz enzim inhibisyonu sonuçları ise Tablo 8’de verilmiştir. Tablo 8’de karaçam ağaç kabuk ekstresinde kullanılan ultrasonik yöntemi klasik maserasyonla kıyaslanmış hem de karaçam ağaç kabukları ekstresinin tip-II diyabet tedavisinde kullanılan akarbozsa göre daha iyi bir antidiyabetik olduğu ispatlanmıştır. IC₅₀ değeri, enzimin %50’sini inhibe eden inhibitör konsantrasyonu olup düşük IC₅₀ yüksek inhibisyon değerini göstermektedir.

Tablo 8’de TİP-II diyabet tedavisinde kullanılan akarbozun IC₅₀ değeri: 244.63 ± 1.23 iken, ultrasonik ekstraksiyonla elde edilmiş karaçam ağaç kabuk ekstresinin IC₅₀ değeri: 145.35±0.23, maserasyon ile elde edilen kara ağaç kabuk ekstrelerinin IC₅₀ değeri ise: 160.34 ± 0.76’dir. Yani Karaçam ağaç kabuk ekstresi, akarbozdan daha düşük konsantrasyonda kullanılarak, α-glukozidaz enzimini %50 inhibe edebilmiştir. Bu sonuçlar gösteriyor ki karaçam ağaç kabuk estresi TİP-II diyabet tedavisinde kullanılan akarboza göre daha iyi antidiyabetik etki göstermiştir. Aynı zamanda ekstraksiyon yöntemi olarak seçilen ultrasonik ekstraksiyon (34.33°C, 6.89 dk ve 98.45 W) ile elde edilen karaçam ağaç kabuk ekstreleri, maserasyon ile elde edilen ekstrelerden daha iyi sonuç vermiş olup, daha iyi bir antidiyabetiktir ve daha düşük dozda kan glikoz seviyesini azaltmıştır.

Tablo 7. Karaçam ağaç kabuk ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi (ultrasound maserasyon ekstraksiyonu kıyaslamalı)

Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) (mg/mL)					
Ekstrakt	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	WSBC–10530	ATCC25923 (+)	ATC25922(-)	ATC14028	ATC1911 (+)
<i>Pinus nigra</i> Ultrasonik	0.450±0.02	0.450±0.01	0.450±0.02	0.350±0.001	0.450±0.01
<i>Pinus nigra</i> Maserasyon	1.25±0.01	0.94±0.01	0.94±0.01	1.25±0.01	1.25±0.02

Tablo 8: Karaçam ağaç kabuklarının antidiyabetik etkisi, α -glukozidaz enzim inhibisyonu

