T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REYHAN YAPRAĞINDAN FARKLI YÖNTEMLER İLE FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU

BAŞAK EBRU KOCAMAZ ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
GIDA MÜHENDİSLİĞİ PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. OSMAN SAĞDIÇ

İSTANBUL, 2018

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

REYHAN YAPRAĞINDAN FARKLI YÖNTEMLER İLE FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU

Başak Ebru KOCAMAZ ÖZCAN tarafından hazırlanan tez çalışması 12.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Hatice ŞANLIDERE ALOĞLU

Kırklareli Üniveristesi _____

Dr. Öğretim Üyesi Salih KARASU

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

ÖNSÖZ

Öncelikle, yüksek lisans tez çalışmam süresince danışmanlığımı üstlenerek her alanda bana destek olup fikirleri ile bana ışık tutan birlikte çalışmaktan onur ve zevk duyduğum kıymetli hocam Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ' a saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Değerli fikirleri ile beni yönlendiren ve her zaman benimle ilgilenen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Salih KARASU' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olup beni destekleyen ve bugünlere getiren kıymetli annem Dursen KOCAMAZ, kıymetli babam Durmuş KOCAMAZ ve kıymetli abim Esat Sadi KOCAMAZ' a herşey için SONSUZ teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Hayatımı paylaştığım, tez çalışmam süresince beni cesaretlendirerek desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli eşim Yılmaz ÖZCAN' a varlığından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Haziran, 2018

Başak Ebru KOCAMAZ ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vi

KISALTMA LİSTESİ vii

ŞEKİL LİSTESİ viii

ÇİZELGE LİSTESİ x

ÖZET xii

ABSTRACT xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.1.1 Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) 1
1.1.2 Fenolik Bileşikler 3
1.1.2.1 Flavonoidler 6
1.1.2.2 Antosiyaninler 7
1.1.3 Antioksidan Maddeler 9
1.1.4 Fenolik Madde Ekstraksiyonu 12
1.1.4.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu 14
1.1.4.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon 17
1.1.4.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 21
1.1.5 Yanıt Yüzey Yöntemi 24
1.2 Tezin Amacı 24
1.3 Hipotez 25

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM 26

2.1 Materyal 26
2.1.1 Reyhan Bitkisi 26
2.1.2 Alet Ekipman Tanımları 27

2.1.3 Kimyasal Maddeler 27
2.2 Yöntemler 28
2.2.1 Yanıt Yüzey Yöntemi ve İstatistiksel Analiz 28
2.2.2 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu 30
2.2.3 Ultrases Destekli Ekstraksiyon 31
2.2.4 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 31
2.2.5 Toplam Fenolik Madde Analizi 32
2.2.6 Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi 33
2.2.7 Toplam Flavonoid Miktarı Analizi 34
2.2.8 Toplam Antosiyanin Miktarı Analizi 34

BÖLÜM 3

BULGULAR VE TARTIŞMA 36

3.1 Fenolik Bileşik Ekstraksiyon Optimizasyonu ve İstatistiksel Analiz 36
3.1.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu 36
3.1.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon 39
3.1.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 43
3.2 Antioksidan Madde Ekstraksiyon Optimizasyonu ve İstatistiksel Analiz 46
3.2.1 Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi 46
3.2.1.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu 47
3.2.1.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon 49
3.2.1.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 52
3.3 Flavonoidlerin Ekstraksiyon Optimizasyonu ve İstatistiksel Analiz 55
3.3.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu 55
3.3.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon 58
3.3.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 61
3.4 Antosiyaninlerin Ekstraksiyon Optimizasyonu ve İstatistiksel Analiz 64
3.4.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu 64
3.4.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon 67
3.4.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 70
3.5 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Literatürdeki Benzer Çalışmalar 74

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 81

KAYNAKLAR 83

ÖZGEÇMİŞ 96

SİMGE LİSTESİ

p	Olasılık Değeri
R^2	Regresyon katsayısı
R^2_{adj}	Düzeltilmiş Regresyon Katsayısı
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
Ɛ	Molar soğurum katsayısı

KISALTMA LİSTESİ

ANOVA	Varyans Analizi
CAE	Kateşin Eşdeğeri
CCD	Merkezi Kompozit Tasarımı
CUPRAC	Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite
CSE	Klasik Çözücü Ekstraksiyonu
Cy-3-glu	Siyanidin-3-*O*-Glikozit
Dk	Dakika
g	Gram
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
Hz	Hertz
kg	Kilogram
L	Litre
MAE	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
mg	Miligram
MHz	Megahertz
mL	Mililitre
N	Normal
nm	Nanometre
RSM	Yanıt Yüzey Yöntemi
TEAC	Trolox Eşdeğeri
UAE	Ultrases Destekli Ekstraksiyon
W	Watt

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 Reyhan bitkisi (*Ocimum basilicum* L.) 2
Şekil 1.2 Fesleğen bitkisi (*Ocimum basilicum* L.) 2
Şekil 1.3 Reyhanda bulunan bazı fenolik asitlerin kimyasal yapısı 5
Şekil 1.4 Flavonoidlerin genel yapısı 7
Şekil 1.5 Antioksidan maddelerin sınıflandırılması 11
Şekil 1.6 Ultrases destekli soxhlet ekstraksiyonu 16
Şekil 1.7 Ses dalgası tipleri 17
Şekil 1.8 Ultrases destekli ekstraksiyon sistemi 19
Şekil 1.9 Hücre duvarının kavitasyon ile parçalanması ve çözücünün hücre içine geçişi 19
Şekil 1.10 Geleneksel ve mikrodalga ısıtma şekilleri 22
Şekil 1.11 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda kapalı ve açık sistem 23
Şekil 2.1 Kurutulmuş reyhan yaprakları 26
Şekil 2.2 Elek sarsma cihazı 27
Şekil 2.3 Elenmiş reyhan yaprakları 27
Şekil 2.4 Kaba filtre kâğıdı ile numunelerin süzülmesi işlemi 30
Şekil 2.5 Santrifüj işlemi 30
Şekil 2.6 Ultrasonik banyo 31
Şekil 2.7 Ev tipi mikrodalga fırın 32
Şekil 2.8 Gallik asit kalibrasyon eğrisi 33
Şekil 2.9 Trolox kalibrasyon eğrisi 33
Şekil 2.10 Örneklerin absorbans değerlerinin okunduğu spektrofotometre cihazı 34
Şekil 3.1 Klasik ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi 39
Şekil 3.2 Ultrases destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarının sıcaklık ... ve süreyle değişimi 42
Şekil 3.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarının mikrodalga gücü ve süreyle değişimi 45
Şekil 3.4 Klasik ekstraksiyonda antioksidan kapasitenin (CUPRAC) sıcaklık ve süreyle değişimi 48
Şekil 3.5 Ultrases destekli ekstraksiyonunda antioksidan kapasitenin (CUPRAC) sıcaklık ve süreyle değişimi 51
Şekil 3.6 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda antioksidan kapasitenin (CUPRAC) mikrodalga gücü ve süreyle değişimi 54

Şekil 3.7 Klasik ekstraksiyonda toplam flavonoid miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi 57
Şekil 3.8 Ultrases destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi 60
Şekil 3.9 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid miktarının mikrodalga gücü ve süreyle değişimi 63
Şekil 3.10 Klasik ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi 66
Şekil 3.11 Ultrases destekli ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi 69
Şekil 3.12 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarının mikrodalga gücü ve süreyle değişimi 72
Şekil 3.13 Üç farklı yöntem ile elde edilen ekstraktlar 73
Şekil 3.14 Klasik çözücü ekstraksiyonunda optimum koşullar 74
Şekil 3.15 Ultrases destekli ekstraksiyonda optimum koşullar 75
Şekil 3.16 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum koşullar 75

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması 4
Çizelge 1.2 Antioksidan aktivite mekanizma çeşitleri 10
Çizelge 1.3 Modern ekstraksiyon yöntemleriyle yapılan son yıllardaki çalışmalar ... 13
Çizelge 1.4 Ultrasesin gıdalardaki uygulama alanları ve etkileri 18
Çizelge 1.5 Gıda alanında mikrodalga uygulamaları..... 22
Çizelge 2.1 Klasik ekstraksiyon için bağımsız değişken değerleri 29
Çizelge 2.2 Ultrases destekli ekstraksiyon için bağımsız değişken değerleri 29
Çizelge 2.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon için bağımsız değişken değerleri 29
Çizelge 3.1 Klasik ekstraksiyon, toplam fenolik madde miktarı deneysel sonuçları . 37
Çizelge 3.2 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Fenolik Madde) 37
Çizelge 3.3 Ultrases destekli ekstraksiyon, toplam fenolik madde miktarı deneysel sonuçları 40
Çizelge 3.4 Ultrases destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Fenolik Madde) 40
Çizelge 3.5 Mikrodalga destekli ekstraksiyon, toplam fenolik madde miktarı deneysel sonuçları..... 44
Çizelge 3.6 Mikrodalga destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Fenolik Madde) 44
Çizelge 3.7 Klasik ekstraksiyon, antioksidan kapasite deneysel sonuçları (CUPRAC) 47
Çizelge 3.8 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları (CUPRAC) 47
Çizelge 3.9 Ultrases destekli ekstraksiyon, antioksidan kapasite deneysel sonuçları (CUPRAC) 49
Çizelge 3.10 Ultrases destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (CUPRAC) 50
Çizelge 3.11 Mikrodalga destekli ekstraksiyon, antioksidan kapasite deneysel sonuçları (CUPRAC) 52
Çizelge 3.12 Mikrodalga destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (CUPRAC) 53
Çizelge 3.13 Klasik ekstraksiyon, toplam flavonoid miktarı deneysel sonuçları 56
Çizelge 3.14 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Flavonoid Miktarı)..... 56
Çizelge 3.15 Ultrases destekli ekstraksiyon, toplam flavonoid miktarı deneysel sonuçları 58
Çizelge 3.16 Ultrases destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Flavonoid Miktarı) 59
Çizelge 3.17 Mikrodalga destekli ekstraksiyon, toplam flavonoid miktarı deneysel sonuçları 61

Çizelge 3.18 Mikrodalga destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Flavonoid Miktarı) 62
Çizelge 3.19 Klasik ekstraksiyon, toplam antosiyanin miktarı deneysel sonuçları 65
Çizelge 3.20 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Antosiyanin Miktarı) 65
Çizelge 3.21 Ultrases destekli ekstraksiyon, toplam antosiyanin miktarı deneysel sonuçları 67
Çizelge 3.22 Ultrases destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Antosiyanin Miktarı) 67
Çizelge 3.23 Mikrodalga destekli ekstraksiyon, toplam antosiyanin miktarı deneysel sonuçları 71
Çizelge 3.24 Mikrodalga destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Antosiyanin Miktarı) 71
Çizelge 3.25 Yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen optimum noktalardaki toplam fenolik madde, CUPRAC, toplam flavonoid madde ve toplam antosiyanin madde miktarları 76

ÖZET

REYHAN YAPRAĞINDAN FARKLI YÖNTEMLER İLE FENOLİK BİLEŞİK EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU

Başak Ebru KOCAMAZ ÖZCAN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Ülkemizde reyhan veya kırmızı fesleğen olarak bilinen Lamiaceae familyası üyesi olan *Ocimum basilicum* L., farmakolojik etkilere sahip yüksek miktarda biyoaktif bileşen içermesi nedeniyle son yıllarda birçok araştırmaya konu olmuştur. Bu çalışmada, reyhan yaprağından farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak fenolik bileşenlerin ekstraksiyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrases destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmış olup her bir yöntem için optimum ekstraksiyon koşulları yanıt yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyonu ve ultrases destekli ekstraksiyon için sıcaklık (30-60 °C) ve süre (10-30 dk), mikrodalga destekli ekstraksiyon için ise mikrodalga gücü (300-600 W) ve ekstraksiyon süresi (1-3 dk) model parametreleri olarak belirlenmiştir. Her bir yöntem için, belirlenen parametrelerin toplam fenolik, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin madde ile antioksidan kapasite miktarları üzerine etkisi incelenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen veriler göz önüne alındığında, en verimli yöntemin mikrodalga destekli ekstraksiyon olduğu görülmüştür. Bunu ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi takip etmektedir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde, optimum koşullardaki (591.83 W ve 2.98 dk) maksimum toplam fenolik, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin madde ile antioksidan kapasite (CUPRAC) konsantrasyonları sırasıyla 62.99 mg GAE/g örnek, 21.80 mg CAE/g örnek, 3462.93 mg Cy-3-glu/kg örnek ve 214.62 mg TEAC/g örnek olarak elde edilmiştir. Bu çalışma, kurutulmuş reyhan yapraklarındaki fenolik bileşiklerin ekstraksiyon veriminin mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi

kullanılarak arttırılabileceğini göstermiştir. Ayrıca mevcut bulgular, biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda, mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin kullanılması zaman açısından tasarruf sağladığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Ekstraksiyon, yanıt yüzey yöntemi, fenolik bileşikler, reyhan, *Ocimum basilicum* L.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUND EXTRACTION FROM PURPLE BASIL LEAF VIA DIFFERENT METHODS

Başak Ebru KOCAMAZ ÖZCAN

Department of Food Engineering

MSc. Thesis

Adviser: Prof. Dr. Osman SAĞDIÇ

Ocimum basilicum L., a member of the Lamiaceae family, known as reyhan or red basil in our country, has been subjected to many researches in recent years due to its high content of bioactive components with many pharmacological effects. In this study, extraction optimization of phenolic compounds from the purple basil leaf was carried out using different extraction methods. For this purpose, conventional solvent extraction (CSE), ultrasound assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) techniques were used and optimum extraction conditions for each method were determined by using Response Surface Methodology (RSM). Extraction temperature (30-60 °C) and time (10-30 min) for CSE and UAE were determined as model parameters. Power level (300-600 W) and extraction time (1-3 min) were chosen as model parameters for MAE. For each method, the effect of the determined parameters on the total phenolic, total flavonoid, total anthocyanin compound and antioxidant capacity amounts were examined. Given the data obtained under optimised conditions, it was observed that the most efficient method is microwave assisted extraction. This is followed by ultrasound assisted extractions. The maximum total phenolic, total flavonoid, total anthocyanin and antioxidant capacity (CUPRAC) concentrations in the optimum conditions (591.83 W and 2.98 min) for MAE were

62.99 mg GAE/g sample, 21.80 mg CAE/g sample, 3462.93 mg Cy-3-glu/kg sample and 214.62 mg TEAC/g sample respectively. This study suggested that extraction yield of the phenolic compounds of purple basil leaf could be increased by using MAE method. Also, these findings illustrate that extraction of bioactive compounds using MAE method saves time.

Keywords: Extraction, response surface methodology, phenolic compounds, purple basil, *Ocimum basilicum* L.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

1.1.1 Reyhan (*Ocimum basilicum* L.)

Dünyanın birçok bölgesinde büyük oranda yayılış gösteren Lamiaceae familyası üyesi olan Ocimum cinsine ait *Ocimum basilicum* L. uçucu yağ ve biyoaktif bileşen içeren dünyanın önemli bitkilerinden biridir [1]. Güney Asya özellikle Hindistan kökenli olan *Ocimum basilicum* L. tropik ve ılıman bölgelerde doğal yayılış göstermektedir. Türkiye'de doğal olarak yayılış göstermediği için sadece kültür formlarının tarımı yapılmaktadır. Günümüzde ülkemizde olduğu gibi daha çok Fransa, İtalya ve İspanya'da kültürü yapılmaktadır [2].

Ocimum basilicum tür içerisinde geniş yapısal ve kimyasal çeşitliliğe sahiptir. Bu sebeple birçok alt türlere ayrılarak incelenmektedir. Türkiye'de bazı bölgelerde özellikle doğu illerinde mor renkli türler (Şekil 1.1) yaygındır ve yabancı literatürde 'purple basil' ülkemizde ise 'reyhan' olarak isimlendirilmektedir. Batı illerinde ise daha yaygın olan yabancı literatürde 'sweet basil' olarak bilinen yeşil renkli türler (Şekil 1.2) 'fesleğen' olarak adlandırılmaktadır [3]. Diğer aromatik bitkilerin birçoğunda olduğu gibi, çiçeklenme başında veya en geç çiçeklenme ortasında biçilerek hasat edilmektedir. Hasatın gecikmesi durumunda, odunlaşmaya başlayan gövdede önemli bileşenlerin verimi hızla azalmaktadır. Uygun koşullarda yetiştirilen reyhan Türkiye'de yılda en az iki defa hasat edilebilmektedir [4].



Şekil 1.1 Reyhan bitkisi (*Ocimum basilicum* L.)



Şekil 1.2 Fesleğen bitkisi (*Ocimum basilicum* L.)

Antifungal, insektisit ve antioksidan gibi etkilerinden dolayı önemi giderek artan reyhan uçucu yağı, gıda endüstrisinde şekerleme ve et ürünleri gibi birçok üründe yaygın olarak kullanılmaktadır.

Tıbbi bitkilerde olduğu gibi reyhanın çeşitli alanlarda kullanılması içerdiği sekonder metabolitlerden (uçucu yağlar, flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler vd.) kaynaklanmaktadır [5], [6]. Reyhanın taze yaprakları tat, koku ve renk vermek için soslarda, yemeklerde, salatalarda, sirkelerde ve aromatik yağlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Reyhan tohumları yenilebilir yağlar içermekte ve ayrıca boya sanayinde de tercih edilmektedir [7]. Reyhan çeşitleri, yüksek antioksidan özellik gösteren fenolik bileşiklerden olan ciddi bir antosiyanin kaynağıdır ve gıdaların korunmasında önemli derecede doğal koruyucu olarak görev almaktadır [8].

Reyhan, günümüzde birçok ülkede tıpta ilaç olarak çeşitli hastalıkların (baş ağrısı, öksürük, ishal, kabızlık, bağırsak ve böbrek rahatsızlıkları) tedavisinde kullanılır. Ayrıca kas gevşetici, gaz giderici, ateş düşürücü ve uyarıcı olarak da yararlanılmaktadır [9]. Birçok araştırma sonuçlarına göre reyhan, hayvan hastalıklarında da tıbbi bitki olarak

fayda sağlamaktadır. 2013 yılında yapılan bir araştırmaya göre reyhanın, Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığı bulaştırıcı paraziti olan kenelere karşı doğal koruyucu olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir [10].

1.1.2 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkilerde üreme, büyüme gibi temel fonksiyonlar için gerekli olup böcekler, patojenler veya parazitlere karşı engelleyici, koruyucu etkileri olan sekonder metabolitlerdir [11], [12]. Bu maddeler, bitkilerde pigmentasyona katkı sağlar, onları kızılötesi ışınlardan korur ve hücre zarında yapı maddesi olarak bitkilere sağlamlık verir [11].

Fenolik bileşikler bir benzen halkasına bir veya daha fazla hidroksil gruplarının doğrudan bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir. Polifenoller ise benzen halkasına birden fazla fenolik hidroksil gruplarının bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Fenolik bileşikler bitkiler için ayırt edici bir özellik olup genellikle ester veya glikozit formda bulunurlar [13].

Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan çok sayıda farklı özelliklerde ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler mevcuttur [14]. Bitkilerde sentezlenen glikozitler, uçucu yağlar, alkaloitler gibi diğer fenolik bileşikler de biyoaktif özelliklerinden dolayı gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Flavonoidler, fenolik asitler, antosiyaninler gibi fenolik bileşiklerin antioksidan, antiviral, antikanserojen etkileri ve gıda bileşeni olarak tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katkıları gibi nedenlerle bunları içeren bitkilerin tıbbi ve gıda değeri gün geçtikçe artmaktadır [15]. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması Çizelge 1.1 ’de verilmiştir.

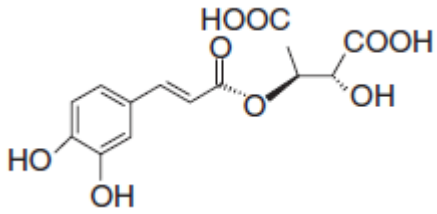
Çizelge 1.1 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması [16]

YAPI	SINIF
C_6	Basit fenoller
C_6-C_1	Fenolik asitle
C_6-C_2	Asetofenonlar ve fenilasetik asitler
C_6-C_3	Sinamik asitler, sinamil aldehitler, sinamil alkoller
C_6-C_3	Kumarinler, izokumarinler, kromonlar
C_{15}	Kalkonlar, auronlar, dihidrokalkonlar
C_{15}	Flavanlar
C_{15}	Flavonlar
C_{15}	Flavanonlar
C_{30}	Flavanololler
C_{15}	Antosiyanidinler
C_{15}	Antosiyaninler
C_{15}	Biflavoniller
C_6-C_1-C_6,C_6-C_2-C_6	Benzofenonlar, zantonlar, stilbenler
C_6, C_{10}, C_{14}	Kinonlar
C_{18}	Betasiyaninler
Lignanlar, Neolignanlar	Dimerler ve oligomerler
Lignin	Polimerler
Tanenler	Oligomerler ve polimerler
Flobafenler	Polimerler

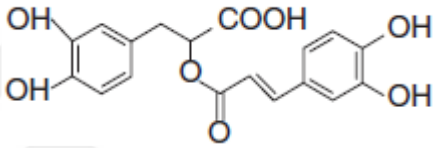
Literatür çalışmalarına bakıldığında reyhanda, güçlü antioksidan etkiye sahip rozmarinik asidin en fazla bulunan fenolik asit olduğu belirlenmiştir. Bu fenolik asit genellikle Lamiaceae familyası türlerinde bulunan önemli bir antioksidan kaynağıdır. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında reyhan türlerinde rozmarinik asit miktarındaki değişimin oldukça geniş aralığa sahip olduğu görülmektedir [17].

Lee [18] 2010 yılında yaptığı bir çalışmada reyhandaki rozmarinik asit miktarının 40,63 mg/100 g olduğunu; Lee ve Scagel [19] ise bu miktarın taze örnekte 138,6 mg/100 g 'a kadar çıktığını rapor etmişlerdir. 2001 yılında Zgorka vd. [20] yaptıkları çalışmada bitkisel çay ve baharat olarak kullanılan 10 farklı Lamiaceae familyasına ait bitki türünü fenolik asitler bakımından karşılaştırmışlardır. Çalışmada reyhanda bulunan rosmarinik asit miktarının *Satureja hortensis* L. bitkisinden sonra ikinci sırada yer aldığı gözlenmiştir. Reyhanda rosmarinik asit dışında; gallik asit, kafeik asit, klorojenik asit, protokateşik asit, 4-hydroxibenzoik asit gibi fenolik asitler de mevcuttur [21].

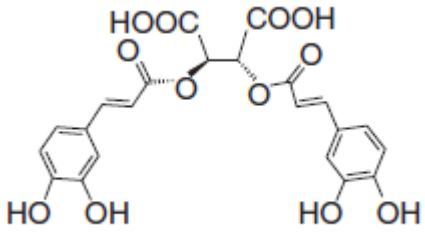
Son yıllarda yapılan araştırmalarda *Ocimum* türleri için yeni fenolik asitler tanımlanmaktadır. 2010 yılında reyhan bitkisinde chicoric asitin de bulunduğunu ilk kez rapor eden Lee ve Scagel [19], bu bileşiğin reyhanda rozmarinik asitten sonra en fazla olarak bulunduğunu ve diyetteki ihtiyacın diğer kaynaklara göre reyhandan daha kolay ve ekonomik karşılanabileceğini belirtmişlerdir. Javanmardi vd. [22] yaptıkları bir çalışmada İran'da bulunan yerel reyhan çeşitlerini fenolik asit bakımından incelemişlerdir. Çalışmaya göre; rosmarinik asit ana bileşik olmasına rağmen, genotipler arasında fenolik asit komposizyonu bakımından önemli çeşitliliğin bulunduğunu belirtmişlerdir.



Rosmarinik asit



Kaftarik asit



Cichoric asit

Şekil 1.3 Reyhanda bulunan bazı fenolik asitlerin kimyasal yapısı [23]

15 farklı *Ocimum basilicum* türü kullanılan çalışmada, kültür çeşidinin fenolik kompozisyonu ve antioksidan özelliklerine etkisi incelenmiştir. Kültür çeşidinin, fenolik düzeyi ($p<0.001$) ve antosiyanin konsantrasyonları ($p<0.001$) üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Kültür çeşidi, fenolik asit olan rosmarinik (0.06-6.09 mg/g kuru madde), chicoric (0.03-2.78 mg/g kuru madde) ve kafeik asit (0.04-0.77 mg/g kuru madde) konsantrasyonlarında etkili bulunurken kaftarik (0.09-0.49 mg/g kuru madde) asit miktarında önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Kullanılan 9 türde chicoric asit miktarı rosmarinik asit miktarından daha fazla

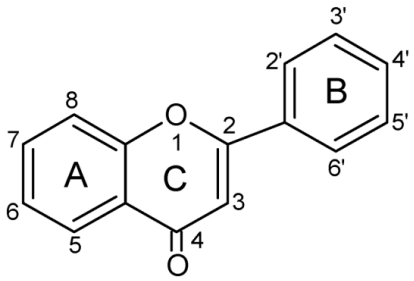
bulunmuştur. Ayrıca, kültür çeşidinin FRAP ve DPPH antioksidan kapasite üzerinde de önemli bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Araştırmacılar, fenolik asit kompozisyonunun antioksidan kapasiteyi etkileyen önemli bir faktör olduğunu vurgulamışlardır [24].

Telci vd. [17] yaptıkları bir çalışmada, Türkiye orijinli reyhanların flavonoid ve fenolik asit kompozisyonlarını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda fenolik bileşiklerin büyük çoğunluğunu fenolik asitlerin oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Toplam fenolik madde miktarının taze örneklerde 166.6-12514.8 mg/kg arasında değişirken kuru örneklerde 1910.7 - 21860 mg/kg arasında olduğunu belirtmişlerdir. Toplam fenolik asit miktarı ise taze örneklerde 123.8-11277.3 mg/kg aralığında iken kuru örneklerde 1709.3-18524.7 mg/kg aralığında olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, reyhan örneklerindeki toplam fenolik madde miktarının taze örneklere kıyasla kuru örneklerde daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Genellikle, bitkisel kaynaklı gıdaların büyük çoğunluğunda fenolik bileşik bulunmaktadır. Bilindiği üzere fenolik bileşiklerin asıl kaynağı meyveler ve sebzelerdir [25]. Bitkilerdeki fenolik maddeler bitkinin türüne göre değişiklik gösterir. Aynı bitki türünde mevsim, tür, çevresel koşullar, hastalıklar gibi etkenler bitkide bulunan fenolik madde miktarını yüksek oranda etkilemektedir [26]. Günümüzde, sınırlı sayıda fenolik bileşik insan diyetinde yer almasına rağmen binlerce doğal fenolik bileşik literatüre kazandırılmıştır [27].