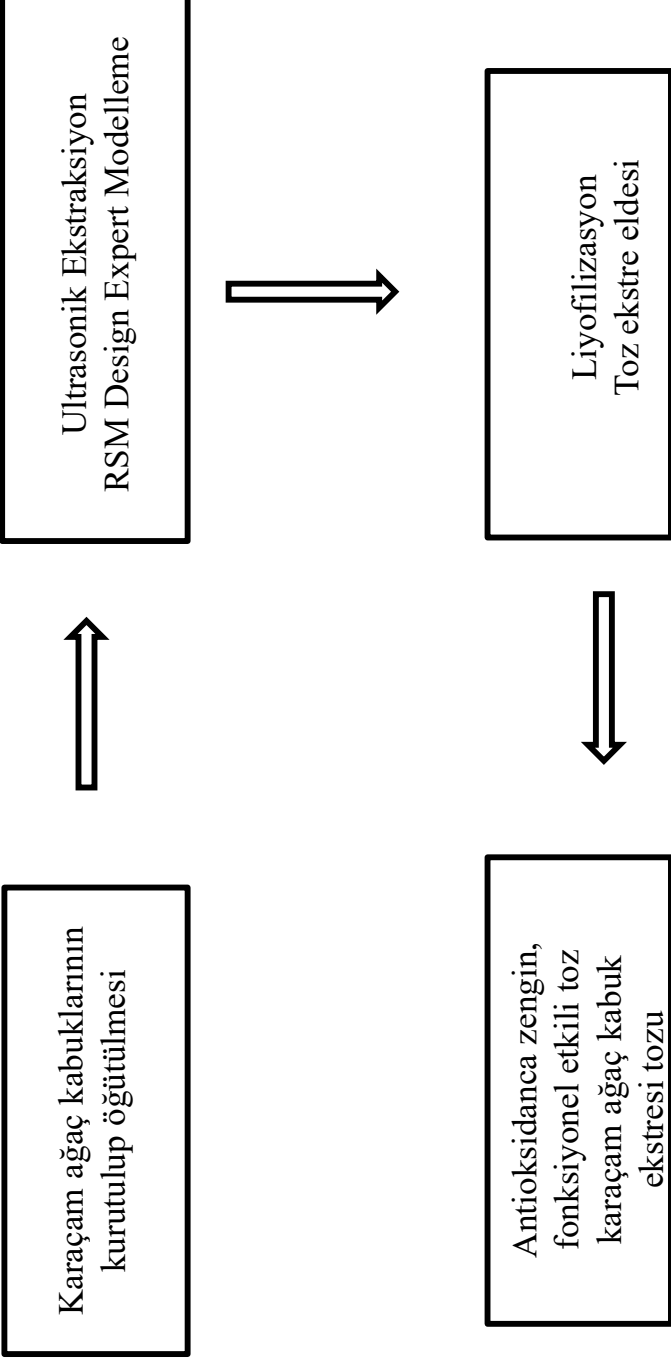
Örnek	Konsantrasyon ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	IC_{50} ($\mu\text{g} / \text{ml}$)
<i>Pinus nigra</i> (Ultrasound)	200-400-600-800-1000	145.35 ± 0.23^a
<i>Pinus nigra</i> (Su Banyosu)	200-400- 600-800-1000	160.34 ± 0.76^b
Akarboz	200-400-600-800-1000	244.63 ± 1.23^d

Diyabet hastalığının tedavisinde sıklıkla kullanılan sentetik ilaç ve bir α -glukozidaz inhibitörü olan Akarboz'a karşı alfa-amilaz inhibisyon aktivitesi ve alfa-glukosidaz inhibisyon aktivitesi ön denemelerle in vitro andiyabetik aktivitesi belirlenmiştir. Karaçam kabukları Akarboza karşı daha etkili bir antidiyabetik ajandır. Deney sonuçları karaçam ağaç kabuklarından ultrasonik ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktlarının klasik su banyosu ekstraktlarına göre daha iyi bir antidiyabetik ajan olduğunu aynı zamanda da akarboza göre daha etkili olduğu göstermiştir.