1.1.2.1 Flavonoidler

Flavonoidlerin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesi sonucunda 15 karbon atomu içeren difenilpropan (C6-C3-C6) yapısındadır. Flavonoidlerin yapısında bulunan OH gruplarının reaktif özelliklerinden dolayı bu biyoaktif bileşenler kolayca glikozitlenirler. Flavonoidler gıdalarda çok yaygın olarak yer alan polifenollerdir. Yaklaşık olarak 6500 çeşit flavonoid bilinmektedir [14], [28]. Flavonoidler, yapılarındaki hetero halkasının farklı yükseltgenme derecelerine göre flavonlar, flavonoller, flavanonlar, flavanonoller, flavon-3-oller, flavon-3,4-dioller, antosiyanidinler, auronlar gibi farklı alt sınıflara sahiptir. Flavonoidlerin genel yapısı Şekil 1.4’ te verilmiştir.



Şekil 1.4 Flavonoidlerin genel yapısı [14]

Bitkisel doğal bileşikler olan flavonoidler, düşük molekül ağırlığına sahip olup sağlığa yararlı birçok etkileri vardır. Bu bileşenler, hücre içinde kimyasal haberci, fizyolojik düzenleyici veya hücre döngüsünün inhibitörleri olarak yer alırlar [29]. Flavonoidlerin yüksek antioksidan etkisiyle beraber farklı birçok özellikleri vardır. Flavonoid eksikliğinde bazı hastalıklar meydana gelebilmektedir. Kanser, yaşlanma, inflamasyon ve nörodejenaratif hastalıklar (parkinson, Alzheimer vb.) gibi çeşitli rahatsızlıkların flavonoid eksikliği ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [30]. Flavonoidlerin bitkilerde yaygın olarak bulunmasına rağmen miktarlarının az olması ve önemli farmakolojik etkilere sahip olmaları yapılan yeni çalışmaları bu bileşiklerin eldesine yöneltmiştir.

Reyhandan izole edilen flavonoidler, glikozile edilmiş türevler olarak ortaya çıkan flavon ve flavonol alt gruplarına aittir. Grayer vd. [31] tarafından, *Ocimum basilicum* 'daki baskın bileşenlerden olan kuersetin, lüteolin, apigenin ve kemferol flavonoidlerinin başlıca O-glikozit olduğu belirtilmiştir.

1.1.2.2 Antosiyaninler

Antosiyaninler, flavonoid pigmentlerin en önemli grubu olup antosiyanidinlerin şekerlerle glikozit oluşturmuş şeklidir. Antosiyaninler, ince granüller veya şekilsiz kümeler şeklinde hücre duvarlarında oluşabilmektedir. Faka, genellikle hücre vakuollerinde bulunmaktadır. Antosiyanin terimi ilk defa 1835 yılında kullanılmış olmasına rağmen bu bileşenlerin pH indikatörü olduğu 1664 yılından beri bilinmektedir. Antosiyanin yapısal olarak ilk kez 1913 yılında mavi çiçekli *Centaura cyanus*'ta tanımlanmış olup günümüzde 600'den fazla yapısı tanımlanmış antosiyanin bulunmaktadır [32], [33], [34].

Suda çözünebilen doğal renk maddeleri olan antosiyaninler, meyve, sebze ve çiçeklerin kendilerine has olan pembe, kırmızı, mavi ve mor tonlarındaki çeşitli renklerini sağlarlar. Antosiyaninlerin verdiği renk ortamın pH değerine göre farklılık göstermektedir. Antosiyaninlerin yapısındaki hidroksil grubu (-OH) sayısı arttıkça renk maviye doğru dönerken metoksil grubu ($-OCH_3$) sayısındaki artış kırmızı tonun artmasına sebep olmaktadır [33]. Antosiyaninin yapısına bağlanmış şekerlerin sayısı, türü ve bağlanış şekli ayrıca şekerlere bağlanmış alifatik ve aromatik asit sayısı ile türü de bu moleküllerin sağladığı renkler üzerinde etkili olan diğer etkenlerdir [35]. Bu etkenler dikkate alındığında en yüksek maviliği delfinidin glikozitleri vermektedir. Siyanidin ve pelargonidin glikozitleri genellikle mavimsi kırmızı renk vermektedir [36].

Antosiyaninler, parlak kırmızı rengi ve suda çözünürlüğü nedeniyle gıda endüstrisinde doğal bir renklendirici olarak potansiyel bir kullanıma sahiptir. Fakat antosiyanin pigmentleri sıcaklık, ışık, pH, metal iyonları ve oksijen gibi çeşitli faktörlerden etkilenir. Isıl işlem, antosiyanin stabilitesini etkileyen en önemli faktör olarak kabul edilir [37].

Doğal renk maddesi olmasının yanı sıra antosiyaninlerin damar koruyucu, iltihap giderici, tümör gelişimini engelleyici, antiülser ve UV radyasyona karşı koruyucu etkileri gibi birçok olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. Antosiyaninler idrak ve motor fonksiyonlarını modüle ederek, hafızayı geliştirmekte ve yaşlanmaya bağlı olarak meydana gelen nöral hastalıkların engellenmesinde önemli etkilere sahiptir [38]. Bu tür farmakolojik özelliklerinden dolayı antosiyaninlerle ilgili araştırmalar son zamanlarda oldukça artış göstermiştir.

Phippen ve Simon [39] yaptıkları çalışmada, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile reyhandan 11 ciyanidin bazlı ve 3 peonidin bazlık olmak üzere toplam 14 farklı antosiyanin izole edilmiştir. Farklı reyhan örneklerinden ekstrakte edilen antosiyanin miktarı 16.63-18.78 mg/100 g taze örnek aralığında değişmektedir. Diğer antosiyanin kaynaklarına kıyasla, reyhan bitkisinin çok fazla asitlenmiş ve glikozile edilmiş antosiyanin içerdiği ve gıda endüstrisi için kararlı kırmızı pigment kaynağı olabileceği ifade edilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen antosiyanin çeşitlerinden bazıları; siyanidin 3,5-diglukozit, peonidin 3,5-diglukozit ve siyanidin 3-glukozit'tir.

McCance vd. [40] 3 farklı reyhan (*Ocimum basilicum*) çeşidinde bitki olgunluğunun, toplam ve bireysel antosiyanin konsantrasyonları, fenolik asit içeriği ve antioksidan kapasiteleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Bitki olgunluğunun, toplam fenolik miktarı (3.30-20.08 mg/g kuru madde), fenolik asitlerden olan kaftarik (0.08-0.85 mg/g kuru madde), chicoric (0.13-3.55 mg/g kuru madde) ve rosmarinik (1.31-21.31 mg/g kuru madde) asit konsantrasyonlarında önemli derecede etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Total antosiyanin miktarı 2.07-9.72 mg/g kuru madde ve FRAP azaltma kapasitesi 3.50-28.73 mmol/100g kuru madde olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar, fenolik asit konsantrasyonlarının reyhan antioksidan özellikleri üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ve genel olarak reyhan hasat zamanın ve olgunluğunun fenolik ve antosiyanin kompozisyonunda ve antioksidan özelliklerinde kritik rol oynadığını rapor etmişlerdir.

1.1.3 Antioksidan Maddeler

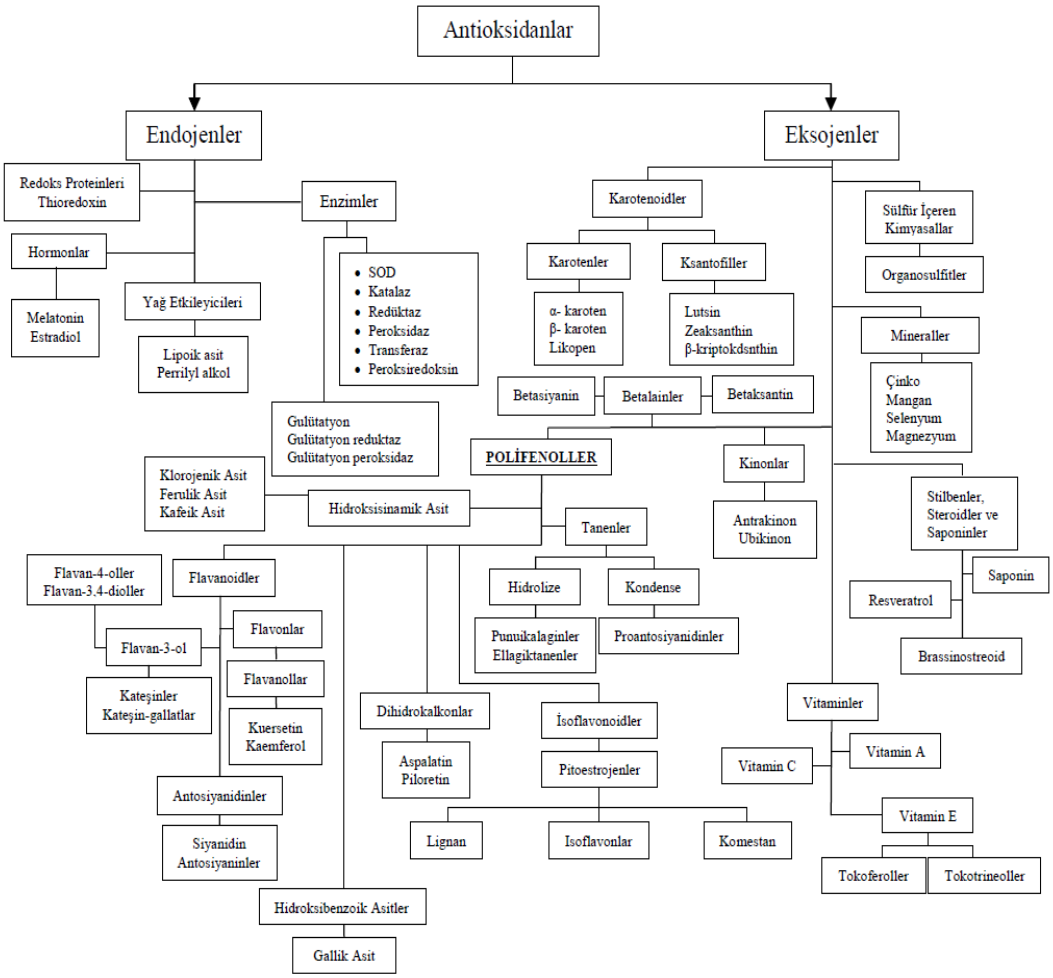
Canlı hücrelerinde veya lipit içeren gıdaların tat, koku ve renklerinde oksijenin etkisi ile meydana gelen ve genellikle istenmeyen değişimlere oksidasyon denilmektedir. Bulunduğu ortamdaki biyokimyasal bileşikleri oksitleyen maddelere ise oksidan denilmektedir. Gıdalarda ve canlı hücrelerinde meydana gelen oksidasyon reaksiyonlarını engelleyen bileşenlere ise genel olarak antioksidan ismi verilmektedir.

Serbest radikaller, en dış elektron zarfında bir elektron kaybettikleri için elektronlarını tamamlamak amacıyla başka atomların elektronlarını kullanmaya çalışan atomlardır [41]. Serbest radikaller nötralize edilmediği takdirde birçok olumsuz etkilere sebep olmaktadır. Bunlardan bazıları; hücre membranı proteinlerini parçalayarak hücreleri öldürmek, membran lipitlerini yok ederek hücre membranını sertleştirip hücre fonksiyonlarını engellemek, çekirdekteki genetik materyale etki edip DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getirmek ve bağışıklık sistemindeki hücreleri öldürerek bağışıklık sisteminin etkisini azaltmaktır [42]. Bu anlamda antioksidan maddelerin önemi ortaya çıkmaktadır çünkü antioksidanlar antioksidatif etki mekanizması ile canlılarda serbest radikalleri nötralize edip hücrelerin onlardan etkilenmesini engeller veya kendini yenilemesine yardımcı olurlar [41]. Antioksidanlar, farklı kimyasal yapılarda, çeşitli antioksidatif etki mekanizmalarına sahiptirler (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Antioksidan aktivite mekanizma çeşitleri [43]

Antioksidan Sınıfı	**Antioksidan Aktivitesi Mekanizması**	**Antioksidan Örneği**
Antioksidanlar	Serbest lipit radikallerinin inaktivasyonu	Fenolik bileşikler
Hidroperoksit stabilizerleri	Hidroperoksitlerin serbest radikallere dönüşümünün önlenmesi	Fenolik bileşikler
Sinerjistler	Uygun antioksidanların teşvik edici aktiviteleri	Sitrik asit, askorbik asit
Metal tutucu	Ağır metallerin inaktif ürünlere bağlanması	Fosforik asit, maillard tepkimesi bileşikleri, sitrik asit
Singlet oksijen kırıcı	Singlet oksijenin triplet oksijene dönüşümü	Karotenler
Hidroperoksidi parçalayan maddeler	Hidroperoksitlerin radikal olmayan yöntemlerle azalması	Proteinler, amino asitler

Antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan (endojen ya da eksojen) olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılırlar. Bu antioksidanların bazıları düşük molekül ağırlıklı olup enzimatik kofaktörler gibi enzim içerirler. Enzimatik olmayan antioksidanlar birçok besinsel kaynaktan elde edilmektedir. Besinsel olanlarının en yaygınları polifenol bileşenlerdir. Besinlerden elde edilen diğer antioksidanlar ise vitaminler, karotenoidler, organosülfür bileşenleri ve minerallerdir [44]. Antioksidanların sınıflandırılması Şekil 1.5'te verilmiştir.



Şekil 1.5 Antioksidan maddelerin sınıflandırılması [45]

Gıda formülasyonlarına antioksidanların eklenmesi, gıda ürünleri için büyük bir sorun olan lipid oksidasyonunu önlemek veya geciktirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan kolay bir yöntemdir. Gıda endüstrisinde lipid oksidasyonunu engellemek için bütillenmiş hidroksi toluen, bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), ter-bütil hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat gibi sentetik antioksidanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu sentetik antioksidanların sağlık için toksik etkileri olabileceğini bildirmiştir. Sentetik antioksidanlarla ilgili güvenlik kaygıları ışığında, araştırmacılar son zamanlarda sentetik antioksidanlara göre daha güvenli ve daha etkili olan doğal antioksidan bileşikleri araştırmaya odaklanmışlardır [46].

Çağımızda, birçok sebepten dolayı kanser ve diyabet gibi hastalıklarda önemli oranda artış meydana gelmiştir. Bu hastalıkların önlenmesinde antioksidanlar son zamanlarda

oldukça önem kazanmıştır. Ratnam vd. [44] antioksidanların vücut savunma sistemini yok etmeye çalışan hastalıklar, nörolojik hastalıklar, yaşlılık ve diğer hastalıklara karşı iyileştirici, önleyici ve tedavi edici rolleri olduğunu belirtmişlerdir. Thomas vd. [47] hem insan vücudundan hem de besinlerden alınarak üretilen antioksidanların, hastalıklara neden olduğu düşünülen serbest radikallerin oksidatif zararına karşı hayati bir rol oynadıklarını rapor etmişlerdir.

Günümüzde, çevre bilincinin artması ve sentez maddelerin olumsuz etkilerinden uzak durulmaya çalışılması neticesinde bitkisel kaynaklı antioksidanlar oldukça önemli bir yer edinmeye başlamıştır. Özellikle meyvelerde bulunan vitamin C, vitamin E ve β-karoten gibi bileşenler içerdikleri yüksek miktardaki antioksidanlar sayesinde özel bir ilgi çekmektedir.

Yapılan bir çalışmada, Lamiaceae familyasına ait *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* ve *Teucrium chamaedrys* türlerinin %70'lik etanol çözücüsü varlığında 60 °C sıcaklıktaki su banyosunda 30 dk süre ile ekstraktları elde edilmiş olup fenolik profilleri ve antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçlara göre, en yüksek polifenolik içerik, flavonoid miktarı ve kafeik asit türevleri *T. chamaedrys* (sırasıyla; 243.65 ± 3.46, 9.75 ± 0.25 ve 12.51 ± 0.20 mg/g), türünde elde edilmiştir. Ardından *O. basilicum* (sırasıyla; 175.57 ± 2.43, 6.72 ± 0.19 ve 12.11 ± 0.39 mg/g) ve *H. officinalis* (sırasıyla; 77.72 ± 1.83, 1.30 ± 0.10 ve 9.25 ± 0.75 mg/g) gelmektedir. Trolox eşdeğer antioksidan kapasite sonucu *T. chamaedrys* için 87.77 ± 0.33 µmol trolox/mg örnek, *O. basilicum* için 25.69 ± 2.96 µmol trolox/mg örnek ve *H. officinalis* için 57.39 ± 13.68 µmol trolox/mg örnek olarak elde edilmiştir. *H. officinalis*, *O. basilicum* ve *T. chamaedrys*'in antioksidan özelliklere sahip potansiyel bir polifenol kaynağı olarak kabul edilebileceğini vurgulamışlardır [48].

1.1.4 Fenolik Madde Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon, sabit basınç ve sıcaklıkta bir maddenin iki ayrı fazdaki denge derişimlerinin birbirinden farklı olmasından yararlanılarak yapılan ayırma işlemi olarak tanımlanmaktadır [49]. Gıda proseslerinde ekstraksiyon, belirli bir hammaddeden bir veya birden fazla bileşeni ayırmak veya uzaklaştırmak için kullanılmaktadır [50]. Fenolik maddelerin bitkisel kaynaklardan ekstraksiyonu bu maddelerin tanımlanması ve

kullanımı açısından önemli olup günümüze kadar bu konuda çeşitli yöntemlerle çalışılmıştır [51]. Fenolik maddelerin ekstraksiyonunda, kullanılacak çözücünün türü ve konsantrasyonu, numunenin partikül büyüklüğü, süre, sıcaklık, örnek:çözücü oranı gibi parametrelerin yanı sıra önemli konulardan biri de ekstraksiyon tekniğidir [52].

En çok kullanılan klasik yöntemler, en eski olduğu bilinen Soxhlet ekstraksiyonu başta olmak üzere maserasyon ve perkolasyondan oluşmaktadır [53]. Soxhlet ekstraksiyonu 20. yüzyıl ortalarında revaçta olmasına rağmen hala birçok laboratuvarda kullanılmaktadır. Fakat konvansiyonel yöntemler ekstraksiyon süresinin uzun olması, otomasyona uygunluk göstermemesi, yüksek çözücü tüketimi gerektirmesi, analiz için numunelerin hazırlanmasındaki zorluklar, düşük verime sahip olmaları ve en önemlisi çevreye zararlı etkilerinin bulunması gibi nedenlerden dolayı yerini daha modern yöntemlere bırakmaktadır [54].

Özellikle materyallerden biyoaktif bileşenlerin ayrılmasında, çevre dostu olarak bilinen, yüksek verimde ekstraksiyon sağlayan, daha az solvent ve daha az zaman gerektiren geleneksel olmayan yöntemlerin kullanılması son 50 yıldır önem kazanmıştır [55]. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak kullanılan yeni ekstraksiyon metotları; mikrodalga ve ultrases destekli, ohmik destekli, yüksek basınç ve vurgulu elektrik alan destekli, süperkritik akışkan ekstraksiyonlardır. Son yıllarda modern ekstraksiyon yöntemleriyle yapılan bazı çalışmalar Çizelge 1.2 ’ de verilmiştir.

Çizelge 1.3 Modern ekstraksiyon yöntemleriyle yapılan son yıllardaki çalışmalar [56]

Yöntem	Matris	Ekstrakte edilen bileşik	Bağımsız değişkenler	Bağımlı değişkenler	Kaynak
Ultrases destekli ekstraksiyon	Şeker pancarı melası	Fenolik bileşikler Antosiyaninler	Solvent Sıcaklık	Toplam fenolik madde miktarı Antioksidan aktivite (ABTS) Toplam antosiyanin miktarı	[57]
	Ahududu	Antosiyanin	Katı:solvent oranı Ultrason gücü Süre	RSM ile optimizasyon	[58]
	Şarap otu	Fenolik bileşikler	Süre Sıcaklık Solvent:karı oranı	Optimizasyon Toplam fenolik bileşik miktarı Toplam antosiyanin miktarı	[59]

Çizelge 1.3 Modern ekstraksiyon yöntemleriyle yapılan son yıllardaki çalışmalar (devamı)

Mikrodalga destekli ekstraksiyon	Pirinç tanesi	Fenolik bileşikler	Sıcaklık Mikrodalga gücü Süre Solvent:katı oranı	RSM ile optimizasyon HPLC ile fenolik bileşik tespiti	[60]
	Yabanmersini	Antosiyanin	Süre Sıcaklık Etanol konsantrasyonu	Ekstrasksiyon kinetiği	[61]
	Vişne	Antosiyaninler Fenolik asitler	Sıcaklık Süre Güç	RSM ile optimizasyon HPLC ile fenolik bileşiklerin tespiti	[62]
Yüksek basınç destekli ekstraksiyon	Yabanmersini atıkları	Fenolik bileşikler antosiyaninler	Solvent çeşidi	Toplam fenolik bileşik miktarı Antioksidan aktivite Toplam antosiyanin miktarı	[63]
	Üzüm posası	Antosiyanin	Sabit basınç Süre Sıcaklık	Toplam fenolik bileşik miktarı Antioksidan aktivite Toplam antosiyanin miktarı HMF	[64]
	Beyaz üzüm posası	Polifenoller	Solvent Sıcaklık Solvent oranı	RSM ile optimizasyon Toplam fenolik bileşik miktarı Antioksidan aktivite Toplam flavanoid miktarı	[65]
Vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon	Mor tatlı patates	Antosiyanin	Elektrik alan kuvveti Süre Darbe sayısı	Ekstraksiyon verimi Toplam antosiyanin miktarı	[66]
	Yabanmersini	Meyve suyu verimi	Elektrik alan kuvveti Süre Kare dalga	Toplam polifenol miktarı Toplam antosiyanin miktarı Antioksidan aktivite	[67]
Süperkritik akışkan ekstraksiyonu	Keçiboynuzu	Fenolik bileşikler	Basınç Sıcaklık	Ekstraksiyon verimi Toplam fenolik bileşik miktarı Ekstraksiyon verimi	[68]
	Cennet hurması	Karotenoid	Basınç Sıcaklık Etanol oranı Süre Akış hızı	Ekstraksiyon verimi Karetenoid miktarı	[69]

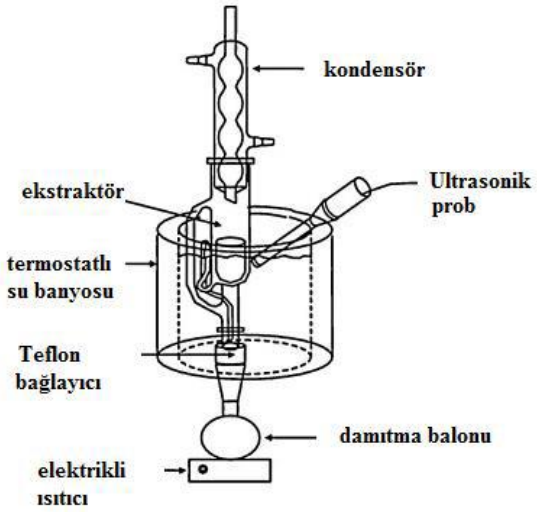
1.1.4.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Klasik çözücü ekstraksiyonu, uygun bir çözücünün materyalle karıştırılması ve çözücünün bileşene nüfuz edebileceği kadar beklemenin sonucunda ekstrakte edilmesi istenen maddelerin en yüksek seviyede fakat istenmeyen bileşenlerin ise en düşük seviyede çözündüğü bir ekstraksiyon çeşididir. Ekstrakte edilmesi istenen bileşen ve

ekstrakte edilecek olan materyale bağlı olarak bu işlem çok farklı şekillerde ve cihazlarla yapılabilmektedir [70]. Bu yöntem katı-sıvı ekstraksiyonu ve sıvı-sıvı ekstraksiyonu olmak üzere iki şekilde gerçekleşir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonda birbirine karışmayan iki sıvının yoğunluk farkından yararlanılarak ayırma işlemi gerçekleştirilirken katı- sıvı ekstraksiyonda ise katı örneğin sıvı çözücü ile temas etmesi ile katı matriksin sıvı çözücüye geçmesi prensibine dayanır. Katı-sıvı ekstraksiyonun kinetiği pH, katı-sıvı oranı, çözücü türü, parçacık boyutu ve sıcaklık gibi birçok parametreye bağlıdır. İyi bir çözücü seçimi hedef bileşen üzerindeki seçiciliği doğru yönde etkilemektedir. Çözücü polaritesi ve pH, ekstrakte edilmek istenen maddenin yüksek verimli olması için oldukça önemlidir. Katı-sıvı ekstraksiyon işlemi, şeker kamışı ve şeker pancarından şeker, tıbbi bitkilerden uçucu yağlar ve yağlı tohumlardan yağların ekstraksiyonu gibi birçok farklı uygulamaları içermektedir. Günlük hayatımızda çözücü olarak sıcak suyun kullanıldığı öğütülmüş hammaddeden kahve ve çay yapımı katı-sıvı ekstraksiyon işlemine örnek olarak verilebilir [71].

Konvansiyonel ekstraksiyon yöntemlerinin başında Soxhlet ekstraksiyonu gelmektedir. Katı-sıvı ekstraksiyon için kullanılan en eski ve en yaygın yöntemlerden olan Soxhlet ektraksiyonunun kullanımın kolay olması, maliyet düşüklüğü, aynı zamanda birden fazla ve yüksek miktarda ekstrakt eldesi gibi avantajları bulunmaktadır. Fakat uzun işlem süresi, yüksek miktarda hammadde ihtiyacı ve çevreyi olumsuz etkilemesi gibi önemli dezavantajları da vardır. Kullanılan numune ekstraksiyon boyunca, uzun süre yüksek sıcaklıklara maruz kaldığından sıcaklığa karşı hassas olan materyallerde kullanımı uygun değildir. Son yıllarda ise Soxhlet ekstraksiyonu diğer modern ekstraksiyon yöntemlerine destek olarak kullanılmaktadır [72]. Klasik ekstraksiyon yöntemlerinden bir diğeri olan maserasyon yönteminde, örnek yeterli boyut küçültme işlemlerinden sonra, çözücü içerisinde genellikle oda sıcaklığında belli bir süre bekletilerek ekstrakt elde edilmektedir. Maserasyon işlemi kolay ve ekonomiktir fakat ekstrakt verimi oldukça düşüktür [73]. Bir diğer yöntem olan perkolasyon yönteminde ise, örnek perkolatöre konulur ve belirli bir zamanda içerisindeki çözücü yenilenerek ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir [74]. Bu yöntemlerin sonucunda elde edilen ürün kalitesi çok yüksek olmasına rağmen uzun ekstraksiyon süresi ve yüksek miktarlarda çözücü kullanılması bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır [75]. Bu sebeple son

yıllarda, klasik yöntemlerin yeni tekniklerle kombine edilerek kullanılması oldukça önem kazanmıştır. Bu amaca yönelik, ultrasesin etkisi dikkate alınarak ultrases destekli soxhlet aparatı geliştirilmiştir. Soya fasülyesi ve ayçiçek yağı gibi yağlı tohumlarından yağ ekstraksiyonunda bu kombine ekstraksiyon yöntemi (Şekil 1.6) kullanılmıştır [76]. Bitkisel kaynaklardan biyoaktif bileşen ekstraksiyonu için katı-sıvı ekstraksiyonu günümüzde yerini modern yöntemlere bırakmasına rağmen uzun yıllardır kullanılmaktadır.



Şekil 1.6 Ultrases destekli soxhlet ekstraksiyonu [76].

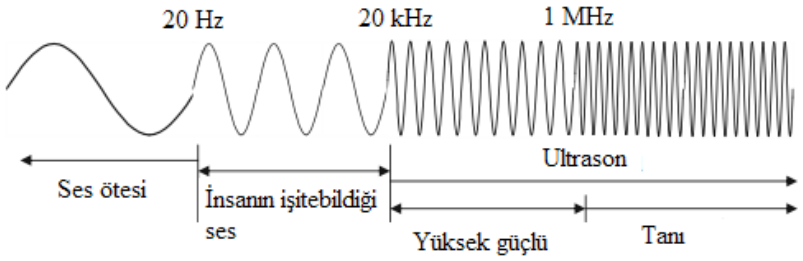
Klasik çözücü ekstraksiyonuna, 2006 yılında Juntachote vd. [77] limon otu (*Cympopogon citratus*), havlıcan (*Alipnia galanga*), hint fesleğeni (*Ocimum sanctum*) ve biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ile yaptıkları çalışma örnek verilebilir. Çalışmada, sıcaklık, süre ve etanol:su oranı bağımsız değişken olarak kullanılmış ve ekstrakte edilen fenolik maddelerin antioksidan özelliklerinin yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu sağlanmıştır. Etanol su oranının, kullanılan tüm örnekler için ekstraksiyon verimi ve toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisinin en fazla olan bağımsız değişken olduğu belirtilmiştir. Fakat etanol:su oranının antioksidan aktivite üzerinde etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığının, limon otunda ekstraksiyon verimi ve hint fesleğeni ile biberiyede ise toplam fenolik madde üzerinde önemli bir etkisi olduğunu saptanmıştır. Ekstraksiyon süresinin ise sadece Hint fesleğeninin antioksidan aktivitesi üzerinde etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Silva vd. [78] tarafından klasik çözücü ekstraksiyonu ile *Inga edulis* bitkisinin yapraklarından fenolik bileşik eldesinin yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimizasyonu sağlanmıştır. Etil alkol konsantrasyonu, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Kullanılan tasarımda cevap olarak toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarı belirlemiştir. % 86.8 etil alkol, 58.2 ^{o}C ve 46.8 dakika ekstraksiyon süresi optimum ekstraksiyon koşulu olarak tespit edilirken bu koşullarda toplam fenolik bileşik miktarı 134.6 mg/g kuru madde ve toplam flavonoid 26.0 mg/g olarak saptanmıştır.

Başka bir çalışmada, *Euterpe oleracea* meyvesinden klasik çözücü ekstraksiyonu kullanılarak fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Yanıt yüzey yöntemi yardımıyla optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Bağımsız değişken olarak sıcaklık, etil alkol ve hidroklorik asit konsantrasyonu seçilen çalışmada toplam fenolik madde ve ORAC yöntemi kullanılarak antioksidan kapasite miktarı belirlenmiştir. Çalışma sonucunda, % 70-80 etil alkol, 0.065 - 0.074 mol/L hidroklorik asit konsantrasyonu ve 58 ^{o}C optimum ekstraksiyon koşulları olarak tespit edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin arasında sıcaklık, ekstraksiyon verimine en etkili faktör olarak gözlenmiştir [79].

1.1.4.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon

İnsanların duyabileceği ses dalgaları 20 Hz ile 20 kHz arasındadır. İnsan kulağı tarafından duyulabilen ses aralığının dışında olan frekanslardaki mekanik ses dalgalarına ultrases veya ultrason denilmektedir [80]. Bu dalgalar katı, sıvı ve gaz ortamlarında farklı titreşimde ve hızda yayılırlar. Ses dalgası bulundukları ortamda yayılırken ortamın parçacıkları, dalganın hareket doğrultusu boyunca yoğunluk farkı oluşturarak titreşirler [81]. Şekil 1.7'de ses dalga çeşitleri gösterilmiştir.



Şekil 1.7 Ses dalgası tipleri [82].

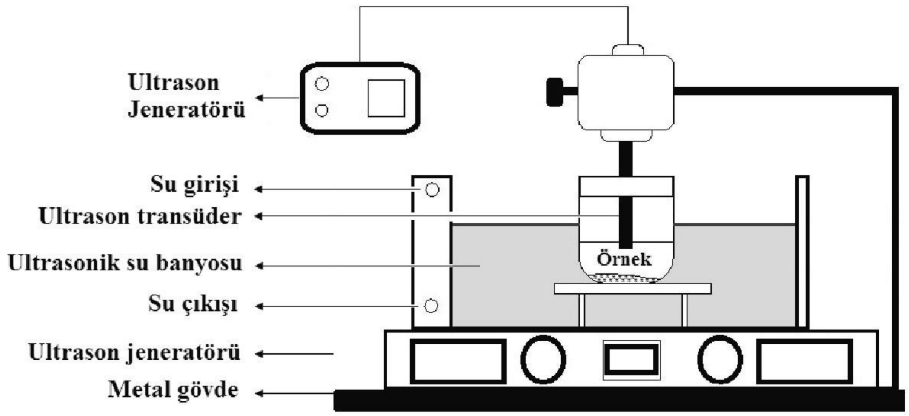
20 kHz'den yüksek frekanslarla akustik titreşimler meydana getirerek ses dalgaları oluşturan ekstraksiyon yöntemine ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi denilmektedir. Ultrasonik enerji, kavitasyon olarak adlandırılan boşluk oluşumuna sebep olup sıvı içinde birçok küçük kabarcıklar üreterek katının mekanik erozyonuna sebep olur ve partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları, katıların ekstraksiyonu için kullanılırken çamur oluşumunu, sıvılar için kullanılırken ise homojenizasyon veya emülsiyon işlemini sağlar [83]. Çizelge 1.4'te de görüldüğü gibi gıda sanayinde birçok alanda kullanılan ultrases uygulamaları için genellikle 20 kHz ile 1 MHz frekans aralığındaki ses dalgaları kullanılmaktadır.

Çizelge 1.4 Ultrasesin gıdalardaki uygulama alanları ve etkileri [84]

UYGULAMA	ETKİ
Katı yağların ve şekerlerin kristalizasyonu	Kristalizasyon akısını arttırır, nükleasyonu uniformize eder.
Ektraksiyon	Ekstraksiyon hızı ve etkinliğinin arttırılmasını sağlar.
Kurutma	Sıcak havayla kurutmada, kuruma etkinliğini arttırarak daha düşük sıcaklıklarda ve hava hızlarında yüksek verimle kuruma sağlar.
Atık işleme	Pestisit kalıntılarının giderilmesinde etkilidir.
Etin olgunlaşması	Kürlenmiş etlerde miyofibriler proteinlere etki eder.
Ultrason destekli dondurma	Donmada kristal büyüklüğü kontrolü ve buz kristal oluşum bölgesinde geçen sürenin kısaltılmasını sağlar.
Mikrobiyal inaktivasyon	Sıcaklık ve basınçla kombine olarak uygulanan ultrason işlemiyle mikrobiyal inaktivasyonu daha fazla etkinleştirir
Ultrason destekli filtrasyon	Filtre ortamından birim alandan birim zamanda geçen madde miktarında artış meydana getirir.

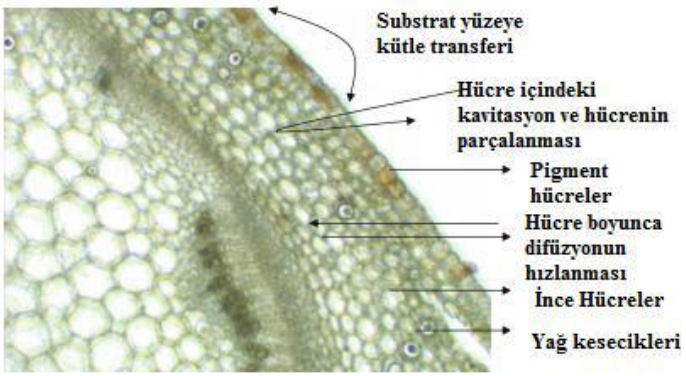
Ses dalgasının ortama yayılması için elektrik enerjisinden ses üreten cihazlar kullanılmaktadır. Bu cihazlar belirli bir frekansla çalışarak bir dönüştürücü yardımıyla alternatif akımı mekanik titreşimlere dönüştürürler. Cihazlar genellikle, kullanım alanları ve etkilerine göre ultrasonik prob ve ultrasonik banyo olarak adlandırılmaktadır. Ses dalgalarının sıvı ortama daha homojen yayılabilmesinden dolayı, birçok çalışmada ultrasonik banyonun kullanımı tercih edilmiştir. Fakat prob uygulamalarına göre daha az akustik şiddet uygulanabilmesi ve özellikle zayıf sıcaklık kontrolü ultrasonik banyo uygulamasının dezavantajıdır. Ultrasonik prob kullanılarak ultrases gücünden daha etkin faydalanmanın mümkün olması sistemi avantajlı kılmaktadır. Ancak radikallerin oluşma ihtimali ve bazı yüzeylerde erozyon oluşumuna

bağlı olarak metal kontaminasyonunun meydana gelmesi gibi durumlar da sistemin dezavantajı olabilmektedir [80]. Şekil 1.8' de ultrases destekli ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 1.8 Ultrases destekli ekstraksiyon sistemi [85]

Bitkilerin ekstraksiyonu için kullanılan ultrasonik uygulamada ses dalgalarının bitki hücresini parçalaması ile difüzyon ve ozmotik proses hızlanmaktadır. Böylece ekstraksiyon hızı ve verimi artırmaktadır. Ekstraksiyon işlemi boyunca önce çözücü bitki hücresine difüzlenir ve böylece hücre şişer, sonra hücre duvarı parçalanır ve hücre içindeki bileşenler çözücüye geçer [86]. Hücre duvarının parçalanması sonucunda çözücünün hücre içine nüfuz etmesi Şekil 1.9'da gösterilmiştir.



Şekil 1.9 Hücre duvarının kavitasyon ile parçalanması ve çözücünün hücre içine geçişi [86].

Ultrases uygulaması genellikle gıdaların raf ömrünü uzatmak, verimi ve ekstraksiyonu arttırmak, reolojik özellikleri geliştirmek için kullanılır. Bununla birlikte, ultrases genellikle mikrobik ve enzimatik inaktivasyon için sıcaklık, basınç, ışınlama gibi diğer

inaktivasyon yöntemleri ile birlikte kullanılabilmektedir. Orta ve yüksek sıcaklıkta uygulanan ultrases, termosonikasyon olarak tanımlanır [87].

Ultrasonik ekstraksiyon verimini, bitkinin nem oranı, tanecik büyüklüğü ve kullanılan çözücü gibi faktörlerle beraber sıcaklık, frekans ve zaman gibi faktörler de etkilemektedir [88]. Ekipmanın ucuz olması, kullanım kolaylığı, çevreye zarar vermemesi ve yüksek verim elde edilmesi ultrases destekli ekstraksiyonun avantajları arasında gösterilmektedir [89], [90], [91].

Nephelium lappaceum L. meyve kabuğundan biyoaktif bileşenlerin (toplam antosiyanin, fenolik ve flavonoid miktarı) ekstraskiyonu için ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılan çalışmada, optimizasyon için merkezi kompozit tasarımı tercih edilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı (30-50 °C), ultrason gücü (20-40 W), ekstraksiyon süresi (10-30 dk) ve katı:sıvı oranı (1:10-1:20 g/mL) bağımsız değişken olarak kullanılmıştır. Optimum koşullar altında (50 °C, 20 dk ve 1:18.6 g/mL) toplam antosiyanin miktarı 10.26 ± 0.39 mg/100g, fenolik miktarı 552.64 ± 1.57 mg GAE/100g ve flavonoid miktarı 104 ± 1.13 mg RE/100g olarak tespit edilmiştir. Ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin biyoaktiflerin eldesi için verimli bir yöntem olduğu vurgulanmıştır [92].

Corbin vd. [93] yaptıkları bir çalışmada keten tohumundan ultrases destekli ekstraksiyon ile fenolik maddelerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntem ile musilaj oluşumunda azalma ve ekstraksiyon veriminde artış sağlanmıştır. Çalışma sonunda diğer metotlar ile karşılaştırıldığında ultrases destekli ekstraksiyonun en yüksek fenolik madde eldesini sağladığını belirtmişlerdir.

Hossain vd. [94] mercanköşk bitkisinden ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi ile antioksidan ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Ekstraksiyon sıcaklığı (15–35 °C) ve uygulama süresi (5–15 dk) bağımsız değişkenler olarak kullanılmıştır. Yanıt yüzey yöntemi kullanılarak yapılan optimizasyonda, 35 °C ve 15 dakika ekstraksiyon uygulanan örneğin toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri en yüksek olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada ise Hammi vd. [95] Tunus *Zizyphus lotus* meyvesinden ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanarak antioksidan ekstrasksiyonu

gerçekleştirmişlerdir. Optimizasyon için yanıt yüzey yönteminin kullanıldığı çalışmada zaman, çözücü:çözünen oranı ve sıcaklık bağımsız değişkenler olarak belirlemiştir. Optimum antioksidan ekstraksiyon koşulu için 25 dakika ekstraksiyon süresi, 63 ˚C sıcaklık ve 67 mL/g çözücü oranı saptanmıştır.

Rodrigues vd. [96], Hindistan cevizi kabuğundan ultrasonik banyo kullanarak fenolik bileşikleri ekstrakte etmişlerdir. Ultrasonik güç sabit tutulup farklı sıcaklık ve çözücüler kullanılarak bunların ekstraksiyona verimi hesaplanmıştır. En iyi verim, % 50 etil alkol çözeltisinde 30 °C'de gerçekleştirilen ekstraksiyonda gözlenmiştir.

1.1.4.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Dalga boyları 1.0 mm ile 1.0 m arasında olan frekansı 300 MHz ve 300 GHz arasında değişen elektromanyetik ışımalara mikrodalga denilmektedir. Mikrodalgalar, elektromanyetik radyasyonun bir çeşididir ve elektromanyetik spektrumda kızıl ötesi (infrared) dalgaları ile radyo dalgaları arasında bulunurlar. Mikrodalgalar, dipolar veya iyonik parçacıkların göç etmesi ile moleküler bir harekete neden olarak moleküllerin ısınmasını sağlarlar [97].

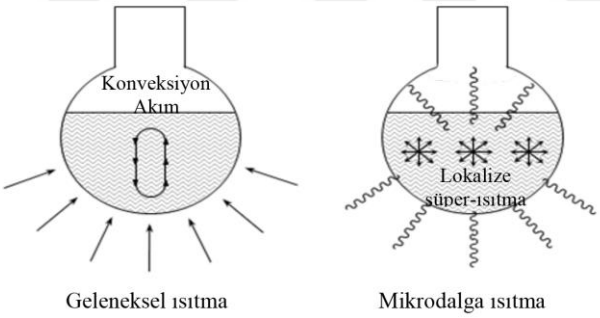
Mikrodalga ile ısıtmada, dielektrik ve iyonik kondüksiyon mekanizmaları etkindir. Dielektrik ısıtmada prensip, dipolar yapıdaki moleküller elektrik alanda meydana gelen değişiklikler sonucunda dönmesi nedeniyle tekrardan düzenlenmesidir. Dipolar moleküller 2450 MHz'de düzenlenerek saniyede 4.9×10^9 kez rastgele bir şekilde dağıtılırlar. Bu hareket sonucunda titreşimler oluşur ve ısı açığa çıkar. İyonik kondüksiyon mekanizmasındaki ısı ise manyetik alan uygulaması sonucunda iyonların hareket etmesi ile oluşur. Çözücünün iyon akışına gösterdiği direnç sonucunda sürtünme meydana gelir ve çözücü ısınır. Birçok uygulamada iki mekanizma da eş zamanlı olarak meydana gelir [70], [98].

Mikrodalga uygulamaları gıdalarda uzun yıllardır çeşitli amaçlar (Çizelge 1.5) için kullanılmaktadır ve son yıllarda ekstraksiyon verimini arttırmak için tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon, polar kimyasalların dielektrik sabiti ile bağlantılı olarak mikrodalga enerjiyi absorplama yeteneğine dayanır. Şekil 1.10'da da görüldüğü gibi geleneksel ısıtmanın aksine mikrodalga ısıtmada

numunenin tamamı aynı anda, homojen ve hızlı bir şekilde ısınmaktadır. Mikrodalga ışınlar, hücreler içerisindeki suyu ısıtır ve buharlaşma sonucunda hücre duvarına basınç uygulanır. Bu şekilde hücre duvarı yüksek basınçla parçalanır ve bileşenlerin çözücüye geçişi sağlanır [70], [98], [99].

Çizelge 1.5 Gıda alanında mikrodalga uygulamaları [100]

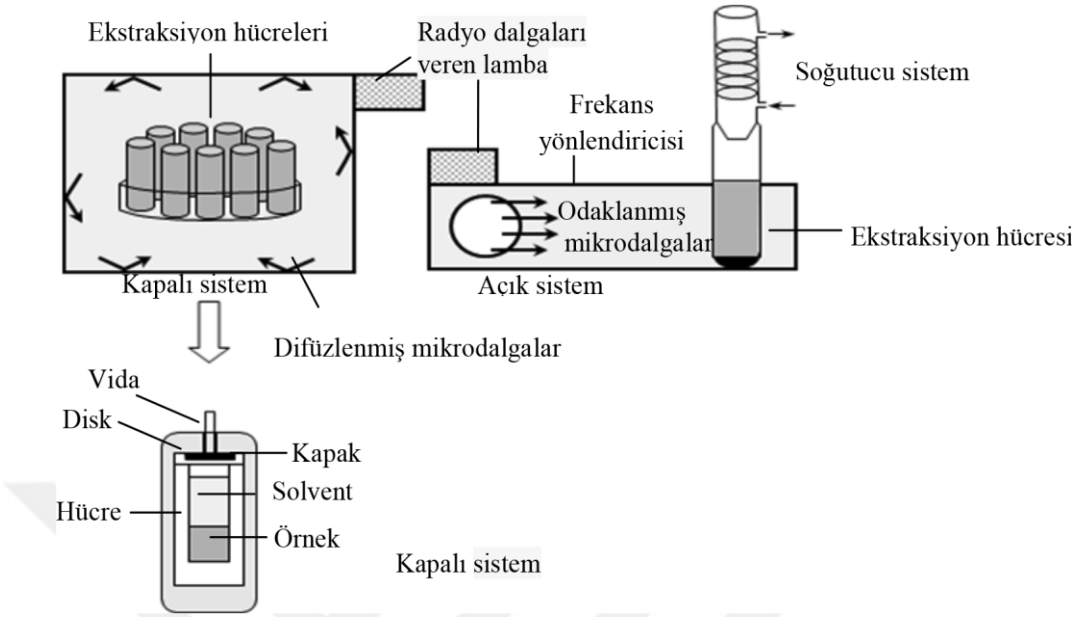
Uygulama	**Frekans** (MHz)	**Güç** (kW)	**Ürün**
Temperleme	915	30-70	Kırmızı et, balık eti, kümes hayvanları eti
Kurutma	915 / 2450	30-50	Makarna, soğan, çerez gıdalar, meyve suları
Ön ısıtma	915	50-240	Domuz pastırması, köfte, kümes hayvanları eti, sucuk, sosis, sardalye
Pastörizasyon / Sterilizasyon	2450	10-30	Taze makarna, hazır yemekler, poşet ambalajlı gıdalar, yarı katı gıdalar, süt, dilim ekmek
Fırında Pişirme	915	2-10	Ekmek, donat(donut) fermentasyonu



Şekil 1.10 Geleneksel ve mikrodalga ısıtma şekilleri [101]

Mikrodalga destekli ekstraksiyon kapalı ve açık kap sistemi olmak üzere iki farklı teknikle uygulanabilmektedir. Her iki sistem de Şekil 1.11 ’de gösterilmiştir [102]. Kapalı kap uygulamasında sıcaklık ve basınç kontrol altındayken açık kap uygulamasında sistem atmosferik basınç altındadır [103]. Açık kaplarda sıcaklık, çözücünün atmosferik basınçta kaynama noktasıyla sınırlıyken diğer sistem olan kapalı kaplarda ise sıcaklık uygulanan basınçla yükseltilebilmektedir [104]. Kapalı sistemde ekstraksiyon sonrasında kap açılmadan önce sıcaklığın düşmesi için bir süre beklemek gerekir. Bu durum da ekstraksiyon süresini artırır. Uçucu bileşenlerin ekstraksiyonu için kapalı kap sisteminin daha uygun olduğu düşünülmektedir [105]. Açık kap

uygulamaları, kapalı kap uygulamalarına göre daha güvenlidir ve ayrıca daha fazla miktarda örnek ekstrakte etmeye imkân sağlamaktadır [106].



Şekil 1.11 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda kapalı ve açık sistem [102]

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, hızlı ısı üretimi sayesinde daha az sürede ve daha iyi kalitede ürün elde edilmektedir [60], [107]. Ekstraksiyon zamanını ve çözücü tüketimini azalttığı ayrıca ekstraksiyon verimini arttırdığı gözlenmiştir [108]. Ekstraksiyon verimi, uygulama süresine, sıcaklığa, katı:sıvı oranına, kullanılan solventin türüne ve konsantrasyonuna göre değişiklik gösterebilir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun koşulu ile ekstrakte edilmek istenen bileşiklerin kararlılığı arasında net bir ilişki vardır. Örneğin fenolik maddelerin yüksek miktarda hidroksil grubu içermeleri nedeniyle mikrodalga ekstraksiyonu sırasında meydana gelen ani sıcaklık yükselmesinden daha kolay etkilendiği rapor edilmiştir [60]. Ayrıca çözücünün dielektrik özelliklerine göre ekstraksiyon veriminin değişebileceği belirtilmiştir [60], [61], [107]. Mikrodalga ekstraksiyonun, uygulama sonrasında filtre ya da santrifüj işlemi gerektirmesi, çözücü apolar veya bileşen uçucu ise mikrodalga etkinliğinin düşük olması ve yüksek mikrodalga gücü ve süresi hedef bileşiklerin olumsuz etkilenmesine neden olması gibi dezavantajları da mevcuttur [109].

Literatürde, mikrodalga destekli ekstraksiyon ile fenolik bileşenlerin elde edilmesi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Liazid vd. [110] kapalı sistem mikrodalga fırın kullanarak

22 farklı fenolik bileşik ekstraksiyonu gerçekleştirdikleri çalışma örnek verilebilir. 500 W sabit güç ve 50 ile 175 ˚C sıcaklık aralığında gerçekleştirilen çalışmada fenolik maddelere sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Fenolik bileşenlerin 100 ˚C' ye kadar stabil kaldıkları fakat 125 ˚C'nin üzerindeki sıcaklıklarda degradasyona uğradıkları tespit edilmiştir. Ayrıca çok miktarda hidroksil grubu içeren bileşenlerin sıcaklıktan daha fazla etkilendikleri gözlenmiştir.

Çözücü kullanılmadan mikrodalga destekli ekstraksiyonun denendiği bir çalışmada ise 50 g kiraz örneğine 180 saniye boyunca 1000 W mikrodalga gücü uygulanmıştır. Mikrodalga sayesinde hücreler parçalanmış ve böylece hücre içerisindeki sıvı açığa çıkarılmıştır. Yöntem çözücü kullanılmadan da gerçekleşebildiği için ekonomik ve çevre dostu bir yöntem olarak önerilmiştir [111].

1.1.5 Yanıt Yüzey Yöntemi

Deneysel çalışmalardaki proseslerin parametrelerinin düzgün şekilde belirlenmesi ve doğru analiz sonuçlarına ulaşılması için deneylerin tasarımına gerek duyulmaktadır [112]. “Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması” ismi ile Box ve Wilson tarafından 1951 yılında tanımlanan “Yanıt Yüzey Yöntemi” de bu anlamda istatistiksel bir deney tasarımıdır [113]. Yöntem, bağımlı değişkenler ve cevaplar arasındaki bağlantıları varyans (ANOVA) ve regresyon analizi kullanarak belirler. Bu şekilde, bağımsız değişkenlerin proses üzerine olan etkilerinin optimizasyonu, matematiksel ve istatistiksel olarak belirlenmiş olur [112]. Yanıt yüzey yönteminin farklı deneysel tasarım modelleri mevcuttur. “Central Composite” ve “Box-Behnken” en çok bilinen tasarım modelleridir. Son zamanlardaki çalışmalarda sıklıkla tercih edilen yanıt yüzey yöntemiyle zaman, emek ve maliyet ihtiyacını en aza indirerek çalışılan girdiye ilişkin matematiksel formülle değişkenlerin optimum değerlerini elde etmek mümkündür [114].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, son yıllarda ülkemizde kültürü yaygın olarak yapılan ve dünya genelinde biyoaktif özellikleri nedeniyle önemi artan reyhan bitkisinin yapraklarından, biyoaktif bileşenlerin klasik çözücü ekstraksiyon, ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyon

yöntemleri ile elde edilmesi ve toplam fenolik, toplam antosiyanin, toplam flavonoid madde miktarı ile antioksidan kapasitesinin belirlenip yanıt yüzey yöntemi ile her bir ekstraksiyon yöntemi için optimum ekstraksiyon koşullarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Değerli biyoaktif bileşenlere sahip olması ve özellikle bu bileşenlerin farmakolojik etkilerinin bulunması nedeniyle dünyada ve Türkiye'de ticari önemi artan reyhan yapraklarının farklı yöntemlerle ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi ve ekstraksiyon verimini etkileyen faktörlerin belirli deneme planları yapılarak incelenmesi sonucunda optimum ekstraksiyon koşullarının saptanması beklenmektedir.

BÖLÜM 2

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Reyhan Bitkisi

Çalışmada kullanılan reyhan (*Ocimum basilicum* L.) örnekleri, Elazığ'da yerel marketlerden temin edilmiştir. Reyhanın yaprakları gövdeden ayıklanmış ve daha sonra yapraklar 35 °C etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Kurutulan reyhan yaprakları (Şekil 2.1) öğütücüde öğütülmüş ve çay boyutunun ekstraksiyon verimine etkisini anlamak için 3 farklı boyutta olacak şekilde elekten (Şekil 2.2) geçirilmiştir. Her reyhan boyutu için aynı ekstraksiyon koşulu sağlanmış ve ekstraktlara uygulanan analizler sonucunda kullanılacak reyhan boyutuna karar verilmiştir. 1-2.2 mm boyut aralığında olacak şekilde boyut standardı ayarlanan reyhan yaprakları (Şekil 2.3) analiz zamanına kadar hava almayacak şekilde kapatılarak oda koşullarında bekletilmiştir.