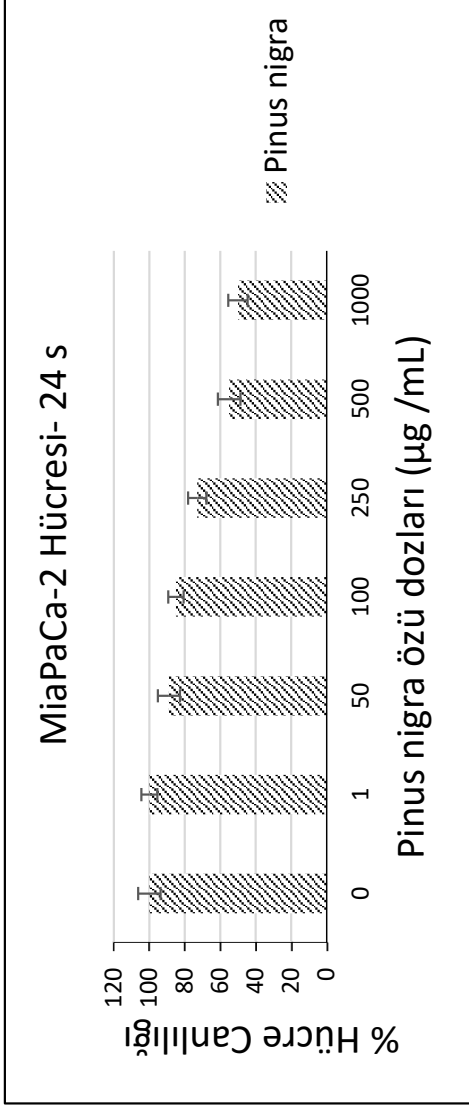
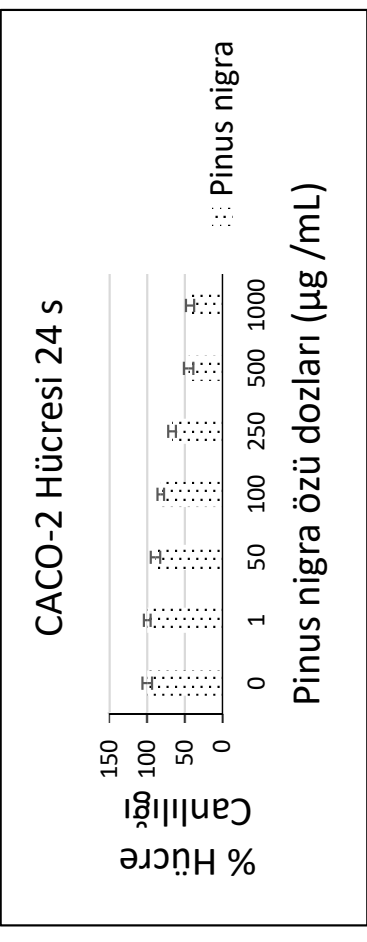
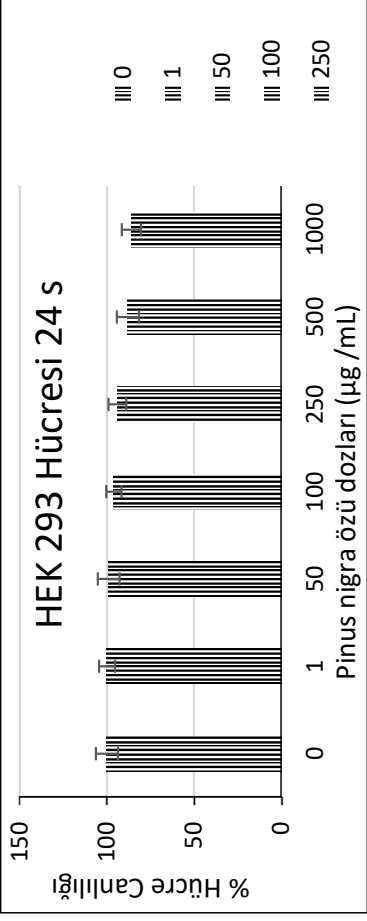
Şekil 2'de karaçam kabuk ekstraktlarının pozitif kontrol olan sağlıklı hücrelerle, bağırsak ve mide kanseri hücreleri üzerindeki kıyaslamalı olarak antikanser etkisi gösterilmektedir.

Karaçam ekstraktlarının insan sağlıklı epitelyal hücreleri (HECK 293) üzerinde sadece 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozunda zayıf dereceli sitotoksik etkisi gözlenirken, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman CACO-2 (insan epitel kolorektal adenokarsinom) hücreleri üzerinde doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve bu yüzden sitotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir ve antikanserojen etkilidir ($p < 0.05$).

CaCo-2 hücrelerinde, karaçam kabuk ekstraktlarının 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozunun üzerindeki tüm dozlarda hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görülmektedir. CACO-2 ve HEK hücrelerindeki her bir doza ait hücre canlılık değerleri karşılaştırıldığında ise 1 ve 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dozları dışındaki tüm deney gruplarında anlamlı derecede ($P < 0.05$) farklılık bulunmuştur (Şekil 2). Karaçam kabuklarının CaCo-2 (bağırsak kanseri) hücre hattı üzerindeki IC_{50} değeri ise; 440 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur. Ağaç kabuk ekstraktlarının antikanser aktivitesinin belirlenmesinde, mide kanseri hücreleri üzerine MiaPaCa-2 hücrelerinde daha etkili olmuştur. Karaçam kabuklarının MiaPaCa-2 hücre hattı üzerindeki IC_{50} değeri ise; 390 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 1



Şekil 2