Şekil 2.1 Kurutulmuş reyhan yaprakları



Şekil 2.2 Elek sarsma cihazı



Şekil 2.3 Elenmiş reyhan yaprakları

2.1.2 Alet Ekipman Tanımları

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1800)

Saf su cihazı (Mikrotest- MSD serisi)

Su banyosu (Daihan WB-22)

Ultrasonik banyo (Isolab)

Mikrodalga fırın (Samsung GE83X)

Santrifüj (MPW-260 RH)

Etüv (Nüve FN 055)

Elek sarsma cihazı (Atel-San)

Öğütücü (Bosch MKM6000)

Hassas terazi (Kern ABJ 220-4 NM)

Su ısıtıcısı

Vorteks

2.1.3 Kimyasal Maddeler

Gallik asit (≥98.0%)

Folin-Ciocalteu reaktifi

Sodyum karbonat (Na_2CO_3)

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Troloks)

Alüminyum klorür ($AlCl_3$)

Sodyum nitrit ($NaNO_2$)

Sodyum hidroksit (NaOH)

Bakır (II) Klorür ($CuCl_2$)

Amonyum asetat (NH_4Ac)

Neocuproine

Potasyum klorür(KCl)

Sodyum asetat ($C_2H_3NaO_2$)

2.2 Yöntemler

2.2.1 Yanıt Yüzey Yöntemi ve İstatistiksel Analiz

Çalışmada, fenolik madde ekstraksiyon optimizasyonu için Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology, RSM), deneysel tasarım için ise Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composit Design, CCD) kullanılmıştır.

Klasik çözücü ekstraksiyonunda bağımsız değişkenler sıcaklık (X_1) ve süre (X_2) yine aynı şekilde Ultrases destekli ekstraksiyon için de bağımsız değişkenler sıcaklık (X_1) ve süre (X_2) olarak belirlenmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için ise mikrodalga gücü (X_1) ve ekstraksiyon süresi (X_2) bağımsız değişkenler olarak tercih edilmiştir. Bağımlı değişkenler ise her üç ekstraksiyon türü için de toplam fenolik madde miktarı, antioksidan kapasite (CUPRAC), toplam flavonoid miktarı ve toplam antosiyanin miktarı olarak belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış değerleri klasik ekstraksiyon için Çizelge 2.1'de, ultrases destekli ekstraksiyon için Çizelge 2.2'de ve mikrodalga destekli ekstraksiyon için ise Çizelge 2.3' te verilmiştir.

Çizelge 2.1 Klasik ekstraksiyon için bağımsız değişken değerleri

Faktör Seviyeleri			
Bağımsız Değişkenler	**Düşük (-1)**	**Merkez (0)**	**Yüksek (+1)**
Sıcaklık -°C (X_1, Faktör 1)	30	45	60
Süre-dk (X_2, Faktör 2)	10	20	30

Çizelge 2.2 Ultrases destekli ekstraksiyon için bağımsız değişken değerleri

Faktör Seviyeleri			
Bağımsız Değişkenler	**Düşük (-1)**	**Merkez (0)**	**Yüksek (+1)**
Sıcaklık -°C (X_1, Faktör 1)	30	45	60
Süre-dk (X_2, Faktör 2)	10	20	30

Çizelge 2.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon için bağımsız değişken değerleri

Faktör Seviyeleri			
Bağımsız Değişkenler	**Düşük (-1)**	**Merkez (0)**	**Yüksek (+1)**
Güç -W (X_1, Faktör 1)	300	450	600
Süre-dk (X_2, Faktör 2)	1	2	3

$$Z = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=1}^{3} \beta_{ij} x_i x_i + \varepsilon_0 \qquad (2.1)$$

Denklem 2.1'de verilen kuadratik denkleme göre modeller belirtilmiştir. Denklemdeki Z bağımlı değişken, X bağımsız değişken, β_0 bağımsız değişken katsayısı, n bağımsız değişken sayısı, β_i birinci dereceden denklem katsayısı, β_{ii} ikinci dereceden denklem katsayısı, β_{ij} iki faktörlü çapraz etkileşim katsayısı, ε_0 deneysel hatadır.

Design Expert 7.0.0 programı, deneysel verilerin regresyon ve varyans analizi (ANOVA) ile Denklem 2.1'in katsayılarının hesaplanması için kullanılmıştır. Klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sonuçları için ANOVA istatistiksel analizi ayrı ayrı uygulanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda en uygun yanıt yüzey modelinin her üç ekstraksiyon yöntemi için de kuadratik model olduğu görülmüştür. Design Expert 7.0.0 programı kullanılarak elde edilen ANOVA analizinde serbestlik derecesi, karelerin ortalaması, F değeri, olasılık değeri, önem derecesi ve R^2 değerleri tespit edilmiştir.

2.2.2 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Klasik çözücü ekstraksiyonunda 100 mL hacmindeki schott şişelerle çalışılmıştır. Şişelere 1:20 oranında olacak şekilde 2.5 g reyhan tartılıp üzerine istenilen sıcaklığa getirilmiş 50 mL saf su eklenerek kapakları kapalı bir şekilde belirlenen süre boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda reyhan numunesi içeren ekstraktlar kaba filtre kâğıdı yardımıyla süzülmüş (Şekil 2.4) ve sonrasında 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 2.5). Üst faz alınarak analizler gerçekleştirilene kadar -18 °C'de depolanmıştır. Yukarıda bahsedilen yöntem, Karasu vd. [115] tarafından kullanılan yöntem sentezlenerek oluşturulmuştur.



Şekil 2.4 Kaba filtre kâğıdı ile numunelerin süzülmesi işlemi



Şekil 2.5 Santrifüj işlemi

2.2.3 Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Ultrases destekli ekstraksiyon çalışmasında öncelikle ön çalışma yapılarak sistemin uygunluğu ve amplitude (genlik) değeri belirlenmiştir. Ultrasonik banyoda (Şekil 2.6) yapılan ön denemeler sonucunda en iyi verimin % 100 amplitude değerinde olduğu tespit edilmiş olup çalışmalar bu genlik değerinde yapılmıştır.

Ultrases destekli ekstraksiyonda klasik yöntemde olduğu gibi 100 mL'lik şişelere 2.5 g reyhan tartılıp üzerine belirlenen sıcaklığa getirilmiş 50 mL saf su eklenmiştir. Şişeler kapakları kapalı bir şekilde % 100 amplitude değerinde belirlenen süre ve sıcaklıklarda bekletilmiştir. Süre boyunca oluşan ses dalgaları ortam suyunun sıcaklığını arttırdığından belirli sürelerde ortama soğuk su ilavesi yapılarak numunelerin iç sıcaklığı sabit tutulmaya çalışılmıştır. Süre sonunda şişelerdeki numuneler kaba filtre kâğıdı yardımıyla süzülmüş ve sonrasında 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak analizler gerçekleştirilene kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Kullanılan bu yöntem, Karaman vd. [116] tarafından geliştirilen yöntem sentezlenerek oluşturulmuştur.



Şekil 2.6 Ultrasonik banyo

2.2.4 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon için ev tipi mikrodalga fırın kullanılmıştır (Şekil 2.7). Öncelikle, ön çalışma yapılarak uygun mikrodalga gücü ve süresi belirlenmiştir. Denemeler sonucunda çok yüksek değerdeki mikrodalga gücü, işlem süresi kısa olmasına rağmen reyhanın biyoaktif bileşenlerini olumsuz etkilediği gözlenmiştir.

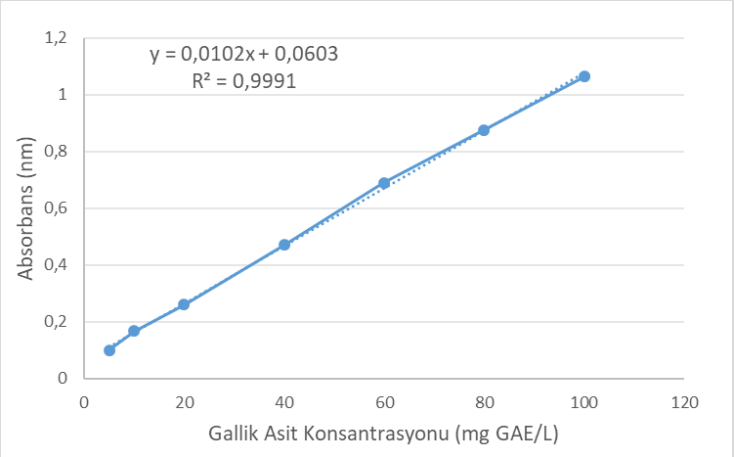
Bu yöntemde 250 mL hacmindeki beherlerle çalışılmıştır. Beherlere 5 g reyhan tartılıp üzerine oda sıcaklığında 100 mL saf su eklenerek belirlenen güç ve süre boyunca ekstraksiyon sağlanmıştır. Süre sonunda numuneler kaba filtre kâğıdı yardımıyla süzülmüş ve sonrasında 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz alınarak analizler gerçekleştirilene kadar -18 °C'de saklanmıştır.



Şekil 2.7 Ev tipi mikrodalga fırın

2.2.5 Toplam Fenolik Madde Analizi

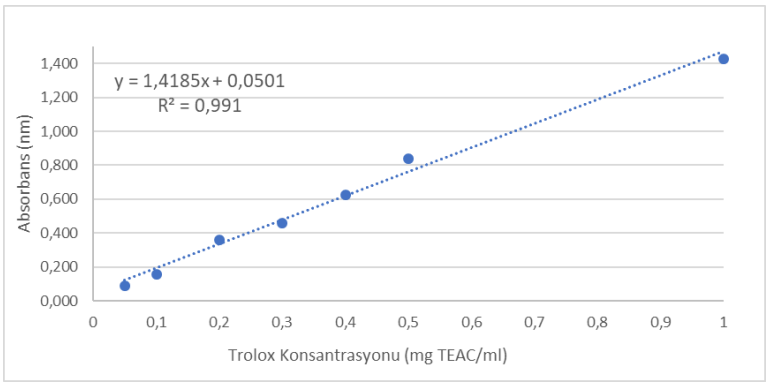
Toplam fenolik madde analizi Folin-Ciocalteau yöntemine göre yapılmıştır [117]. Uygun oranda saf su ile seyreltilen ekstraktlardan 0.5 mL alınıp üzerine 2.5 mL 0.2 N Folin-Ciocalteau reaktifi eklenmiş ve 3 dakika sonra 2 mL %7.5 (w/v) Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler oda sıcaklığındaki karanlık ortamda 30 dakika bekletildikten sonra vortekslenip spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı gallik asit kalibrasyon eğrisi (Şekil 2.8) kullanılarak gallik asit cinsinden mg GAE/g örnek olarak verilmiştir. Analizler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiş olup sonuçların ortalaması alınmıştır.



Şekil 2.8 Gallik asit kalibrasyon eğrisi

2.2.6 Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Antioksidan kapasitenin belirlenmesi için Apak vd. [118] tarafından geliştirilen CUPRAC yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin temeli, 2,9-dimetil-1, 10-fenantrolin'in Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm' de maksimum absorbans veren bakır (I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) çelatına indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan aktivitenin belirlenmesine dayanmaktadır [118]. Yöntemde, kararlı bir reaktif olan aynı anda hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara cevap veren CUPRAC oksidan olarak kullanılmıştır. 3 paralelli olacak şekilde her bir tüpe 1 mL $CuCl_2$, 1mL Neocuproine, 1 mL NH_4Ac, 0,1 mL uygun oranda seyreltilmiş numune, 1mL saf su ilave edilmiş ve vortekslenip karanlık bir ortamda 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra örneklerin absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Antioksidan kapasite değeri troloks kalibrasyon eğrisi (Şekil 2.9) kullanılarak troloks eş değeri cinsinden mg TEAC/g örnek olarak verilmiştir.



Şekil 2.9 Trolox kalibrasyon eğrisi

2.2.7 Toplam Flavonoid Miktarı Analizi

Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarlarının belirlenmesi Zhinsen vd. [119] tarafından geliştirilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Uygun oranlarda seyreltilmiş ekstraktlardan her bir tübe 1 mL alınmış, üzerine 4 mL saf su ve 0.3 mL %5'lik sodyum nitrit ($NaNO_2$) çözeltisi eklenmiş, 5 dakikalık süre sonunda 0,3 mL %10'luk alüminyum klorür ($AlCl_3$) çözeltisi ilave edilip karıştırılmış ve 6 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 2 mL 1M NaOH eklenip hacmi 10 mL'ye saf suyla tamamlanmıştır. Örneklerin absorbans değerleri UV-VIS spektrofotometre cihazında (Şekil 2.10) 510 nm dalga boyunda okunmuştur. Analizler 3 paralelli olarak gerçekleştirilmiş olup sonuçların ortalaması alınmıştır. Sonuçlar kateşin eşdeğer cinsinden hesaplanarak mg CAE/g örnek olarak verilmiştir. Toplam flavanoid içeriğinin hesaplanmasında kullanılan Denklem 2.2 aşağıda verilmiş olup çıkan sonuç gerekli işlemlerle istenilen birime çevrilmiştir.

$$\underline{\text{Toplam Flavonoid Miktarı (mg CAE/L)}} = [(151{,}6 \times Abs) - 0{,}05454] \times SF \qquad (2.2)$$

Abs: Örneğin absorbansı

SF: Seyreltme faktörü



Şekil 2.10 Örneklerin absorbans değerlerinin okunduğu spektrofotometre cihazı

2.2.8 Toplam Antosiyanin Miktarı Analizi

Örneklerin toplam antosiyanin miktarı analizi pH diferansiyel metoduna göre gerçekleştirilmiştir [120]. Yöntemin temeli, monomerik antosiyaninlerin pH 1.0 da renkli oksonium formunun, pH 4.5 de ise renksiz hemiketal formunun baskın olmasına dayanmaktadır. Bu durumda, örneklerde bulunan antosiyanin konsantrasyonu, ortam pH 1.0 ve pH 4.5 olduğunda elde edilen absorbans değerlerinin farkı ile orantılı olarak

bulunmaktadır. Basit ve çok duyarlı olan analiz için pH 1.0 ‘de potasyum klorür tampon çözeltisi (0.025 M) ve pH 4.5 ‘te sodyum asetat tampon çözeltisi (0,4 M) kullanılmıştır. Ekstraktlar pH 1.0’de (potasyum klorür) absorbans değerleri 0.4-0.6 aralığında olacak şekilde seyreltilmiştir. Bu temele göre yapılan seyreltmenin seyreltme faktörü hesaplanmıştır. Absorbans değerleri 520 ve 700 nm’de okunmuştur. Örneklerin absorbans farkı (2.3) eşitliği yardımıyla, toplam antosiyanin içeriği, siyanidin-3-glukozit cinsinden (2.4)’e göre elde edilmiştir. Sonuçlar, gerekli işlemler yapılarak istenilen birime çevrilip mg Cy-3-glu/kg olarak verilmiştir.

$$\underline{A} = (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH\ 1.0} - (A_{\lambda 520} - A_{\lambda 700})_{pH\ 4.5} \quad (2.3)$$

$$\underline{\text{Toplam Antosiyanin Miktarı (mg/L)}} = (A \times MW \times DF \times 1000)/ (\varepsilon \times I) \quad (2.4)$$

A: Absorbans farkı

MW: Siyanidin-3-*O*-glikozit molekül ağırlığı (449.2 g/mol)

DF: Seyreltme faktörü

Ɛ: Molar soğurum katsayısı (26 900 L/cm mol)

I: Küvet katman kalınlığı & ışık yolu (1 cm)

BÖLÜM 3

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1 Fenolik Bileşik Ekstraksiyon Optimizasyonu ve İstatistiksel Analiz

Öncelikle, bağımsız değişkenler ve değer aralıkları yanıt yüzey yönteminin merkezi kompozit tasarımına girilerek çalışılacak deney koşulları belirlenmiştir. Tasarım sonucunda elde edilen deney koşullarına göre yapılan toplam fenolik madde analiz sonuçları, bağımlı değişken olarak gallik asit cinsinden mg GAE/g örnek olarak programa girilmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyon olmak üzere üç farklı tasarım yapılmıştır. Her yöntem için kullanılan deney koşulları ve elde edilen bağımlı değişken değerleri Çizelge 3.1, Çizelge 3.3 ile Çizelge 3.5'te verilmiştir. Bu sonuçlara göre klasik çözücü ekstraksiyonunda ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı 12.68-33.54 mg GAE/g aralığında, ultrases ekstraksiyonunda 17.31-37.78 mg GAE/g aralığında ve mikrodalga ekstraksiyonunda ise 10.88-62.72 mg GAE/g aralığında bulunmuştur.

3.1.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Klasik ekstraksiyon için kullanılan bağımsız değişkenler olan sıcaklık ve süre aralığı ile bağımlı değişken olarak kullanılan toplam fenolik madde değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Klasik ekstraksiyon, toplam fenolik madde miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Fenolik M. (mg GAE/g)
1	30	10	12.68
2	30	20	18.18
3	30	30	20.45
4	45	10	18.41
5	45	20	23.74
6	45	20	24.29
7	45	20	24.53
8	45	30	26.49
9	60	10	24.21
10	60	20	31.98
11	60	30	33.54

Elde edilen sonuçlara göre, klasik ekstraksiyon için toplam fenolik madde miktarı 12.68-33.54 mg GAE/g aralığında değişmektedir. Klasik ekstraksiyon için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen varyans analiz (ANOVA) sonuçları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Fenolik Madde)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	363.10	5	72.62	261.76	<0.0001
A-Sıcaklık	246.02	1	246.02	886.78	<0.0001
B-Süre	105.67	1	105.67	380.90	<0.0001
AB	0.61	1	0.61	2.19	0.1987
A^2	0.81	1	0.81	2.92	0.1483
B^2	10.80	1	10.80	38.93	0.0015
Kalıntı (Residual)	1.39	5	0.28		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	1.06	3	0.35	2.15	0.3329
Hata	0.33	2	0.16		
Düzeltilmiş Toplam	364.48	10			
R^2=0.9962			**R^2_{adj}**=0.9924		

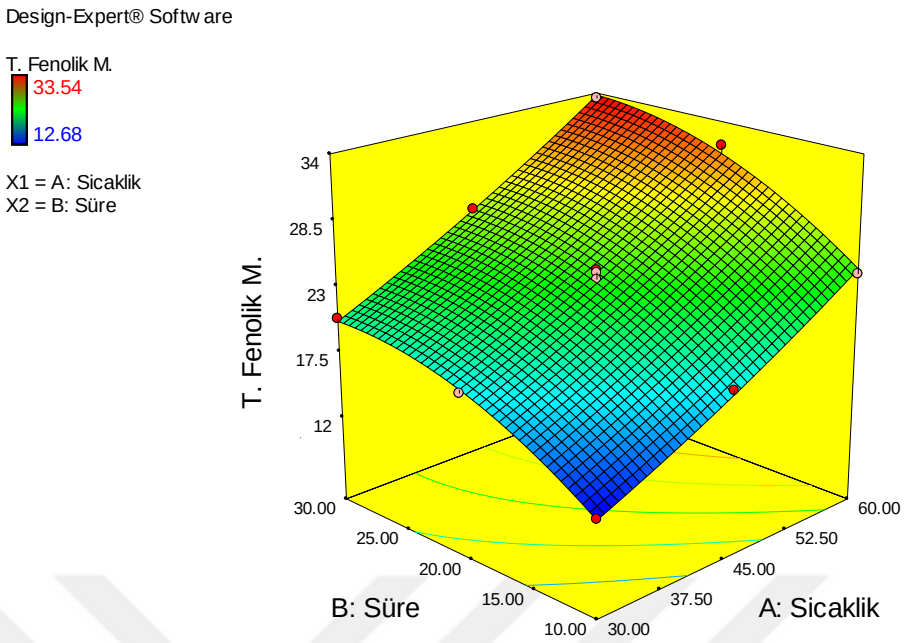
Sonuçların anlamlı olabilmesi için tasarlanan modelde p (olasılık) değerlerinin 0.05'in altında olması gerekir. Elde edilen olasılık değeri kuadratik modelin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p<0.0001$). Bağımsız değişkenler olan sıcaklık ve süreye ait p değerlerinin ikisinin de 0.0001'in altında olması iki parametrenin de istatistiksel olarak toplam fenolik madde ekstraksiyon verimini etkilediğini göstermektedir. Lack of Fit olarak adlandırılan uyum eksikliği, regresyonda içerilmeyen noktalarda deneysel verileri göstermek için modelin başarısını ölçer [121]. Klasik ekstraksiyon için 0.3329 olan uyum eksikliği 0.05'in üzerinde olduğundan anlamlı değildir diyebiliriz. Uyum eksikliğinin 0.05'in üzerinde bir değerde olması modelin başarılı olduğunun göstergesidir.

R^2 değerinin olabildiğince 1'e ve R^2 adj değerine yakın olması istenir. Tanımlanan modelde 0.9962 olan R^2 değeri toplam değişimin %99'unun bağımsız değişkenlere bağlanabileceğini gösterir [121].

Klasik ekstraksiyonda toplam fenolik madde analizleri sonucu elde edilen kodlanmış değerler cinsinden denklem katsayılarının (2.1)'e yerleştirilmesiyle (3.1) elde edilmiştir.

$$\text{T. Fenolik M.} = 24.32 + 6.4*A + 4.2*B + 0.39*A*B + 0.57*A^2 - 2.06*B^2 \quad (3.1)$$

Design Expert programında toplam fenolik madde konsantrasyonunun sıcaklık ve süreyle değişiminin interaksiyonlu 3 boyutlu grafiği klasik ekstraksiyon için Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Klasik ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi

Grafikten de anlaşıldığı gibi klasik ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarı sıcaklık ve süreyle artma eğilimi göstermektedir. Klasik ekstraksiyonda optimum nokta 60 °C ve 30 dk olarak elde edilmiştir. Bu noktada elde edilen maksimum toplam fenolik madde konsantrasyonu 33.8084 mg GAE/g'dır.

Prasad vd. [122] tarafından, suyun sıcaklığı arttıkça dielektrik sabiti azalmakta ve çözücü özelliğinde değişiklik meydana gelmesiyle fenolik maddeleri daha iyi ekstrakte edebildiği ifade edilmiştir.

Zuorro vd. [123], *Cynara scolimus* atıklarından ekstrakte ettikleri toplam fenolik madde miktarında çalışılan en uzun süreye kadar sürenin artmasıyla verimin de arttığını rapor etmişlerdir. Bu araştırma bizim çalışmamızı desteklemektedir.

3.1.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Ultrases destekli ekstraksiyonda bağımsız değişken olarak kullanılan sıcaklık ve süre aralığı ile bağımlı değişken olan toplam fenolik madde değerleri Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Ultrases destekli ekstraksiyon, toplam fenolik madde miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Fenolik M. (mg GAE/g)
1	30	10	17.31
2	30	20	23.58
3	30	30	27.98
4	45	10	24.29
5	45	20	31.27
6	45	20	32.37
7	45	20	30.88
8	45	30	33.39
9	60	10	33.23
10	60	20	34.57
11	60	30	37.78

Elde edilen verilere göre göre, ultrases ekstraksiyonu için toplam fenolik madde miktarı 17.31-37.78 mg GAE/g aralığında değişmektedir. Ultrases ekstraksiyonu için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA (varyans analizi) sonuçları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 Ultrases destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Fenolik Madde)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	341.67	5	68.33	45.01	0.0004
A-Sıcaklık	224.60	1	224.60	147.94	<0.0001
B-Süre	98.58	1	98.58	64.93	0.0005
AB	9.36	1	9.36	6.17	0.0556
A^2	2.68	1	2.68	1.76	0.2415
B^2	4.04	1	4.04	2.66	0.1637
Kalıntı (Residual)	7.59	5	1.52		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	6.40	3	2.13	3.57	0.2264
Hata	1.19	2	0.60		
Düzeltilmiş Toplam	349.26	10			
R^2=0.9783			**R^2_{adj}**=0.9565		

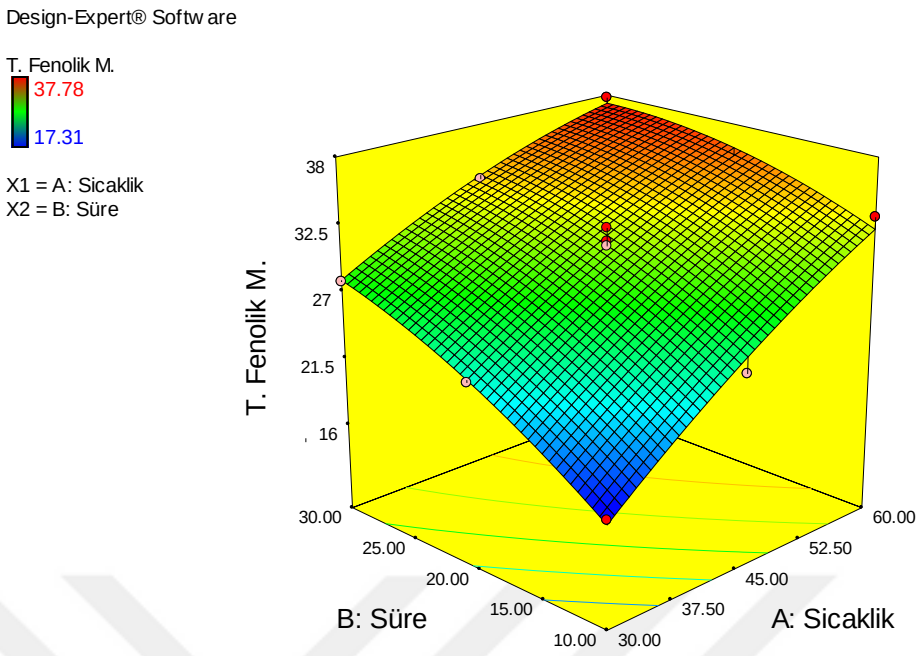
Analiz sonuçlarına göre kuadratik modelin p (olasılık) değeri 0.05'in altında olup 0.0004'tür. Bu yüzden yöntemimiz için tasarlanan modelin anlamlı olduğunu söyleyebiliriz. Bağımsız değişkenlerden sıcaklığın p değeri 0.0001 iken diğer bağımsız değişken olan sürenin p değeri 0.0005'tir. İki parametrenin de p değerinin 0.05'ten küçük olması istatistiksel olarak toplam fenolik madde ekstraksiyon verimini etkilediklerini göstermektedir. Fakat süre parametresinin p değeri sıcaklık parametresininkinden daha yüksek olduğu için verimde daha az etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Ultrases ekstraksiyonu için 0.2264 olan uyum eksikliği 0.05'in üzerinde olduğu için anlamlı değildir. Bu durum da modelin başarılı olduğunun göstergesidir. Korelasyon katsayısının (R^2) 0.9783 olması modelin deneysel veriler ile tutarlı olduğunu göstermektedir.

Ultrases ekstraksiyonunda yapılan analizler sonucunda elde edilen kodlanmış değerler cinsinden denklem katsayılarının (2.1)'e yerleştirilmesiyle (3.2) elde edilmiştir.

$$\text{T. Fenolik M.} = 30.95 + 6.12*A + 4.05*B - 1.53*A*B - 1.03*A^2 - 1.26*B^2 \quad (3.2)$$

Ultrases ekstraksiyonu için, Design Expert programından elde edilen toplam fenolik madde konsantrasyonunun sıcaklık ve süreyle değişiminin interaksiyonlu 3 boyutlu grafiği Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2 Ultrases destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi

Şekilden de anlaşıldığı gibi ultrases destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarı sıcaklık ve süreyle doğru orantı göstermektedir. Bu yöntemde, optimum nokta 60 °C ve 29.99 dk olarak elde edilmiştir. Bu noktada elde edilen maksimum toplam fenolik madde konsantrasyonu 37.2956 mg GAE/g'dır.

Ultrases destekli ekstraksiyon kullanılarak fenolik maddelerin eldesi gerçekleştirilen çalışmalarda genellikle, sürenin [124], [125], [126], [127] ve sıcaklığın [124], [127], [128] artması ile toplam fenolik madde miktarının da arttığı gözlenmiştir.

Tao vd. [59] yaptıkları çalışmada şarap tortusundan ultrases destekli ekstraksiyon kullanılarak elde edilen toplam fenolik madde ekstraklarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre ekstraksiyon süresi ve sıcaklığının verime etkili olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar fenoliklerin %90'ının 10 dakikalık ultrases uygulaması ile ekstrakte edip ekstraksiyon veriminin sıcaklık ile birlikte arttığını gözlemlemişlerdir. Fakat çok yüksek sıcaklıkların fenolik bileşikleri olumsuz etkileyeceğini de vurgulamışlardır. Tasarıma göre optimum koşul 60 °C ve 25 dk olup bu koşuldaki toplam fenolik madde miktarı 58.76 mg/g olarak saptanmıştır.

İçyer vd. yaptıkları çalışmada, sızma zeytinyağı atıklarından maksimum miktarda fenolik bileşik elde etmek amacıyla öncelikle ekstraksiyon koşullarının (çözücü konsantrasyonu ve ultrasonik koşullar) optimizasyonu için yanıt yüzey yöntemi ve karışım dizayndan oluşan kombine tasarım kullanılmıştır. Çeşitli su:metanol (0-1000 mL/L) karışımı farklı ultrasonik sıcaklık (30 - 60 °C), genlik (% 20 -100) ve süre (10 - 30 dk) koşullarında çözücü olarak kullanılmıştır. Fenolik verimi 1.6 – 45 mg/g aralığında değişim göstermiştir. Sonuçlara göre, genellikle zaman, sıcaklık ve genlik artışı ekstraksiyon verimini arttırmış fakat yükselmiş sıcaklık ve genlik seviyelerinde fenolikler degrade olmuştur. Optimum koşullar 499:511 mL/L su:metanol konsantrasyonu, 60 °C sıcaklık, % 13.71 değerinde genlik ve 21.05 dk süre olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar, kombine tasarımın düşük deneysel noktalara sahip birçok parametrenin optimizasyonu için gıda endüstrisinin birçok alanında kullanılma potansiyeline sahip olduğunu vurgulamıştır [129].

Sıtma ve diyabet tedavisi için geleneksel bir ilaç olarak kullanılan *Helicteres hirsuta* bitkisinden maksimum biyoaktif bileşen ve antioksidan kapasite ekstraksiyonu için ultrases destekli ekstraksiyonu kullanılmıştır. Beş farklı parametrenin (sıcaklık, süre, güç, metanol konsantrasyonu ve örnek:çözücü oranı) optimizasyonu için yanıt yüzey yöntemi tercih edilmiştir. Optimize edilmiş koşullarda (60 °C sıcaklık, 25 dk süre, 150 W güç ve 3:100 g/mL örnek:çözücü oranı), 15.97 mg GAE/g miktarında fenolik bileşik, 16.42 mg CE/g miktarında flavonoid elde edilmiştir. Antioksidan kapasite için DPPH, CUPRAC ve FRAP yöntemleri kullanılmış olup en yüksek değer %88 oranıyla CUPRAC'ta elde edilmiştir. Sonuçlara göre, ekstraksiyon sıcaklığı, süre ve etanol konsantrasyonu ultrasonik yöntem ile biyoaktif bileşen ve antioksidan kapasite eldesinde önemli bir etkiye sahip oldukları rapor edilmiştir [130]. Bu araştırmalar göz önüne alındığında yaptığımız çalışmanın literatür tarafından desteklendiğini söyleyebiliriz.

3.1.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda bağımsız değişken olan mikrodalga gücü ve sürenin tasarımda kullanılan aralığı ile bağımlı değişken toplam fenolik madde değerleri Çizelge 3.5' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Mikrodalga destekli ekstraksiyon, toplam fenolik madde miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Güç (W)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Fenolik M. (mg GAE/g)
1	300	1	10.88
2	300	2	29.62
3	300	3	42.18
4	450	1	22.25
5	450	2	40.45
6	450	2	42.96
7	450	2	40.21
8	450	3	57.15
9	600	1	29.07
10	600	2	49.46
11	600	3	62.72

Sonuçlara göre, mikrodalga ekstraksiyonu için toplam fenolik madde miktarı 10.88-62.72 mg GAE/g aralığında değişiklik göstermektedir. Mikrodalga ekstraksiyonu için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA (varyans analizi) sonuçları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6 Mikrodalga destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Fenolik Madde)

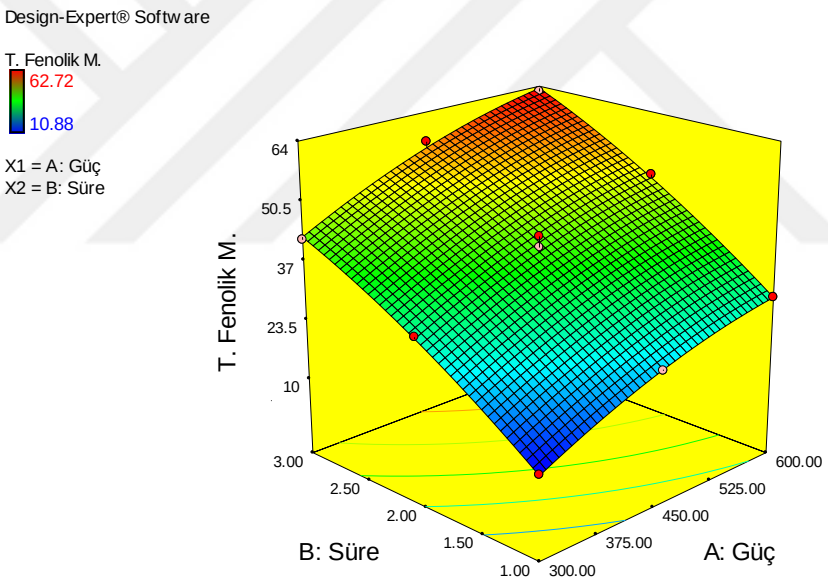
Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	2279.57	5	455.91	259.94	<0.0001
A-Güç	571.74	1	571.74	325.98	<0.0001
B-Süre	1661.67	1	1661.67	947.42	<0.0001
AB	1.38	1	1.38	0.79	0.4156
A^2	17.46	1	17.46	9.95	0.0252
B^2	15.39	1	15.39	8.78	0.0314
Kalıntı (Residual)	8.77	5	1.75		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	4.13	3	1.38	0.59	0.6769
Hata	4.64	2	2.32		
Düzeltilmiş Toplam	2288.34	10			
R^2=0.9962			**R^2_{adj}**=0.9923		

Varyans analiz sonuçlarına göre, toplam fenolik madde miktarı için kuadratik modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0.0001$). Mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde konsantrasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip oldukları gözlenmiştir ($p<0.0001$). Mikrodalga ekstraksiyonu için 0.6769 olan uyum eksikliği modelin başarılı olduğunu ifade etmektedir ($p>0.05$).

Mikrodalga ekstraksiyonunda yapılan analizler sonucunda elde edilen kodlanmış değerler cinsinden denklem katsayılarının (2.1)'e yerleştirilmesiyle (3.3) elde edilmiştir.

$$\text{T. Fenolik M.} = 41.59 + 9.76*A + 16.64*B + 0.59*A*B - 2.63*A^2 - 2.47*B^2 \quad (3.3)$$

Mikrodalga ekstraksiyonu için, Design Expert programından elde edilen toplam fenolik madde konsantrasyonunun mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresiyle değişiminin 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği Şekil 3.3' te verilmiştir.



Şekil 3.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarının mikrodalga gücü ve süreyle değişimi

3 boyutlu yanıt yüzey grafiğinde de görüldüğü gibi mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde miktarı mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresiyle doğru orantı göstermektedir. Bu yöntem için optimum koşullar 591.83 W ve 2.98 dk olarak gözlenmiştir. Bu noktada elde edilen maksimum toplam fenolik madde konsantrasyonu 62.9865 mg GAE/g'dır.

Hayat vd. [131], mikrodalga gücünün artması ani sıcaklık artışına buna bağlı olarak da hücre içi basıncın artmasına neden olacağını ve basınç nedeniyle hücre yüzeyinin parçalanması sonucunda çözücü ile hücre arasındaki madde geçişlerinin hızlanacağını bununla beraber ekstraksiyon verimin artacağını ifade etmişlerdir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile pirinç tanesinden fenolik bileşiklerin eldesi denenen çalışmada mikrodalga gücü ve sürenin ekstraksiyon verimi üzerine etkili olduğu tespit edilmiş ve 1000 W mikrodalga gücü ile 20 dakika ekstraksiyon süresi optimum ekstraksiyon koşulları olarak belirlenmiştir [60].

Benzer şekilde Bhuyan vd. [132] yaptıkları çalışmada, mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin artması fenolik madde ekstraksiyon verimini arttırdığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, endamlı okaliptüs veya sıtma ağacı olarak bilinen *Eucalyptus robusta* yapraklarından yanıt yüzey yöntemi ile toplam fenolik madde optimizasyonu gerçekleştirmişlerdir. 600 W mikrodalga gücü, 3 dk ekstraksiyon süresi ve 2 g/100 mL katı:çözücü oranı optimum koşul olarak saptanmış olup bu koşulda toplam fenolik madde miktarı 58.40 ± 1.03 mg GAE/g olarak elde edilmiştir .

3.2 Antioksidan Madde Ekstraksiyon Optimizasyonu ve İstatistiksel Analiz

3.2.1 Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi

Yanıt yüzey yönteminin merkezi kompozit tasarımına göre elde edilen deney koşullarına göre yapılan antioksidan kapasite için kullanılan CUPRAC yönteminin analiz sonuçları, bağımlı değişken olarak mg TAEC/g örnek cinsinden programa girilmiştir. Klasik, ultrases ve mikrodalga ekstraksiyonu olmak üzere üç farklı tasarım yapılmış olup her yöntem için kullanılan deney koşulları ve elde edilen bağımlı değişken değerleri Çizelge 3.7, Çizelge 3.9 ile Çizelge 3.11'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre ekstraktlardaki CUPRAC yöntemi ile elde edilen antioksidan kapasite klasik çözücü ekstraksiyonunda 75.69-160.34 mg TEAC/g aralığında, ultrases destekli ekstraksiyonda 83.73-179.89 mg TEAC/g aralığında ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda ise 38.04-212.03 mg TEAC/g aralığında bulunmuştur.

3.2.1.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Bu yöntem için bağımsız değişken olarak kullanılan sıcaklık ve süre aralığı ile bağımlı değişken olarak tercih edilen antioksidan kapasite (CUPRAC) değerleri Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7 Klasik ekstraksiyon, antioksidan kapasite deneysel sonuçları (CUPRAC)

Örnek No	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap CUPRAC (mg TEAC/g)
1	30	10	75.69
2	30	20	99.36
3	30	30	119.39
4	45	10	92.46
5	45	20	123.26
6	45	20	125.89
7	45	20	126.85
8	45	30	142.35
9	60	10	117.34
10	60	20	139.86
11	60	30	160.34

Elde edilen sonuçlara göre, klasik ekstraksiyon için CUPRAC yöntemi ile antioksidan kapasite 75.69-160.34 mg TEAC/g aralığında değişmektedir. Klasik ekstraksiyon için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA sonuçları Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları (CUPRAC)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	5719.95	5	1143.99	118.84	<0.0001
A-Sıcaklık	2525.60	1	2525.60	262.36	<0.0001
B-Süre	3109.47	1	3109.47	323.01	<0.0001
AB	0.12	1	0.12	0.013	0.9146
A^2	13.38	1	13.38	1.39	0.2915
B^2	51.37	1	51.37	5.34	0.0689
Kalıntı (Residual)	48.13	5	9.63		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	41.22	3	13.74	3.98	0.2074

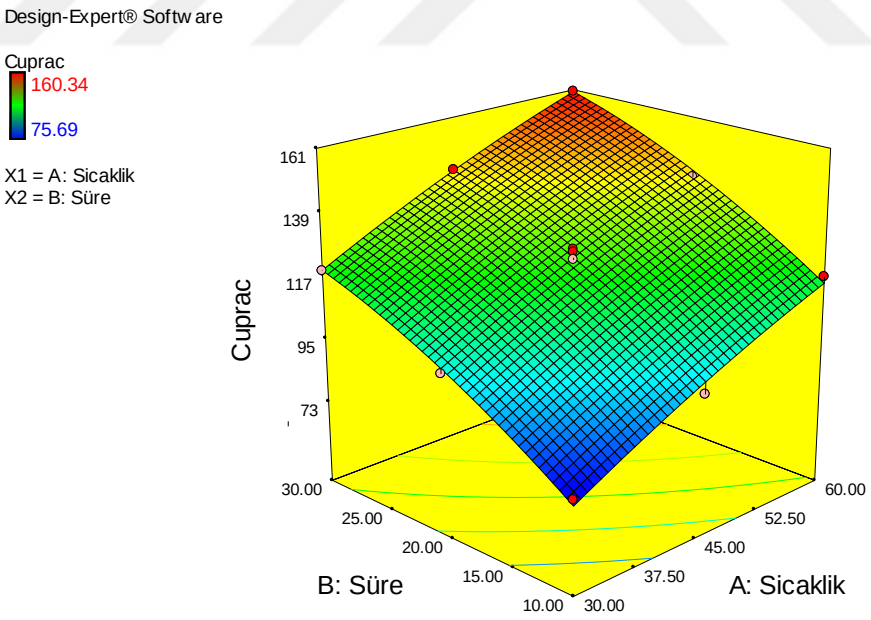
Hata	6.91	2	3.45		
Düzeltilmiş Toplam	5768.08	10			
R^2=0.9917			**R^2_{adj}=0.9833**		

ANOVA sonuçlarına göre kuadratik model anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$). Bağımsız değişken olarak kullanılan sıcaklık ve sürenin, istatistiksel olarak antioksidan kapasite ekstraksiyon verimini olumlu etkilediği tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Uyum eksikliğinin olasılık değeri 0.2074 olup modelimizin başarılı olduğunu ifade etmektedir ($p>0.05$).

Tasarlanan modelde regrasyon katsayısı (R^2) 0.9917 olarak elde edilmiştir. Analizleri sonucu elde edilen (3.4) eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\text{Antioksidan Kapasite (CUPRAC)} = 123.96 + 20.52*A + 22.76*B - 0.17*A*B - 2.30*A^2 - 4.50*B^2 \quad (3.4)$$

Design Expert programında antioksidan kapasite (CUPRAC) sonuçlarının sıcaklık ve süreyle değişiminin 3 boyutlu grafiği klasik ekstraksiyon için Şekil 3.4' te gösterilmiştir.



Şekil 3.4 Klasik ekstraksiyonda antioksidan kapasitenin (CUPRAC) sıcaklık ve süreyle değişimi

Şekilde de görüldüğü gibi CUPRAC metodu ile elde edilen antioksidan kapasite sıcaklık ve süreyle artma eğilimi göstermektedir. 60 °C sıcaklık ve 30 dk süreye sahip optimum noktadaki maksimum antioksidan kapasite 160.269 mg TEAC/g örnek olarak bulunmuştur.

3.2.1.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Ultrases destekli ekstraksiyonda bağımsız değişken olarak kullanılan sıcaklık ve süre aralığı ile bağımlı değişken olan CUPRAC yöntemi ile elde edilen antioksidan kapasite sonuçları Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9 Ultrases destekli ekstraksiyon, antioksidan kapasite deneysel sonuçları (CUPRAC)

Örnek No	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap CUPRAC (mg TEAC/g)
1	30	10	83.73
2	30	20	101.69
3	30	30	123.13
4	45	10	111.23
5	45	20	130.89
6	45	20	139.45
7	45	20	136.74
8	45	30	158.76
9	60	10	137.05
10	60	20	157.39
11	60	30	179.89

Yukarıdaki verilere göre, ultrases ekstraksiyonu için antioksidan kapasite (CUPRAC) 83.73-179.89 mg TEAC/g aralığında değişmektedir. Ultrases ekstraksiyonu için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen varyans analiz sonuçları Çizelge 3.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10 Ultrases destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (CUPRAC)

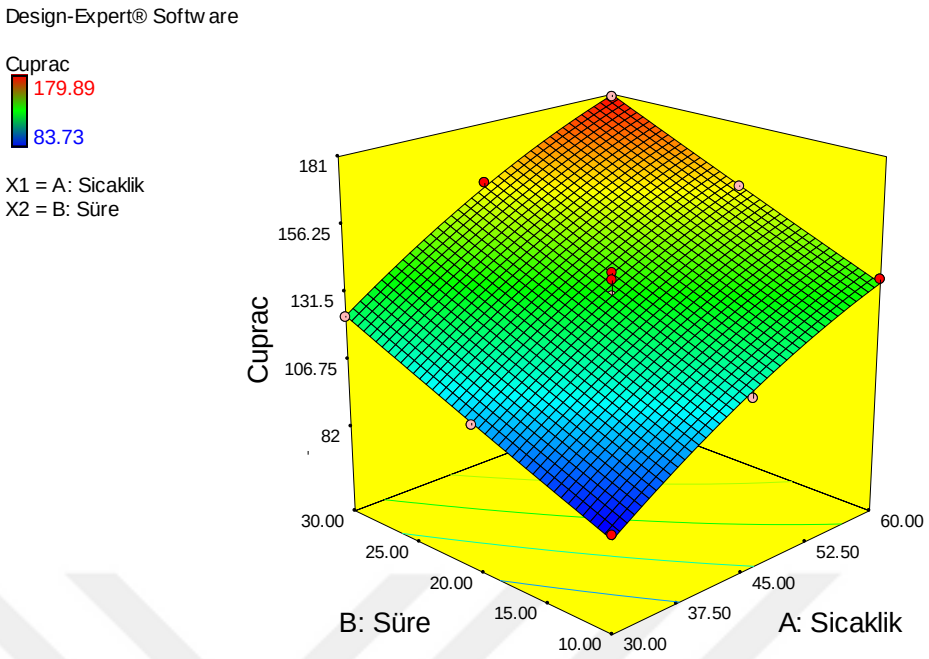
Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	7456.99	5	1491.40	135.76	<0.0001
A-Sıcaklık	4580.50	1	4580.50	416.95	<0.0001
B-Süre	2806.71	1	2806.71	255.49	<0.0001
AB	2.96	1	2.96	0.27	0.6259
A^2	64.44	1	64.44	5.87	0.0600
B^2	0.43	1	0.43	0.039	0.8512
Kalıntı (Residual)	54.93	5	10.99		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	16.65	3	5.55	0.29	0.8331
Hata	38.28	2	19.14		
Düzeltilmiş Toplam	7511.92	10			
R^2=0.9927			**R^2_{adj}**=0.9854		

Tasarlanan modelin p (olasılık) değerinin 0.05'ten küçük olması modelin anlamlı olduğunun göstergesidir. Bağımsız değişken olarak kullanılan sıcaklık ve sürenin istatistiksel olarak antioksidan kapasite ekstraksiyon verimini etkilediklerini söyleyebiliriz ($p<0.0001$). Kullanılan ultrases yöntemi için 0.8331 olan uyum eksikliği 0.05'in üzerinde olduğundan anlamlı olmayıp modelin başarılı olduğunun göstergesidir. Korelasyon katsayısının (R^2) 0.9927 olması modelin deneysel veriler ile tutarlı olduğunu göstermektedir.

Ultrases destekli ekstraksiyon kullanılarak elde edilen ekstraktlara yapılan analizler sonucunda elde edilen kodlanmış değerler cinsinden denklem katsayılarının (2.1)'e yerleştirilmesiyle (3.5) elde edilmiştir.

$$\text{Antioksidan kapasite(CUPRAC)} = 135.25 + 27.63*A + 21.63*B + 0.86*A*B - 5.04*A^2 + 0.41*B^2 \quad (3.5)$$

Ultrases ekstraksiyonu için, antioksidan kapasitenin sıcaklık ve süreyle değişiminin 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5 Ultrases destekli ekstraksiyonunda antioksidan kapasitenin (CUPRAC) sıcaklık ve süreyle değişimi

Ultrases destekli ekstraksiyonda CUPRAC yöntemi ile elde edilen optimum noktadaki maksimum antioksidan kapasite 180.712 mg TEAC/g örnek olup sıcaklık ve süre artışı ile doğru orantı göstermektedir.

Elde ettiğimiz bu durum literatürdeki çalışmalar ile uyumludur. Ghafoor vd. [125] tarafından gerçekleştirilen, Campbell Early üzüm çekirdeğinde fenolik bileşik, antosiyanin ve antioksidanların maksimum ekstraksiyon verimi için ultrases destekli ekstraskiyon yönteminin kullanıldığı çalışma örnek verilebilir. Çalışmada, sıcaklık, etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon süresi yanıt yüzey yöntemi (RSM) ve merkezi kompozit tasarımı kullanılarak optimize edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar; maksimum toplam fenolik madde (5.44 mg GAE/100 mL) için % 53.15 etanol, 56.03 °C sıcaklık, 29.03 dakika süre; maksimum antioksidan aktivite (12.31 mg/mL) için % 53.06 etanol, 60.65 °C sıcaklık ve 30.58 dakika; maksimum toplam antosiyanin (2.28 mg/mL) için % 52.35 etanol, 55.13 °C sıcaklık, 29.49 dakika olarak saptanmıştır. Bu koşullardaki elde edilen verilerin tahmin edilen değerlere uygun olduğu gözlenmiştir. Ultrases destekli ekstraksiyon ile elde edilen biyoaktif ve antioksidan bileşenlerin ekstraksiyon verimi, süre ve sıcaklık parametrelerden yüksek oranda etkilendiği rapor edilmiştir.

Başka bir çalışmada, Piperaceace familyasına ait *Piper betle* (Betel biberi) 'den doğal antioksidan ekstraksiyonu için ultrases destekli ekstraskiyon yöntemi, optimizasyon için yanıt yüzey yöntemi ve Box-Behnken tasarımı tercih edilmiştir. Sıcaklık (50-70 °C), etanol konsantrasyonu (% 70-90) ve çözünen:çözücü oranı (1:10-1:30 g/mL) parametrelerinin toplam fenolik ve antioksidan kapasite ekstraksiyon verimleri üzerine etkisi incelenmiştir. Optimize edilmiş koşullar, % 78.74 etanol konsantrasyonu, 1:21.85 g/mL çözünen:çözücü oranı ve 51.60 °C sıcaklık olarak tespit edilmiştir. Bu noktadaki toplam fenolik miktarı 311.21 mg GAE/g kuru madde ve % 97.57 antioksidan kapasite ile % 13.88 oranında ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Ayrıca, ultrases kullanılarak elde edilen fenolik antioksidanlar ile birlikte taninler, saponinler ve flavonoidler dahil olmak üzere sekonder metabolitlerin ekstraksiyonunun klasik yöntemlerden biri olan maserasyondan yüksek oranda daha verimli olduğu vurgulanmıştır [133].

3.2.1.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Bu yöntemde bağımsız değişken olarak kullanılan mikrodalga gücü ve sürenin tasarımda kullanılan aralığı ile bağımlı değişken olan antioksidan kapasite değerleri Çizelge 3.11' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.11 Mikrodalga destekli ekstraksiyon, antioksidan kapasite deneysel sonuçları (CUPRAC)

Örnek No	Faktör 1 A:Güç (W)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap CUPRAC (mg TEAC/g)
1	300	1	38.04
2	300	2	75.83
3	300	3	124.89
4	450	1	81.12
5	450	2	143.50
6	450	2	139.70
7	450	2	130.53
8	450	3	186.51
9	600	1	97.85
10	600	2	170.15
11	600	3	212.03

Sonuçlara göre, mikrodalga destekli ekstraksiyon için CUPRAC ile elde edilen antioksidan kapasite 38.04-212.03 mg TEAC/g örnek aralığında değişiklik

göstermektedir. Mikrodalga ekstraksiyonu için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA (varyans analizi) sonuçları Çizelge 3.12'de verilmiştir.

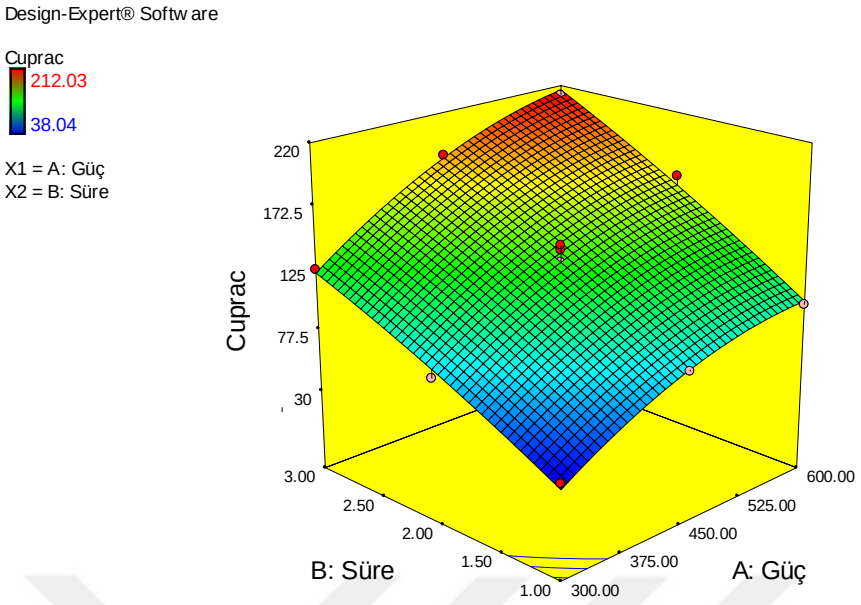
Çizelge 3.12 Mikrodalga destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (CUPRAC)

Kaynak	**Kareler Toplamı**	**Serbestlik Derecesi (DF)**	**Ortalamanın Karesi**	**F Değeri**	**Olasılık/Probabilite (P) > F**
Model	26327.98	5	5265.60	108.80	<0.0001
A-Güç	9701.87	1	9701.87	200.47	<0.0001
B-Süre	15648.87	1	15648.87	323.35	<0.0001
AB	186.73	1	186.73	3.86	0.1067
A^2	591.83	1	591.83	12.23	0.0173
B^2	50.38	1	50.38	1.04	0.3544
Kalıntı (Residual)	241.98	5	48.40		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	153.06	3	51.02	1.15	0.4969
Hata	88.92	2	44.46		
Düzeltilmiş Toplam	26569.96	10			
R^2=0.9909			**R^2_{adj}**=0.9818		

Varyans analiz sonuçlarına göre kuadratik modelin istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenmiştir ($p<0.0001$). Mikrodalga gücü ve süre parametrelerinin antioksidan kapasite üzerinde önemli derecede etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir ($p<0.0001$). Mikrodalga ekstraksiyonu için 0.4969 olan uyum eksikliği modelimizin başarılı olduğunu ifade etmektedir ($p>0.05$). Bu yöntemde kodlanmış değerler cinsinden elde edilen (3.6) eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\text{Antioksidan kapasite(CUPRAC)} = 138.06 + 40.21*A + 51.07*B + 6.83*A*B - 15.28*A^2 - 4.46*B^2 \quad (3.6)$$

Mikrodalga ekstraksiyonda, antioksidan kapasite üzerine mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin etkisini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği Şekil 3.6'da verilmiştir.



Şekil 3.6 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda antioksidan kapasitenin (CUPRAC) mikrodalga gücü ve süreyle değişimi

Yanıt yüzey grafiğinden de anlaşıldığı gibi mikrodalga destekli ekstraksiyonda antioksidan kapasite mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin artması ile artış göstermektedir. Bu yöntemde, 591.83 W mikrodalga gücüne ve 2.98 dk süreye sahip optimum noktadaki maksimum antioksidan kapasite 214.618 mg TEAC/g örnek olarak elde edilmiştir.

Tez kapsamında elde ettiğimiz bulgulara göre, mikrodalga destekli yöntemde elde edilen antioksidan kapasite diğer iki yönteme göre daha fazladır. Bu durum Alara vd. [134] tarafından yapılan çalışmayla desteklenmektedir. Bahsedilen çalışmada, *Vernonia amygdalina* yapraklarının ekstraksiyonu için mikrodalga destekli ekstraksiyon, optimizasyon için ise yanıt yüzey yönteminin merkezi kompozit tasarımı tercih edilmiştir. Bağımsız değişken olarak ekstraksiyon süresi (5-15 dk), mikrodalga gücü (400-600 W), sıcaklık (90-110 °C) ve katı:çözücü oranı (0.08-0.13 g/mL), bağımlı değişken olarak ise toplam flavonoid miktarı ve antioksidan kapasite (DPPH ve ABTS) kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, toplam flavonoid miktarının ve antioksidan kapasitenin mikrodalga gücü, süre ve katı:çözücü oranından önemli derecede etkilendiklerini gözlemlemişlerdir. Optimum ekstraksiyon noktası 416 W mikrodalga gücü, 7 dk ekstraksiyon süresi, 100° C sıcaklık ve 0.10 g/mL katı:çözücü oranı olarak

saptanmıştır. Bu noktadaki maksimum geri kazanım toplam flavonoid için 87.05 ± 1.03 mg QE/g (n=3) iken antioksidan kapasite DPPH yönteminde % 94.05 ± 1.03 (n=3) ve ABTS yönteminde % 95.93 ± 0.99 (n=3) olarak bulunmuştur. Ayrıca, mikrodalga yöntemiyle elde edilen optimize edilmiş ekstraktlar, geleneksel yöntemlerden biri olan soxhlet yönteminde elde edilenler ile karşılaştırılmıştır. Mikrodalga yönteminin kullanıldığı örneklerde daha fazla antioksidan kapasite miktarının elde edildiği rapor edilmiştir. Araştırmacılar, elde edilen modellerin farmakolojik ve gıda endüstrilerindeki geniş çaplı antioksidan üretiminde uygulanabileceğini ifade etmişlerdir.

3.3 Flavonoidlerin Ekstraksiyon Optimizasyonu ve İstatistiksel Analiz

Tasarım sonucunda elde edilen deney koşullarına göre yapılan toplam flavonoid madde miktarı sonuçları, bağımlı değişken olarak mg/g örnek cinsinden programa girilmiştir. Üç farklı yöntem için de tasarım yapılmış olup kullanılan deney koşulları ve elde edilen bağımlı değişken değerleri Çizelge 3.13, Çizelge 3.15 ile Çizelge 3.17'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre klasik çözücü ekstraksiyonunda ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarı 4.65-11.89 mg CAE/g aralığında, ultrases ekstraksiyonunda 5.38-13.96 mg CAE/g aralığında ve mikrodalga ekstraksiyonunda ise 1.77-21.35 mg CAE/g aralığında bulunmuştur.

3.3.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Klasik ekstraksiyon için kullanılan bağımsız değişken olan sıcaklık ve süre aralığı ile bağımlı değişken olarak tercih edilen toplam flavonoid madde değerleri Çizelge 3.13' te verilmiştir.

Çizelge 3.13 Klasik ekstraksiyon, toplam flavonoid miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Flavonoid M. (mg CAE/g)
1	30	10	4.65
2	30	20	5.98
3	30	30	7.62
4	45	10	6.35
5	45	20	7.62
6	45	20	7.19
7	45	20	7.93
8	45	30	9.49
9	60	10	8.55
10	60	20	9.94
11	60	30	11.89

Elde edilen sonuçlara göre, klasik ekstraksiyon için toplam flavonoid madde miktarı 4.65-11.89 mg CAE/g örnek aralığında değişmektedir. Klasik ekstraksiyon için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA sonuçları Çizelge 3.14' te verilmiştir.

Çizelge 3.14 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Flavonoid Miktarı)

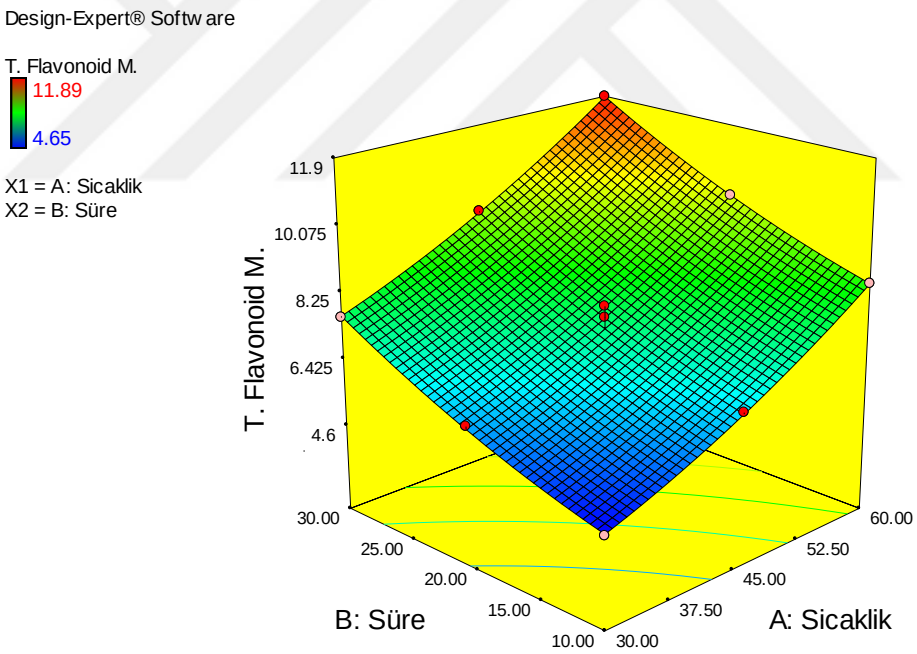
Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	40.05	5	8.01	137.63	<0.0001
A-Sıcaklık	24.52	1	24.52	421.41	<0.0001
B-Süre	14.88	1	14.88	255.77	<0.0001
AB	0.034	1	0.034	0.59	0.4778
A^2	0.25	1	0.25	4.33	0.0918
B^2	0.19	1	0.19	3.30	0.1288
Kalıntı (Residual)	0.29	5	0.058		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	0.015	3	0.32	0.036	0.9886
Hata	0.28	2	0.14		
Düzeltilmiş Toplam	40.34	10			
R^2=0.9928			**R^2_{adj}**=0.9856		

Model için elde edilen p (olasılık) değeri kuadratik modelin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p<0.0001$). Bağımsız değişkenler olan sıcaklık ve sürenin istatistiksel olarak toplam flavonoid madde ekstraksiyon verimini etkilediği gözlenmiştir ($p<0.0001$). Klasik ekstraksiyon için 0.9886 olan uyum eksikliği 0.05'in üzerinde olduğundan anlamlı değildir diyebiliriz. Bu da bizim modelimizin başarılı olduğunun göstergesidir.

Korelasyon katsayısının (R^2) 0.9928 olması modelimizin deneysel veriler ile tutarlı olduğunun göstergesidir. Toplam flavonoid madde analizleri sonucu elde edilen (3.7) eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\text{T. Flavonoid M.} = 7.61 + 2.02*A + 1.58*B + 0.092*A*B + 0.32*A^2 + 0.28*B^2 \quad (3.7)$$

Toplam flavonoid madde konsantrasyonunun sıcaklık ve süreyle değişiminin 3 boyutlu grafiği klasik ekstraksiyon için Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7 Klasik ekstraksiyonda toplam flavonoid miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi

Grafikte de görüldüğü gibi klasik ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı sıcaklık ve süreyle artma eğilimi göstermektedir. Klasik ekstraksiyon yönteminde, optimum noktada elde edilen maksimum toplam flavonoid madde konsantrasyonu 11.886 mg CAE/g örnek' tir.

3.3.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Ultrases destekli ekstraksiyonda bağımsız değişken olarak kullanılan sıcaklık ve süre aralığı ile bağımlı değişken olan toplam flavonoid madde değerleri Çizelge 3.15' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.15 Ultrases destekli ekstraksiyon, toplam flavonoid miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Flavonoid M. (mg CAE/g)
1	30	10	5.38
2	30	20	6.83
3	30	30	9.50
4	45	10	7.14
5	45	20	8.90
6	45	20	8.86
7	45	20	9.08
8	45	30	12.05
9	60	10	7.62
10	60	20	10.40
11	60	30	13.96

Elde edilen verilere göre göre, ultrases ekstraksiyonu için toplam flavonoid madde miktarı 5.38-13.96 mg CAE/g örnek aralığında değişmektedir. Ultrases ekstraksiyonu için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA (varyans analizi) sonuçları Çizelge 3.16' da verilmiştir.

Çizelge 3.16 Ultrases destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Flavonoid Miktarı)

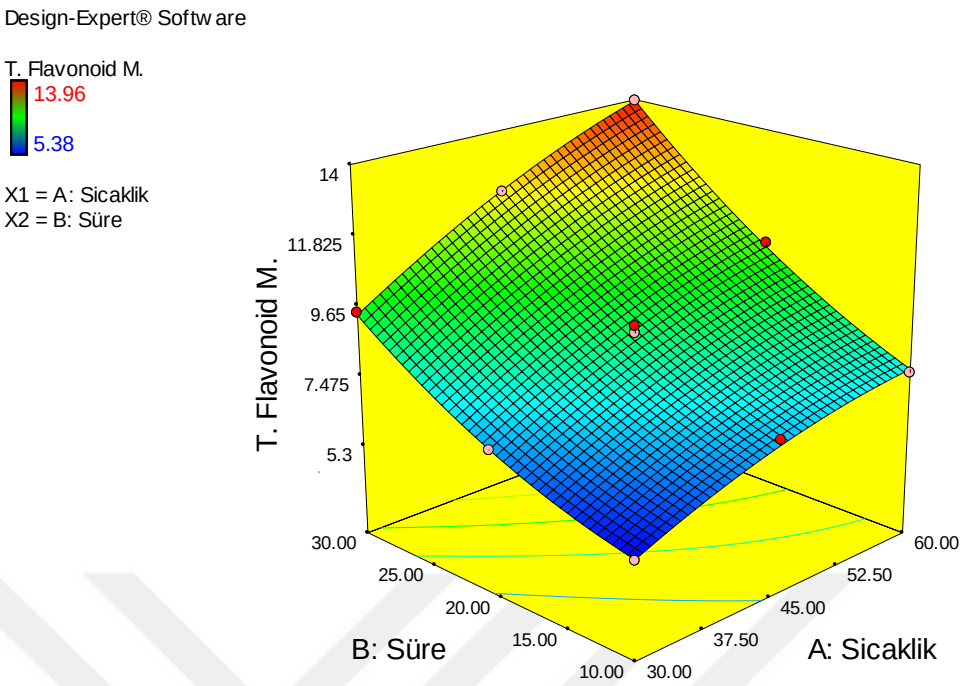
Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	59.19	5	11.84	645.95	<0.0001
A-Sıcaklık	17.58	1	17.58	959.23	<0.0001
B-Süre	39.37	1	39.37	2148.47	<0.0001
AB	1.23	1	1.23	67.23	0.0004
A^2	0.43	1	0.43	23.21	0.0048
B^2	0.82	1	0.82	44.95	0.0011
Kalıntı (Residual)	0.092	5	0.018		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	0.064	3	0.021	1.56	0.4140
Hata	0.027	2	0.014		
Düzeltilmiş Toplam	59.28	10			
R^2=0.9985			**R^2_{adj}**=0.9969		

ANOVA sonuçlarına göre, toplam flavonoid miktarı için elde edilen modelin önemli olduğu görülmektedir ($p<0.0001$). Ultrases destekli ekstraksiyon ile ekstrakte edilen flavonoid madde miktarı üzerine, sıcaklık ve süre parametrelerinin etkili olduğu saptanmıştır ($p<0.0001$). Ultrasonik ekstraksiyon için 0.4140 olan uyum eksikliği 0.05'in üzerinde olduğundan anlamlı değildir diyebiliriz. Bu da bizim modelimizi desteklemektedir.

Modelimizin deneysel veriler ile tutarlı olduğu korelasyon katsayısının (R^2) 0.9985 olmasından anlaşılmaktadır. Ultrasesin uygulandığı yöntemde, toplam flavonoid miktarı analizleri sonucu elde edilen (3.8) eşitliği aşağıda gösterilmiştir.

$$\text{T. Flavonoid M.} = 8.98 + 1.71*A + 2.56*B + 0.56*A*B - 0.41*A^2 + 0.57*B^2 \quad (3.8)$$

Toplam flavonoid madde konsantrasyonunun sıcaklık ve süreyle değişiminin 3 boyutlu grafiği ultrasonik ekstraksiyon için Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8 Ultrases destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi

Şekilde de görüldüğü gibi ultrases destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı sıcaklık ve sürenin artması ile artma eğilimi göstermektedir. Optimum nokta değerleri 60 °C ve 29.99 dk olarak elde edilmiştir. Bu noktada elde edilen maksimum toplam flavonoid madde konsantrasyonu 13.9625 mg CAE/g örnek' tir.

Portakal kabuğu [135], üzüm atığı [136], [137] gibi gıda endüstrisi yan ürünleri ve diğer ürünlerden *Spatholobus suberectus* [138], ham propolis [139], *Folium eucommiae* [140], *Prunella vulgaris* [141] de dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan flavonoid ekstraksiyonu için ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu durum, ultrasonik uygulamanın biyoaktif ekstraktların istenen özelliklerini koruması sonucunda yüksek kalitede ekstrakt üretilmesini sağlaması, ekstraksiyon süresini azaltması ve termolabil flavonoidlerin yok olmasını önlemesi gibi nedenlere bağlanmıştır [88].

Potansiyel olarak sağlığa yaralı flavonoid bileşikler açısından zengin olan Alıç tohumundan (Hawthorn seed) flavonoid bileşiklerin ultrases destekli ekstraskiyonunun gerçekleştirildiği çalışmada, önemli değişkenler ve seviyeleri Plackett – Burman (PB) tasarımı ve Box – Behnken (BB) tasarımı kullanılarak elde edilmiştir. Yanıt yüzey

yöntemi ile elde edilen parametlerin optimum düzeyleri 65 °C sıcaklık, 37 dk süre 1:18 katı:sıvı oranı ve % 72 etanol konsantrasyonu olarak elde edilmiştir. Bu noktadaki elde edilen flavonoid bileşik miktarı % 91.7 verim ile 16.45 ± 0.02 mg/g'dır ($p<0.05$). Araştırmacılar, sonuçların ultrases destekli ekstraksiyon alıç tohumlarından flavonoid eldesi için etkili, güvenilir ve uygulanabilir bir yöntem olduğunu ve ayrıca su banyosu ekstraksiyon tekniğinden daha iyi sonuçlar verdiğini vurgulamışlardır [142].

3.3.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda bağımsız değişken olan mikrodalga gücü ve sürenin tasarımda kullanılan aralığı ile bağımlı değişken toplam flavonoid madde değerleri Çizelge 3.17'de verilmiştir.

Çizelge 3.17 Mikrodalga destekli ekstraksiyon, toplam flavonoid miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Güç (W)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Flavonoid M. (mg CAE/g)
1	300	1	1.77
2	300	2	5.19
3	300	3	10.77
4	450	1	2.71
5	450	2	9.75
6	450	2	10.89
7	450	2	11.20
8	450	3	16.68
9	600	1	6.19
10	600	2	16.41
11	600	3	21.35

Sonuçlara göre, mikrodalga ekstraksiyonu için toplam flavonoid madde miktarı 1.77-21.35 mg CAE/g örnek aralığında değişiklik göstermektedir. Mikrodalga ekstraksiyonu için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA sonuçları Çizelge 3.18'de verilmiştir.

Çizelge 3.18 Mikrodalga destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Flavonoid Miktarı)

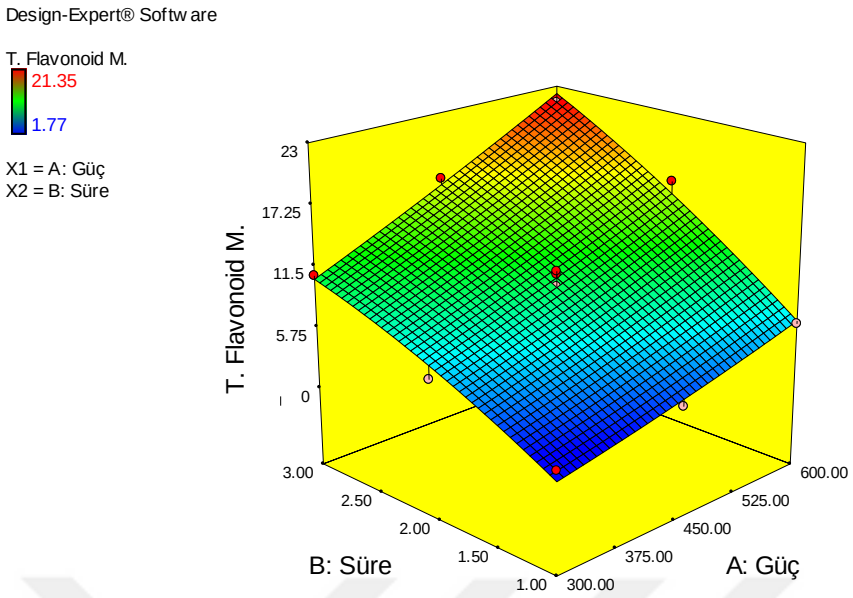
Kaynak	**Kareler Toplamı**	**Serbestlik Derecesi (DF)**	**Ortalamanın Karesi**	**F Değeri**	**Olasılık/Probabilite (P) > F**
Model	368.20	5	73.64	52.74	0.0003
A-Güç	114.58	1	114.58	82.06	0.0003
B-Süre	242.32	1	242.32	173.54	<0.0001
AB	9.49	1	9.49	6.79	0.0479
A^2	0.17	1	0.17	0.12	0.7410
B^2	1.81		1.81	1.30	0.3064
Kalıntı (Residual)	6.98	5	1.40		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	5.82	3	1.94	3.32	0.2398
Hata	1.17	2	0.58		
Düzeltilmiş Toplam	375.18	10			
R^2=0.9814			**R^2_{adj}**=0.9628		

Model için elde edilen p (olasılık) değeri kuadratik modelin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p<0.05$). Mikrodalga gücü ve sürenin toplam flavonoid madde miktarı üzerinde önemli etkiye sahip oldukları saptanmıştır. Mikrodalga ekstraksiyon için 0.2398 olan uyum eksikliği önemsiz bulunmuş olup bu durum modelimizi desteklemektedir ($p>0.05$).

Determinasyon katsayısının (R^2) 0.9814 olması modelimizin elde edilen veriler ile tutarlı olduğunun göstergesidir. Toplam flavonoid miktarı analizleri sonucu elde edilen (3.9) eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\text{T. Flavonoid M.} = 10.58 + 4.37*A + 6.35*B + 1.54*A*B + 0.26*A^2 - 0.85*B^2 \quad (3.9)$$

Toplam flavonoid madde konsantrasyonunun güç ve süreyle değişiminin 3 boyutlu grafiği mikrodalga ekstraksiyon için Şekil 3.9’ da gösterilmiştir.



Şekil 3.9 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid miktarının mikrodalga gücü ve süreyle değişimi

Verilen şekilde görüldüğü gibi mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresiyle doğru orantı göstermektedir. Bu yöntem için 591.83 W ve 2.98 dk olarak elde edilen optimum noktadaki maksimum flavonoid madde konsantrasyonu 21.8047 mg CAE/g örnek' tir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, flavonoid ekstraksiyonu için yoğun olarak uygulanan gelişmiş solvent bazlı ekstraksiyon yöntemlerinden birisidir ve farklı solvent kombinasyonları ile hem polar hem de polar olmayan flavonoidler için sıklıkla tercih edilmektedir. Çalışmamızda bu yöntem ile yüksek oranda flavonoid konsantrasyonu elde etmemizi, çözücü olarak kullandığımız suyun mikrodalga enerjisi ile iyi bir şekilde birleşmesi ve bu şekilde özellikle polar flavonoidler için mükemmel bir çözücü olması şeklinde açıklayabiliriz. Ayrıca, mikrodalga uygulaması ile sulu ve alkolik çözücüler kullanılarak saf polar flavonoid ekstraktlarını mümkün olan en az ekstraksiyon süresi ile elde etmek ve polar olmayan veya daha az polar olan flavonoidler için de çeşitli çözücü kombinasyonlarıyla başarıya ulaşmak mümkündür [143], [144], [145]. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi, çeşitli biyomateryallerden flavonoidlerin ekstraksiyon verimini daha da artırmak için ultrases, yüksek basınç ve vakum gibi diğer ileri teknolojilerle de kombine şeklinde kullanılmaktadır [146].

Yaygın olarak bilinen doğal Çin tıbbi bitkilerinden biri olan *Radix Astragali* bitkisinden flavonoid ekstraksiyonu için mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı çalışmada, mikrodalga gücü, etanol konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı ve örnek:çözücü oranı parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimum koşuldaki (1000 W mikrodalga gücü, %90 etanol konsantrasyonu, 110°C sıcaklık ve 25 mL/g örnek:çözücü oranı) flavonoid ekstraksiyon miktarı 1.190 ± 0.042 mg/g olarak elde edilmiştir. Sonuçlar, soxhlet ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında, mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin ekstraksiyon süresini azalttığı ve degradasyon olmaksızın yüksek oranda flavonoid eldesi gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir [147]. Bu çalışmadaki sonuçlar bizim elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

3.4 Antosiyaninlerin Ekstraksiyon Optimizasyonu ve İstatistiksel Analiz

Yapılan tasarıma göre elde edilen deney koşullarına göre yapılan toplam antosiyanin madde miktarı sonuçları, bağımlı değişken olarak mg /g örnek cinsinden programa girilmiştir. Üç farklı yöntemde kullanılan deney koşulları ve elde edilen bağımlı değişken değerleri Çizelge 3.19, Çizelge 3.21 ile Çizelge 3.23' te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre klasik çözücü ekstraksiyonunda ekstraktlardaki toplam antosiyanin madde miktarı 156.15-329.05 mg Cy-3-glu/kg aralığında, ultrases ekstraksiyonunda 172.83-379.58 mg Cy-3-glu/kg aralığında ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda ise 33.4-3394.45 mg Cy-3-glu/kg aralığında bulunmuştur.

3.4.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Klasik ekstraksiyon yöntemindeki bağımsız değişken olan sıcaklık ve süre aralığı ile bağımlı değişken olarak tercih edilen toplam antosiyanin madde değerleri Çizelge 3.19' da verilmiştir.

Çizelge 3.19 Klasik ekstraksiyon, toplam antosiyanin miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Antosiyanin M. (mg Cy-3-glu/kg)
1	30	10	156.15
2	30	20	186.55
3	30	30	218.80
4	45	10	194.55
5	45	20	220.45
6	45	20	225.35
7	45	20	230.45
8	45	30	274.45
9	60	10	211.75
10	60	20	279.05
11	60	30	329.05

Elde edilen verilere göre, klasik ekstraksiyon için toplam antosiyanin madde miktarı 156.15 - 329.05 mg Cy-3-glu/kg örnek aralığında değişmektedir. Klasik ekstraksiyon için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA sonuçları Çizelge 3.20' de verilmiştir.

Çizelge 3.20 Klasik ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Antosiyanin Miktarı)

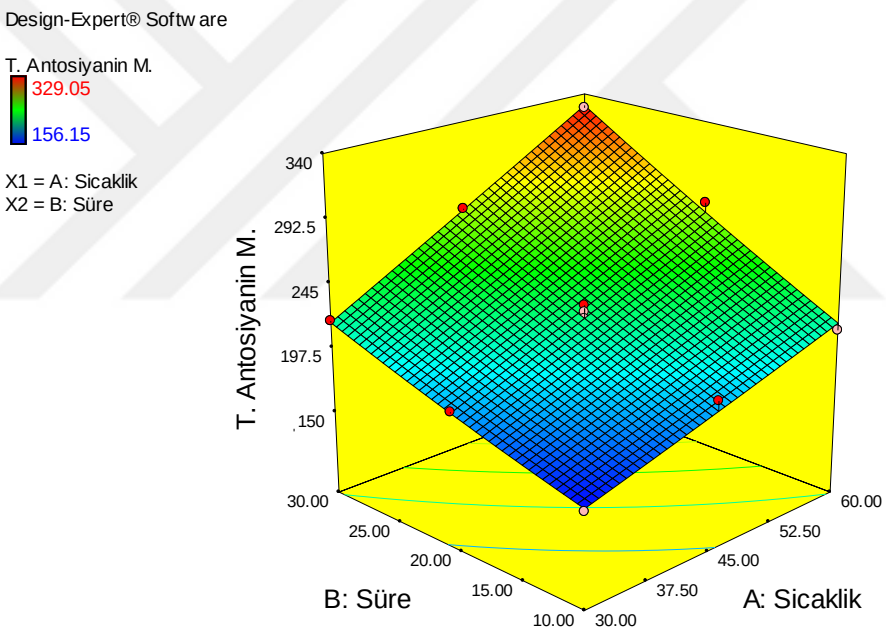
Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	23141.26	5	4628.25	105.07	<0.0001
A-Sıcaklık	11124.12	1	11124.12	252.53	<0.0001
B-Süre	11253.67	1	11253.67	255.47	<0.0001
AB	746.66	1	746.66	16.95	0.0092
A^2	0.82	1	0.82	0.019	0.8967
B^2	13.05	1	13.05	0.30	0.6096
Kalıntı (Residual)	220.25	5	44.05		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	170.24	3	56.75	2.27	0.3204
Hata	50.01	2	25.00		
Düzeltilmiş Toplam	23361.51	10			
R^2=0.9906			**R^2_{adj}**=0.9811		

Model için elde edilen p (olasılık) değerine bakıldığında kuadratik modelin tasarımımız için anlamlı olduğunu söyleyebiliriz ($p<0.0001$). Verilere göre, sıcaklık ve sürenin toplam antosiyanin madde ekstraksiyon verimini istatistiksel olarak etkilediği görülmüştür. Uyum eksiliğinin önemsiz olduğu tespit edilmiştir.

Tanımlanan modelde R^2 değerinin 1'e çok yakın olması tasarım ile elde edilen verilerin uyumlu olduğunun göstergesidir. Toplam antosiyanin miktarı analizleri ile elde edilen (3.10) eşitliği aşağıda gösterilmiştir.

$$\text{T. Antosiyanin M.} = 228.14 + 43.06*A + 43.31*B + 13.66*A*B + 0.57*A^2 + 2.27*B^2 \quad (3.10)$$

Toplam antosiyanin madde konsantrasyonunun sıcaklık ve süreyle değişiminin 3 boyutlu yanıt yüzey grafiği klasik ekstraksiyon için Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10 Klasik ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi

Şekilden de anlaşıldığı gibi, klasik ekstraksiyonda toplam antosiyanin madde miktarı sıcaklık ve süreyle artış göstermektedir. Optimum noktadaki maksimum toplam antosiyanin madde konsantrasyonu 331.01 mg Cy-3-glu/kg örnek' tir.

3.4.2 Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon yöntemindeki bağımsız değişkenler sıcaklık ve süre aralığı ile bağımlı değişken olarak kullanılan toplam antosiyanin madde miktarı değerleri Çizelge 3.21' de verilmiştir.

Çizelge 3.21 Ultrases destekli ekstraksiyon, toplam antosiyanin miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Sıcaklık (°C)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Antosiyanin M. (mg Cy-3-glu/kg)
1	30	10	172.83
2	30	20	177.61
3	30	30	252.11
4	45	10	202.06
5	45	20	233.60
6	45	20	235.04
7	45	20	226.27
8	45	30	314.77
9	60	10	222.10
10	60	20	294.74
11	60	30	379.58

Yukarıda verilen çizelgeye göre, ultrases destekli ekstraksiyon için toplam antosiyanin madde miktarı 172.83-379.58 mg Cy-3-glu/kg örnek aralığında bulunmuştur. Ultrasonik ekstraksiyon için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen varyans analiz (ANOVA) sonuçları Çizelge 3.22' de verilmiştir.

Çizelge 3.22 Ultrases destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Antosiyanin Miktarı)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	37824.24	5	7564.85	106.33	<0.0001
A-Sıcaklık	14393.26	1	14393.26	202.31	<0.0001
B-Süre	20354.88	1	20354.88	286.11	<0.0001
AB	1528.81	1	1528.81	21.49	0.0057
A^2	3.79	1	3.79	0.053	0.8266
B^2	1394.68	1	1394.68	19.60	0.0068
Kalıntı (Residual)	355.72	5	71.14		

Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	311.48	3	103.83	4.69	0.1806
Hata	44.24	2	22.12		
Düzeltilmiş Toplam	38179.96	10			
R^2=0.9907			**R^2_{adj}**=0.9814		

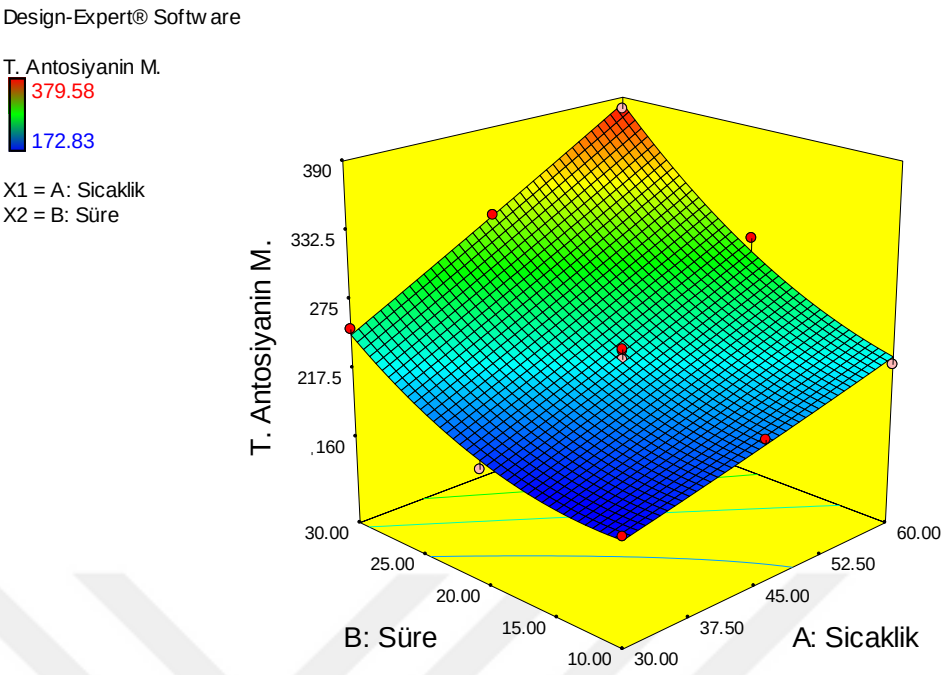
ANOVA sonucuna göre, kuadratik modelin tasarımımız için istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). Bağımsız değişken olan sıcaklık ve süre parametrelerinin istatistiksel olarak toplam antosiyanin madde ekstraksiyon verimi üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir ($p<0.0001$). Uyum eksikliği terimi önemsiz bulunmuş olup bu durum modelimiz için başarı göstergesidir ($p>0.05$).

R^2 (regrasyon katsayısı) değerinin 0.9907 olması modelimiz ile elde edilen verilerin uyumlu olduğunun göstergesidir.

Ultrases destekli ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarı analizleri sonucu elde edilen kodlanmış değerler cinsinden denklem katsayılarının (2.1)'e yerleştirilmesiyle (3.11) elde edilmiştir.

$$\text{T. Antosiyanin M.} = 232.96 + 48.98*A + 58.25*B + 19.55*A*B + 1.22*A^2 + 23.46*B^2 \quad (3.11)$$

Toplam antosiyanin madde konsantrasyonunun bağımsız değişkenler (sıcaklık ve süre) ile değişiminin 3 boyutlu grafiği ultrasonik ekstraksiyon için Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11 Ultrases destekli ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarının sıcaklık ve süreyle değişimi

Grafiğe bakıldığında, toplam antosiyanin madde miktarının sıcaklık ve süreye bağlı olarak arttığı görülmektedir. Bu yöntem için 60 °C ve 29.99 dk olarak elde edilen optimum noktadaki maksimum toplam antosiyanin madde konsantrasyonu 384.298 mg Cy-3-glu/kg örnek olarak gözlenmiştir.

Çalışmamızdaki klasik ve ultrases yöntemlerindeki sıcaklık ve süre parametreleri aynı olmasına rağmen ultrasesin etkisiyle ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde elde edilen örneklerde daha fazla antosiyanin içeriği tespit edilmiştir. Bu durum, Wang vd. [148] yaptığı çalışma tarafından desteklenmektedir. Bahsedilen çalışmada, farklı antosiyanin kompozisyonuna sahip ürünler (yabanmersini, kiraz ve kırmızı armut kabuğu) klasik çözücü ve ultrases destekli ekstraksiyon ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon yöntemlerinin ve koşullarının farklı meyvelerdeki antosiyanin bileşimleri üzerindeki etkileri HPLC ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda ultrases uygulamasının toplam antosiyanin ekstraksiyon verimini arttırdığı gözlenmiştir.

Bonfigli vd. [149] tarafından yapılan çalışmada, üzüm posasından geleneksel ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemleri ile antosiyaninlerin eldesi gerçekleştirilmiş ve

yöntemler karşılaştırılmıştır. Matematiksel modelleme, öncelikle ekstraksiyon işlemini temsil etmek ve bağımlı parametreleri belirlemek ve daha sonra ise sistemin farklı çalışma koşulları altında nasıl davrandığına dair yararlı tahminler elde etmek için kullanılmıştır. 25, 45 ve 65 ° C'lik ekstraksiyon sıcaklıklarında, 1800 saniyede geleneksel yöntem için elde edilen maksimum antosiyanin konsantrasyonları sırasıyla 0.373, 0.453 ve 0.475 mg/mL'dir. Ultrases sisteminde ise aynı süre ve sıcaklıklarda elde edilen maksimum antosiyanin konsantrasyonları 0.386, 0.475 ve 0.479 mg/mL'dir. Yöntemler karşılaştırıldığında, ilk 600 saniyede geleneksel yöntem için % 80 antosiyanin geri kazanımı olurken ultrases yönteminde bu oran % 90 olarak rapor edilmiştir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi bu çalışmada da klasik çözücü ve ultrases destekli ekstraksiyonlarda sıcaklık artışı antosiyanin eldesinde artışa sebep olup ultrasonik uygulama hedef bileşen verimini arttırmıştır.

Yapılan başka bir çalışmada, meyve, sebze ve bitkilerin renklerini etkileyen antosiyaninlerin ahududundan (*Rubus idaeus*) ekstraksiyonu için ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Optimum koşulların belirlenmesi için yanıt yüzey yönteminin merkezi kompozit tasarımı tercih edilmiştir. Ultrasonik güç, çözücü:örnek oranı ve ekstraksiyon süresi parametrelerinin antosiyanin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Optimize edilmiş koşullarda (200 s ekstraksiyon süresi, 400 W ultrasonik güç ve 4:1 mL/g çözücü:örnek oranı), toplam antosiyanin miktarı 34.5 mg Cy-3-glu/100 g taze örnek olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar, ultrases destekli yöntemi klasik çözücü yöntem ile karşılaştırdıklarında, iki yöntemde de optimum koşullarda yaklaşık aynı oranda antosiyanin eldesi olmasına rağmen klasik yöntemde ekstraksiyon süresi 53 dk, ultrases yönteminde ise yalnızca 3.3 dk sürdüğünü belirtmişlerdir. Bu sebeple, ultrases destekli ekstraksiyonun, antosiyanin eldesi için klasik yönteme göre daha hızlı olduğunu rapor etmişlerdir [58].

3.4.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon için bağımsız değişken olarak kullanılan mikrodalga gücü ve sürenin tasarımdaki aralığı ile bağımlı değişken toplam antosiyanin madde miktarı değerleri Çizelge 3.23’ te verilmiştir.

Çizelge 3.23 Mikrodalga destekli ekstraksiyon, toplam antosiyanin miktarı deneysel sonuçları

Örnek No	Faktör 1 A:Güç (W)	Faktör 2 B:Süre (dk)	Cevap T. Antosiyanin M. (mg Cy-3-glu/kg)
1	300	1	33.40
2	300	2	283.90
3	300	3	802.70
4	450	1	314.20
5	450	2	1559.90
6	450	2	1504.55
7	450	2	1661.55
8	450	3	2510.60
9	600	1	493.55
10	600	2	2319.25
11	600	3	3394.45

Yukarıdaki çizelgeye göre, mikrodalga ekstraksiyonu için toplam antosiyanin madde miktarı 33.4-3394.45 mg Cy-3-glu/kg örnek aralığında değişiklik göstermektedir. Mikrodalga ekstraksiyonu için yanıt yüzey kuadratik modeline göre elde edilen ANOVA sonuçları Çizelge 3.24' te verilmiştir.

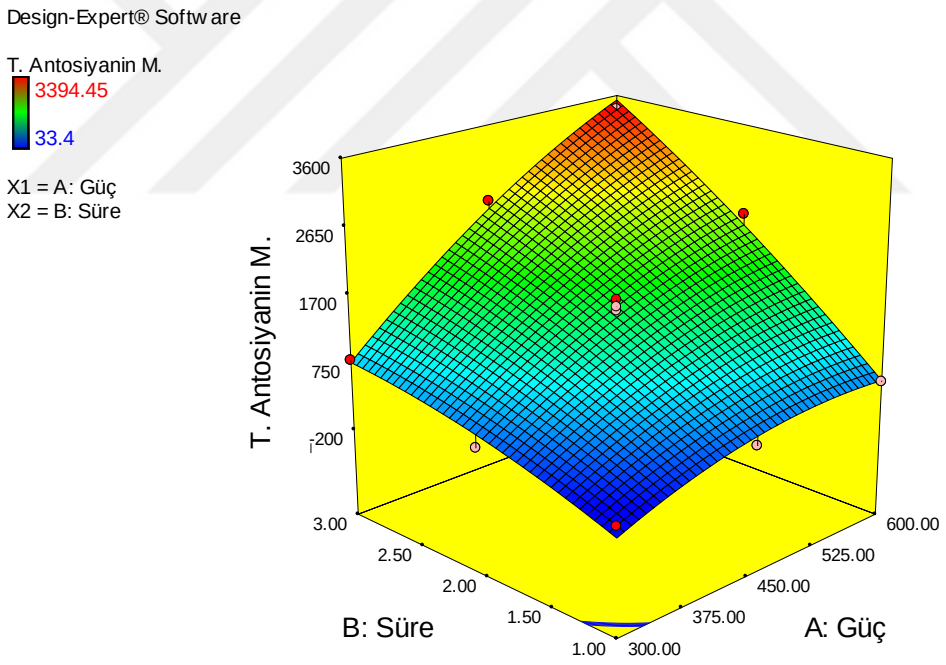
Çizelge 3.24 Mikrodalga destekli ekstraksiyon ANOVA sonuçları (Toplam Antosiyanin Miktarı)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi (DF)	Ortalamanın Karesi	F Değeri	Olasılık/Probabilite (P) > F
Model	1.146E+007	5	2.293E+006	79.70	<0.0001
A-Güç	4.313E+006	1	4.313E+006	149.95	<0.0001
B-Süre	5.736E+006	1	5.736E+006	199.41	<0.0001
AB	1.136E+006	1	1.136E+006	39.49	0.0015
A^2	1.602E+005	1	1.602E+005	5.57	0.0648
B^2	50098.59	1	50098.59	1.74	0.2441
Kalıntı (Residual)	1.438E+005	5	28765.00		
Uyum Eksikliği (Lack Of Fit)	1.311E+005	3	43714.41	6.89	0.1293
Hata	12681.78	2	6340.89		
Düzeltilmiş Toplam	1.161E+007	10			
R^2=0.9876			**R^2_{adj}**=0.9752		

Model toplam antosiyanin miktarı için anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001$). Bağımsız değişkenler olan mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresi model için önemli değişkenler olarak belirlenmiştir. Mikrodalga ekstraksiyon için model uygunsuzluğu (Lack of Fit) p değerinin 0.1293 olması nedeniyle önemsiz bir terim olarak tespit edilmiş olup bu durum modelimizi desteklemektedir ($p>0.05$). Tasarlanan modelde 0.9876 olarak elde edilen R^2 değeri çalışmamız için olumlu bir sonuçtur. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, toplam antosiyanin miktarı verileri sonucu elde edilen (3.12) eşitliği aşağıda verilmiştir.

$$\text{T. Antosiyanin M.} = 1566.41 + 847.88*A + 977.77*B + 532.90*A*B - 251.45*A^2 - 140.63*B^2 \quad (3.12)$$

Toplam antosiyanin madde konsantrasyonunun mikrodalga gücü ve süresiyle değişiminin 3 boyutlu grafiği Şekil 3.12'de gösterilmiştir.



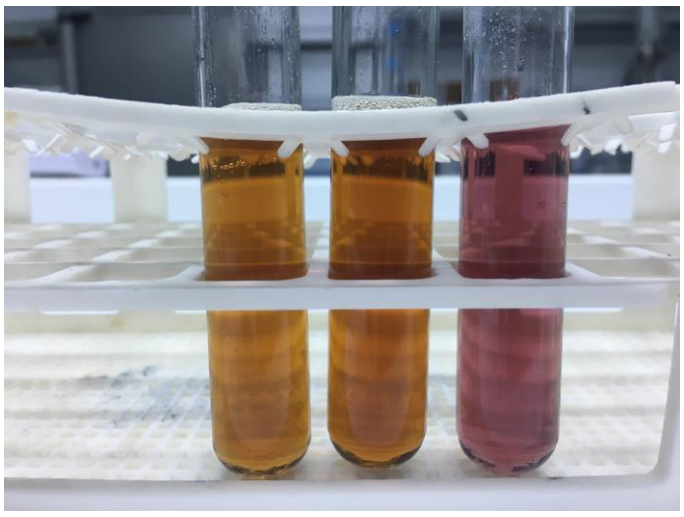
Şekil 3.12 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam antosiyanin miktarının mikrodalga gücü ve süreyle değişimi

Şekilde de görüldüğü üzere toplam antosiyanin madde konsantrasyonu mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresiyle artış göstermektedir. Bu yöntem için optimum nokta

değerleri 591.83 W ve 2.98 dk olup bu noktada elde edilen maksimum antosiyanin madde konsantrasyonu 3462.93 mg Cy-3-glu/kg örnek' tir.

Zheng vd. [61] tarafından gerçekleştirilen çalışmada, yaban mersini tozundan mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen antosiyaninlerin ekstraksiyon karakteristikleri ve optimal parametreleri araştırılmıştır. Ekstraksiyon parametreleri olarak ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı, etanol konsantrasyonu ve katı-sıvı oranı seçilmiştir. Antosiyanin ekstraksiyonunu, en fazla katı:sıvı oranı daha sonra etanol konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı ve en az da ekstraksiyon süresinin etkilediği rapor edilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarında (7 dk, 47 °C, %55.5 etanol konsantrasyonu ve 1:34 katı:sıvı oranı) maksimum antosiyanin ekstraksiyon oranı %73.73 olarak elde edilmiştir. Bu çalışmada da bizim çalışmamızda olduğu gibi elde edilen antosiyanin oranı ekstraksiyon süresi ile orantı göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan en yüksek süreye kadar ekstraksiyon verimi artış göstermesine rağmen bu çalışmada 5.3 dk'dan sonra antosiyanin eldesindeki oran azalmıştır.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen optimum noktadaki toplam antosiyanin miktarı (3462.93 mg Cy-3-glu/kg) ultrases destekli ekstraksiyondan (384.30 mg Cy-3-glu/kg) yaklaşık % 88.9 ve klasik yöntemden (331.01 mg Cy-3-glu/kg) yaklaşık % 90.4 daha fazladır. Antosiyanin maddelerin renkli bileşenler olduğu göz önüne alınırsa, ekstraktlardan elde edilen antosiyaninlerin miktarlarındaki büyük fark görsel olarak da ekstraktlara yansımıştır (Şekil 3.13).



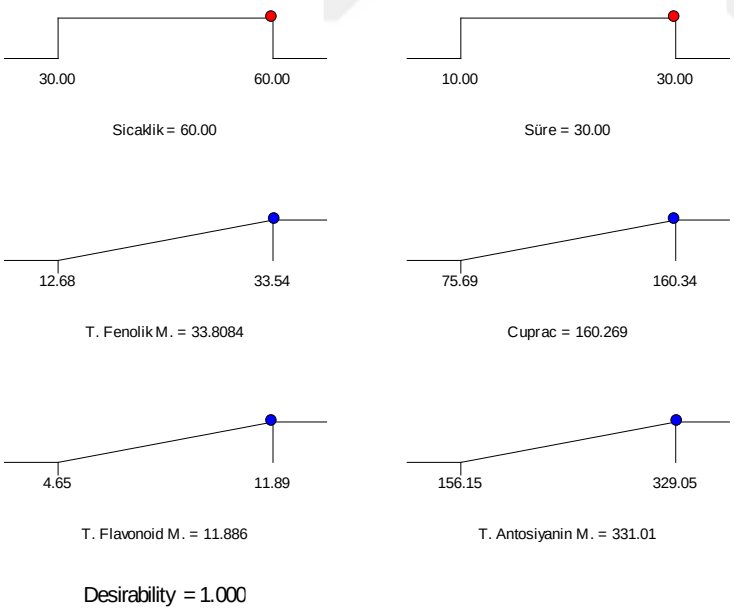
Şekil 3.13 Üç farklı yöntem ile elde edilen ekstraktlar

Şekil 3.13’ te sırası ile klasik çözücü ekstraksiyonunda, ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda, en yüksek değerde toplam antosiyanin miktarı elde edilmiş olan ekstraktların 1:3 oranında saf su ile seyreltilmiş halleri verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi mikrodalga destekli yöntemin uygulandığı ekstrakt, diğerlerinden oldukça farklı bir renge sahiptir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen antosiyaninlerin büyük bir kısmını siyanidin ve pelargonidin glikozitlerinin oluşturmuş olabileceğini bu bileşiklerin genellikle mavimsi kırmızı renk vermesinden dolayı söyleyebiliriz [36].

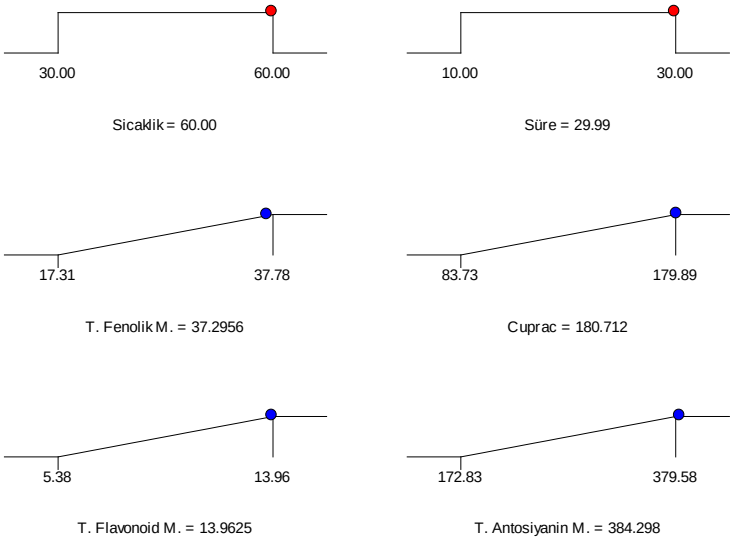
3.5 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve Literatürdeki Benzer Çalışmalar

Tez kapsamında kullanılan klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırılırken Yanıt Yüzey Yöntemi ile elde edilen optimum noktalardaki değerler ele alınmıştır (Çizelge 3.25).

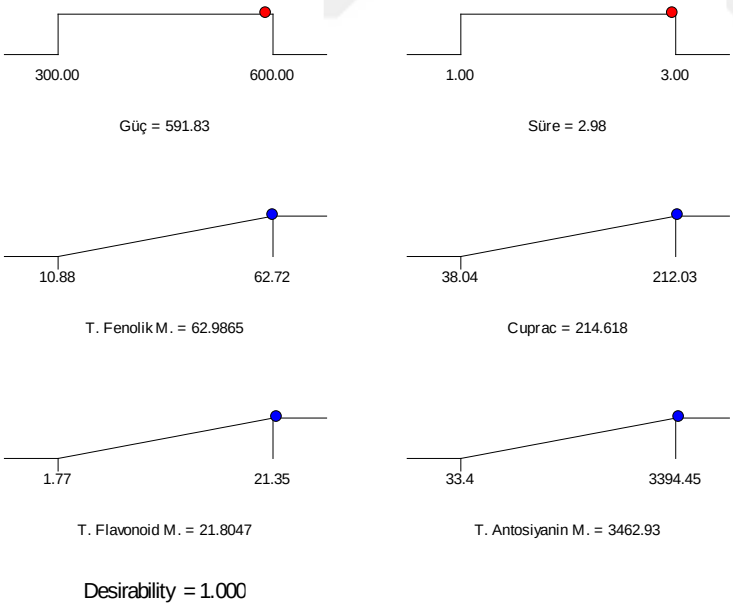
Yanıt yüzey yöntemi ve merkezi kompozit tasarımı ile elde edilen optimum koşullar ve bu koşullardaki maksimum bağımlı değişken değerlerini gösteren şekiller her üç yöntem için de aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.14 Klasik çözücü ekstraksiyonunda optimum koşullar



Şekil 3.15 Ultrases destekli ekstraksiyonda optimum koşullar



Şekil 3.16 Mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum koşullar

Çizelge 3.25 Yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen optimum noktalardaki toplam fenolik madde, CUPRAC, toplam flavonoid madde ve toplam antosiyanin madde miktarları

Ekstraksiyon Yöntemi	**Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g örnek)**	**CUPRAC (mg TEAC/g örnek)**	**Toplam Flavonoid Miktarı (mg CAE/g örnek)**	**Toplam Antosiyanin Miktarı (mg Cy-3-glu/kg örnek)**
Klasik Çözücü Ekstraksiyonu	33.81	160.27	11.89	331.01
Ultrases Destekli Ekstraksiyon	37.30	180.71	13.96	384.30
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	62.99	214.62	21.80	3462.93

Elde edilen verilere göre; toplam fenolik, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve antioksidan kapasite ekstraksiyon verimleri açısından en iyi yöntemin mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ikinci sırada ultrases destekli ekstraksiyon olduğu anlaşılmaktadır (mikrodalga destekli ekstraksiyon > ultrases destekli ekstraksiyon > klasik çözücü ekstraksiyonu).

Tez kapsamında kullandığımız ekstraksiyon yöntemleri ile yapılan reyhan bitkisinden biyoaktif bileşen eldesini içeren araştırmalar literatürde pek olmamasına rağmen vardığımız sonucu destekleyen farklı ürün çeşitleri için birçok çalışma mevcuttur. Bunlara Dahmoune vd. [107] tarafından gerçekleştirilen çalışma örnek verilebilir. Çalışmada, mersin bitkisinin (*Myrtus communis*) yapraklarından toplam fenolik madde ekstraksiyonu için mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi araştırılmıştır. Optimum mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarında yaprak ekstraktlarının toplam fenolik kapasitesi, ultrases destekli ekstraksiyon ve konvansiyonel solvent ekstraksiyonu ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada, etanol konsantrasyonu, mikrodalga gücü, ışınlama süresi ve çözücü-katı oranı gibi ekstraksiyon parametrelerinin toplam fenolik ekstraksiyonu üzerindeki etkisi, ikinci mertebeden regresyon denklemi kullanılarak modellenmiştir.

Mikrodalga ekstraksiyonunun optimize edilmiş koşullar altında, toplam fenolik madde geri kazanımı 162.49 mg gallik asit/g kuru ağırlık olarak elde edilmiştir. Mikrodalga ekstraksiyon yöntemi, toplam fenolik madde, toplam flavonoid (5.02 mg QE/g) ve antioksidan aktivite (38.20 µg GAE/mL) açısından diğer iki yönteme göre daha verimli bulunmuştur. Araştırmacılar, biyoaktif bileşenlerin mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak bitki materyallerinden ekstraksiyonunda daha az çözücü tüketildiğini ve zaman tasarrufu sağlandığını ifade etmişlerdir.

Başka bir çalışmada, melisa bitkisinden fenolik madde ekstraksiyonu için mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Ekstraksiyon süresi ve katı:çözücü oranının bağımsız değişken olarak kullanıldığı çalışmada, mikrodalga yöntemi için en yüksek toplam fenolik madde miktarı (145.8 mg GAE/g) 5 dk ekstraksiyon süresi ve 1:30 katı:çözücü oranına sahip örnekte elde edilmiştir. Ultrases yönteminde ise en yüksek toplam fenolik madde miktarı (105.5 mg GAE/g) 20 dk ve 1:30 katı:çözücü oranı uygulanan örnekte elde edilmiştir. Mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemleri, optimum koşuldaki toplam fenolik bileşik miktarı ve antioksidan aktivite açısından kıyaslandığında mikrodalga yönteminin diğer yönteme göre daha avantajlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, mikrodalga yönteminin ekstraksiyon süresini % 83 oranında azalttığı vurgulanmıştır [150].

Kala vd. [151], karahindiba bitkisinden fenolik madde ekstraksiyonu için mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini ve geleneksel yöntemlerden soxhlet ekstraksiyonu ile maserasyon yöntemlerini kullanmışlardır. Ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanan çalışmada soxhlet ekstraksiyon ve maserasyon 36 saat sürerken mikrodalga ekstraksiyon ise en fazla 6 dakika devam etmiştir. En yüksek fenolik madde miktarı 6 dakika ekstraksiyon süresi ve 160 W mikrodalga gücü uygulanan örnekte elde edilmiştir. Toplam fenolik madde ve flavonoid verimleri karşılaştırıldığında mikrodalga destekli ekstraksiyonun, geleneksel yöntemlere göre sırasıyla % 60 ve % 25 daha verimli olduğu görülmüştür.

Bampouli vd. [152] yaptıkları çalışmada, sakız ağacı (*Pistacia lentiscus)* yapraklarının taze ve kurutulmuş örneklerinden antioksidan aktivite karşılaştırması için dört farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemler arasında geleneksel soxhlet

ekstraksiyonu (SE) ve mikrodalga (MAE) ve ultrases destekli ekstraksiyon (UAE), süperkritik sıvı ekstraksiyon (SFE) gibi modern teknikler bulunmaktadır. Taze ve kurutulmuş yaprakların her ikisinde de en yüksek verim mikrodalga destekli ekstraksiyonda elde edilmiş olup ikinci sırada ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi gelmektedir.

Pistacia lentiscus yapraklarından fenolik bileşik eldesi için mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılan çalışmada, toplam fenolik bileşiklerin optimizasyonu için yanıt yüzey yöntemi deneysel tasarım için ise Box–Behnken tasarımı tercih edilmiştir. Ultrases destekli ve klasik çözücü ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırılan mikrodalga destekli ekstraksiyon için optimum parametreler % 46 etanol konsantrasyonu, 60 saniye işlem süresi ve 1:28 katı/sıvı oranı olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda toplam fenolik madde verimi en yüksek mikrodalga destekli ekstraksiyonda (185.69 mg GAE/g kuru ağırlık) daha sonra ultrases (142.76 mg GAE/g) ve klasik (178.00 mg GAE/g) yöntemlerde elde dilmiştir. Ayrıca, toplam flavonoid verimi de en iyi mikrodalga yönteminde (5.16 mg QE/g kuru ağırlık) elde dilmiştir [153].

Fındık zarından antioksidan maddelerin elde edilmesi için farklı yöntemlerin (ultrasonik ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, klasik çözücü ekstraksiyonu ve soxhlet ekstraksiyonu) kullanıldığı çalışmada, ultrases destekli ekstraksiyon için optimum ekstraksiyon koşulları 20 ^{o}C, 45 dk ve % 69,12 etil alkol konsantrasyonu; mikrodalga destekli ekstraksiyonda 595,90 W, 5,56 dk ve % 60,80 etil alkol konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir. Optimum koşullardaki toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite (FRAP) değeri ultrason yöntemi için sırasıyla 125,38 mg GAE/g ve 723,05 mmol/g, süper kritik akışkan ekstraksiyonunda 71,19 mg GAE/g ve 415,20 mmol/g ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda ise 109,45 mg GAE/g ve 580,69 mmol/g olarak elde edilmiştir. Mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon ile optimum koşullarda elde edilen örneklerin klasik çözücü ve soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlardan daha yüksek toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite değeri gösterdiği rapor edilmiştir [154].

Başka bir çalışmada, yabanmersini posasından ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak toplam antosiyanin ve fenolik madde miktarı yanıt yüzey yöntemine göre

optimize edilmiştir. Box–Behnken tasarımının kullanıldığı çalışmada, optimum koşullar 61.03 °C sıcaklık, 21.70 mL/g sıvı:katı oranı ve 23.67 dakikalık sonikasyon süresi ile elde edilmiştir. Ultrasonik yöntem klasik çözücü ekstraksiyonu ile karşılatırılmış olup ultrasonik ekstraksiyonda elde edilen bağımlı değişken değerleri daha verimli bulunmuştur. Araştırmacılar, gıda sanayi kalıntı ekstraksiyonunda istenen biyoaktif bileşenlerin eldesinde ultrases kullanımının verimli, ekonomik ve çevresel bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir [155].

Caldas vd. [156] tarafından yapılan araştırmada, çalışmamızda vardığımız sonuçtan farklı bir sonuç elde edilmiştir. Çalışmada, konvansiyonel ve konvansiyonel olmayan ekstraksiyon yöntemleri (ultrases ve mikrodalga destekli) kullanılarak üzüm kabuğundan fenolik bileşiklerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Öncelikle üzüm kabuğu ekstraktlarının fenolik içeriği ve antioksidan kapasitesi üzerine katı: sıvı oranı (1:3 – 1:17) ve etanol konsantrasyonunun (% 8-92) etkisi değerlendirilmiştir. 1:10 katı: sıvı oranı ve % 50 etanol konsantrasyonu, fenolik bileşiklerin geri kazanımı için en uygun koşul olarak seçilmiştir. Daha sonra, seçilen koşullarda karşılaştırma için ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ekstraksiyon kinetikleri belirlenmiştir. Çalışma sonunda ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin 9 dk ekstraksiyon süresi ile en iyi performansı gösterdiği rapor edilmiştir. Bu durum bize, ekstraksiyon yöntemlerinin verimi kullanılan ürün çeşidine göre farklılık gösterebileceğini ifade etmektedir.

Pedro vd. [157] yaptıkları çalışmada, reyhan yaprağı (*Ocimum basilicum*) ekstraktlarının biyoaktif bileşen (toplam antosiyanin, flavonoid ve fenolik madde miktarı) ve antioksidan kapasite üzerindeki ekstraksiyon süresinin (20-60 dk) ve sıcaklığının (10-30 °C) etkilerini değerlendirmek için yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Ayrıca, sıcaklık ve ışığın antosiyaninlerin stabilitesi ile ilgisi de incelenmiştir. Bütün bağımlı değişkenlerin, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı ile önemli derecede etkilendiği gözlenmiştir ($p<0.0001$). 30 °C sıcaklık ve 60 dk ekstraksiyon süresi ile elde edilen optimum noktadaki *Ocimum basilicum* yaprak ekstraklarında, toplam fenolik madde miktarı 272 - 688 mg/100 g, toplam flavonoid miktarı 40.49 - 106.23 mg/100 g, toplam antosiyanin içeriği 21.81-64.70 mg/100 g taze örnek ve DPPH radikaline göre antioksidan aktivite % 43.00-77.21 aralığında bulunmuştur. Araştırmacılar, elde edilen

verilere göre reyhanın potansiyel bir stabil biyoaktif bileşik kaynağı olduğunu da vurgulamışlardır. Bu çalışmadaki veriler göz önüne alındığında, tez kapsamında elde edilen verilerin bu değerlerden oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bu farklılık, biyoaktif bileşenlerin özellikle fenoliklerin eldesinde materyalin durumu (kuru, taze gibi), ekstraksiyon koşulları ve ekstrakte edilmek istenen ürüne uygun çözücünün seçimi gibi önemli parametrelerin rol almasından kaynaklanabilir. Böylece, tez kapsamında kullanılan kuru reyhan yapraklarından biyoaktif bileşenlerin eldesi için tercih edilen ekstraksiyon yöntemlerinin ve koşullarının iyi bir şekilde optimize edildiği söylenebilir.

Yeşiloğlu vd. [158] tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ülkemizin Trakya bölgesinden elde edilen reyhan yapraklarının ekstraksiyonunda farklı çözücüler (su, aseton ve etanol) kullanılmıştır. Ekstraktların toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı ile antioksidan kapasitesi araştırılmıştır. Çözücü olarak su, aseton ve etanol kullanılan örneklerde toplam fenolik miktarı sırası ile 100 ± 0.1 mg GAE/g, 66 ± 0.1 mg GAE/g ve 116 ± 0.2 mg GAE/g elde edilirken toplam flavonoid içeriği ise aynı sıra ile 42.5 ± 0.5 mg CE/g, 36.6 ± 1.5 mg CE/g ve 24.2 ± 0.5 mg CE/g olarak tespit edilmiştir. DPPH radikaline karşı antioksidan aktivite değerleri etanol çözücüsü için 17.34 µg/mL, aseton için 42.10 µg/mL ve su için 62.10 µg/mL olarak elde edilmiştir. Araştırmacılar elde edilen sonuçlara göre reyhanın su, etanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri açısından önemli bir değere sahip olduğunu belirtmiştir. Örneklerin yüksek antioksidan kapasitesi fenolik ve flavonoid içeriklerine bağlanmıştır. Bu durum birçok araştırmacı tarafından da desteklenmektedir [159], [160], [161]. Tasarımımız sonucunda elde ettiğimiz ekstraktların fenolik, flavonoid ve antosiyanin düzeylerine uygun olarak antioksidan kapasite değeri elde edilmesi çalışmamızın bahsedilen literatür bilgisi ile desteklendiğinin göstergesidir.

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, reyhan yaprağından fenolik, flavonoid ile antosiyanin gibi biyoaktif bileşenlerin ve antioksidan maddelerin ekstraksiyonu, klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrases destekli ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik, toplam flavonoid ile toplam antosiyanin madde ve antioksidan kapasite sonuçları yanıt yüzey yönteminde bağımlı değişken olarak tercih edilmiş ve optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1. Klasik çözücü ekstraksiyonunda kullanılan sıcaklık ve süre parametrelerinin optimum noktadaki değerleri 60 °C ve 30 dk'dır. Bu parametrelerin bütün bağımlı değişkenlerin üzerinde etkisi olduğu gözlenmiştir. Optimum koşullardaki toplam fenolik miktarı 33.81 mg GAE/g örnek, toplam flavonoid miktarı 11.89 mg CAE/g örnek, toplam antosiyanin miktarı 331.01 mg Cy-3-glu/kg örnek ve antioksidan kapasite (CUPRAC) 160.27 mg TEAC/g örnek olarak tespit edilmiştir.

2. % 100 amplitude değerinde çalışılan ultrases destekli ekstraksiyonda kullanılan parametreler klasik çözücü ekstraksiyonundakilerle aynı olup optimize edilmiş koşullardaki değerleri 60 °C ve 29.99 dk'dır. Varyans analiz sonuçlarına göre, sıcaklık ve sürenin önemli parametreler olduğu tespit edilmiştir. Optimize edilmiş koşullardaki toplam fenolik miktarı 37.30 mg GAE/g örnek, toplam flavonoid miktarı 13.96 mg CAE/g örnek, toplam antosiyanin miktarı 384.30 mg Cy-3-glu/kg örnek ve antioksidan kapasite (CUPRAC) 180.71 mg TEAC/g örnek olarak bulunmuştur.

3. Mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin bağımsız değişken olarak seçildiği mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde optimum nokta 591.83 W ve 2.98 dk değerlerinde bulunmuştur. ANOVA sonuçlarına göre, bağımsız değişkenlerin bütün yanıtlar üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Bu yöntem ile elde edilen optimize edilmiş koşullardaki toplam fenolik miktarı 62.99 mg GAE/g örnek, toplam flavonoid miktarı 21.80 mg CAE/g örnek, toplam antosiyanin miktarı 3462.93 mg Cy-3-glu/kg örnek ve antioksidan kapasite (CUPRAC) 214.62 mg TEAC/g örnek olarak elde edilmiştir.

4. Üç farklı yöntemde elde edilen veriler incelendiğinde, yanıt olarak kullanılan bütün değerler için en verimli yöntemin mikrodalga destekli ekstraksiyon olduğu tespit edilmiştir. Mikrodalgaların, bitkisel hücre içinden biyoaktif bileşenlerin geri kazanımında önemli derecede etkiye sahip oldukları sonucuna varılmıştır. İkinci sırada ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi gelmektedir.

5. Maksimum değerlerin elde edildiği optimum noktalardaki ekstraksiyon süreleri göz önüne alındığında, mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin diğer iki yönteme göre işlem süresini yaklaşık % 90 azalttığı tespit edilmiştir.

6. Ultrases destekli ve klasik çözücü ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan sıcaklık ve süre parametrelerinin aralıkları aynı olmasına rağmen ultrases yönteminde daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bu nedenle, ultrases uygulamasının hedef bileşen eldesinde verimli bir yöntem olduğunu söyleyebiliriz.

7. Analizler sonucunda, reyhan bitkisinin biyoaktif bileşen ve antioksidan maddeler açısından önemli bir kaynak olduğu gözlenmiştir.

Reyhan bitkisinin modern teknolojilerle daha fazla araştırılması ve sahip olduğu değerli bileşenlerin incelenip ilaç, gıda ve kozmetik endüstrileri tarafından değerlendirilmesi beklenmektedir. Ayrıca, mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminden modern, verimli, çevre dostu olması ve zaman tasarrufu sağlaması nedeniyle daha fazla endüstriyel boyutta yararlanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Prakash, P. ve Gupta, N., (2005). "Therapeutic Uses of *Ocimum sanctum* L. (Tulsı) with a Note on Eugenol and Its Pharmacological Actions: A Short Review", Indian J Physiol. Pharmacol, 49: 2 125–131.

[2] Ceylan, A., (1997). "Tıbbi Bitkiler-II (Uçucu Yağ Bitkileri)", E.Ü.Z.F. Yayınları No:481, Bornova, İzmir, s.306.

[3] Telci, İ., Bayram, E., Yılmaz, G. ve Avcı, A. B., (2005). "Türkiye'de Kültürü Yapılan Yerel Fesleğen (*Ocimum* Spp) Genotiplerinin Morfolojik, Agronomik ve Teknolojik Özelliklerinin Karakterizasyonu ve Üstün Bitkilerin Seleksiyonu", (Sonuç Raporu), TOGTAG-3102 No'lu Proje. TÜBİTAK.

[4] Baydar, H., (2013). "Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ve Teknolojisi", Süleyman Demirel Üniversitesi Basım Evi, Isparta. 303s.

[5] Nacar, Ş., (1997). Farklı Yörelerden Sağlanan Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Bitkilerinde Değişik Dikim Sıklıklarının Verim ve Kaliteye Etkisi, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

[6] Telci, İ., Bayram, E., Yilmaz, G. ve Avci, B., (2006). "Variability in Essential Oil Composition of Turkish Basils (*Ocimum basilicum* L)", Biochemical Systematics and Ecology 34,489–497.

[7] Angers, P., Morales, M.R. ve Simon, J.E., (1996). "Fatty Acid Variation in Seed Oil Among *Ocimum* Species", Journal of American Oil Chemists Society 73: 393-395.

[8] Simon, J. E., Morales, M. R., Phippen, W. B., Vieira, R. F. ve Hao, Z., (1999). "Basil: A Source of Aroma Compounds and a Popular Culinary and Ornamental Herb", Prespecctives on new crops and new uses (Ed: J. Janick ASHS press, Alexandria, V.A.)

[9] Girón, L.M., Freire, V., Alonzo, A. ve Cáceres, A., (1991). "Ethnobotanical Survey of the Medicinal Flora used by the Caribs of Guatemala", Journal of Ethnopharmacol, 34: 173–187.

[10] Demirtaş, İ., İnah, N.K., Koldaş, S., Karakoç, Ö.C., Tüfekçi, A.R., Gül, F., Telci, İ., Erenler, R. ve Altun, M., (2013). "Değerlendiremediğimiz Tarım Ürünleri Potansiyelimiz", Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 6(1): 168-173.

[11] Shahidi, F. ve Naczk, M., (2003). “Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects”, Applications, Taylor & Francis, Washington.

[12] de la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E. ve Gonzalez-Aguilar, G. A. (2009). “Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability”, Wiley, New York, 384 s.

[13] Vermerris W. ve Nicholson R., (2006). “Phenolic Compound Biochemistry”, Springer, Dordrecht, Netherlands, 285 s.

[14] Nizamlıoğlu, N. M. ve Nas, S., (2010). “Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri”, Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 20-35.

[15] Lee, H.S., (2004). “Phenolic Compounds in Foods”, Handbook of Food Analysis, Marcel Dekker Inc., pp: 657- 715.

[16] Wilfred, V. ve Nicholson, R. L., (2008). “Phenolic Compound Biochemistry”, Springer, Dordrecht.

[17] Telci, İ., Bayram, E., Yılmaz, E., Kaçar, O., Elmastaş, M., Aytaç, Z. ve Demirtaş, İ., (2012). “Türkiye'de Kültürü Yapılan Reyhanlarda (*Ocimum Basilicum* L.) Flavonoid ve Fenolik Asit Kompozisyonlarının Araştırılarak Farklı Kemotiplerin Belirlenmesi, Önemli Bileşiklerin Ekolojilere Göre Değişimi ve Antioksidan Potansiyellerinin Karşılaştırılması”, 111O677 no’lu Proje. TÜBİTAK.

[18] Lee L., (2010). “Caffeic Acid Derivatives in Dried Lamiaceae and Echinacea Purpurea Products”, Journal of Functional Foods. 2, 158–162.

[19] Lee J. ve Scagel C.F., (2010). “Chicoric Acid Levels in Commercial Basil (*Ocimum basilicum*) and Echinacea Purpurea Products”. Journal of Functional Foods 2, 77–84.

[20] Zgorka, G. ve Gowniak, K., (2001). “Variation of Free Phenolic Acids in Medicinal Plants Belonging to the Lamiaceae Family”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical. Analysis, 26,79-87.

[21] Hiltunen, R. ve Holm, Y., (1999). “Essential oil of *Ocimum*”, Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles. Harwood Academic, Amsterdam, , 77-111.

[22] Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. P. ve Vivanco, J. M., (2002). “Chemical Characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Found in Local Accessions and used in Traditional Medicines in Iran”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 5878–5883

[23] Pokorny, J. ve Panek, J., (2012). “The effect of natural antioxidants in herbs and spices on food shelf-life”, Technology and Nutrition, 51-71

[24] Kwee, E.M. ve Niemeyer, E.D., (2011). "Variations in phenolic composition and antioxidant roperties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars", Food Chemistry, 128: 1044-1050.

[25] Balasundram, N., Sundram, K. ve Samman, S., (2006). “Phenolic Compounds in Plants And Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses”, Food Chemistry, 99, 191-203.

[26] Sellappan, S., Akoh, C. C. ve Krewer, G., (2002). “Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 2432-2438.

[27] Contini, M., Baccelloni, S., Frangipane, M. T., Merendino, N. ve Massantini, R., (2012). “Increasing Espresso Coffee Brew Antioxidant Capacity using Phenolic Extract Recovered from Hazelnut Skin Waste”, Journal of Functional Foods, 4, 137-146.

[28] Pavithra G., M., Siddiqua, S., Naik, A., Kekuda, P. ve Vinayaka K., S., (2013). “ Antioxidant and Antimicrobial Activity of Flowers of Wendlandia Thyrsoidea, Olea Dioica, Lagerstroemia Speciosa and Bombax Malabaricum”, Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3(6):114-120.

[29] Sato, T., Takahashi, A., Kojima, M., Akimoto, N., Yano, M. ve Ito, A., (2007). “A Citrus Polymethoxy Flavonoid, Nobiletin Inhibits Sebum Production and Sebocyte Proliferation, and Augments Sebum Excretion in Hamsters”, The Journal of Investigative Dermatology, 127(12): 2740–8 p.

[30] Buhler, D.R. ve Miranda, C.L., (2000). “Antioxidant Activities of Flavonoids”, Department of Environmental and Molecular Toxicology Oregon State University.

[31] Grayer, R.J., Kite, G.C., Veitch, N.C., Eckert, M.R., Marin, P.D., Senanayake, P. Ve Paton, A.J., (2002). “Leaf Flavonoid Glycosides as Chemosystematic Characters in *Ocimum*”, Biochem Syst Ecol 30: 327-342.

[32] Keleş, Y., (2015). “Antosiyanin Pigmentlerin Biyokimyası ve Analizi”, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 8(1):19-25.

[33] Toprak, F.E., (2011). Ankara ve Nevşehir İllerinde Yetiştirilen Kalecik Karası Üzüm Çeşidinin Fitokimyasal Özellikleri Üzerine Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[34] Söylemezoğlu, G., (2003). “Üzümde Fenolik Bileşikler”, Gıda, 28(3):277-285.

[35] Deman, J.M., (1980). “Principles of Food Chemistry”, Revised Ed. Avi Publishing Co. Inc. Westport. Ct.

[36] Jackman, R.L. ve Smith J.L., (1992). “Anthocyanins and Betalains’’, Natural Food Colorants New York, Usa Illus 183-217.

[37] Karasu, S., BaşLar, M., Karaman, S., Kılıçlı, M., Us, A.A., Yaman, H. ve Sağdıç, O., (2016). "Characterization of some Bioactive Compounds and Physicochemical Propertiesof Grape Varieties Grown in Turkey: Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanin", Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 40: 177-185.

[38] Ekici, L., (2011). Üzüm Kabuğu, Siyah Havuç ve Kırmızı Lahanadan Ekstrakte Edilen Antosiyanin Bazlı Renk Maddelerinin Biyolojik Özelliklerinin

Belirlenmesi ve Bazı Gıda Maddelerinde Renklendirici Olarak Kullanımı, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, , Kayseri, 249 s.

[39] Phippen, W.B. ve Simon, J.E., (1998). "Anthocyanins in Basil (Ocimum basilicum L.)", J. Agric. Food Chem. 46, 1734-1738

[40] McCance, K.R. Flanigan, P.M. Quick, M.M. ve Niemeyer, E.D., (2016). "Influence of plant maturity on anthocyanin concentrations, phenolic composition, and antioxidant properties of 3 purple basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars", Journal of Food Composition and Analysis, 53: 30-39.

[41] Oğuz, A., (2008). Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.

[42] Eruçar, S., (2006). Bazı Bitkisel Çayların Fenolik Madde Profili Ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[43] Pokorny, J. ve Korczak, J., (2001). "Preparation of Natural Antioxidants", In J. Pokony, N. Yanishlieva, M. Gordon, eds. Antioxidants in food, Practical applications. Woodhead Publishing Limited, Cambride. pp. 311-330.

[44] Ratnam V.D, Ankola D.D, Bhardwaj D.K, Sahana M.N.V. ve Ravi K., (2006). "Role of Antioxidants in Prophylaxis and Therapy: A Pharmaceutical Perspective", Journal of Control Release 113:189-207.

[45] Wootton C.P. ve Ryan L., (2011). "Improving Public Health : The Role of Antioxidant-Rich Fruit and Vegetable Beverages", Food Research,. 44:3135-3148.

[46] Karaman, S., Toker, Ö.S., Öztürk, İ., Yalçın, H., Kayacier, A., Doğan, M. ve Sağdıç, O., (2014). "A Response Surface Methodology Study on the Effects of some Phenolics and Storage Period Length on Vegetable Oil Quality: Change in Oxidation Stability Parameters", Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38: 759-772.

[47] Thomas, R.H., Bernards, M.A., Drake, E.E. ve Guglielmo, G.C., (2010). "Changes in the Antioxidant Activities of Seven Herb- And Spice-Based Marinating Sauces After Cooking", Journal of Food Composite and Analysis, 23:244-252.

[48] Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillag, I., Sevastre, B., Mot, A.C., Silaghi-Dumitrescu, R. ve Tilea, I., (2014). "Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*", Molecules, 19: 5490-5507.

[49] Sağcan, N., (2016). Yeşil Çaydan L-Teanin Ekstraksiyon Optimizasyonu ve Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul

[50] Lebovka, N., Vorobiev, E. ve Chemat, F., (2011). "Enhancing Extraction Processes in the Food Industry", CRC Press.

[51] Ghafoor, K., Park, J. ve Choi, Y.H., (2010). "Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds From Grape (*Vitis labrusca* B.) Peel by

using Response Surface Methodology", Innovative Food Science & Emerging Technologies, 11, 485-490.

[52] Pérez-Jiménez, J. ve Saura-Calixto, F., (2006). "Effect of Solvent and Certain Food Constituents on Different Antioxidant Capacity Assays", Food Research International, 39(7):791-800.

[53] Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A. ve Ibáñez, E., (2010). "Supercritical Fluid Extraction: Recent Advances and Applications", J Chromatogr A 1217(16), 2495-2511.

[54] Wan, H. ve Wong, M., (1996). "Minimization of Solvent Consumption in Pesticide Residue Analysis", J Chromatogr A 754(1), 43-47.

[55] Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F. ve Omar, A., (2013). "Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials", J Food Eng 117(4), 426-436.

[56] Kutlu, N., Yeşilören, G., İşci, A. ve Şakıyan, Ö., (2017). "Konvansiyonel Ekstraksiyona Alternatif: Yeşil Teknolojiler", Gıda Teknoloji Dergisi, 42 (5): 514-526

[57] Chen, M., Zhao, Y. ve Yu, S., (2015). "Optimisation of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Sugar Beet Molasses", Food Chem, 172, 543-550.

[58] Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J. ve Wang, Z., (2007). "Optimization of Ultrasoundassisted Extraction of Anthocyanins in Red Raspberries and İdentification of Anthocyanins in Extract using High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry", Ultrason Sonochem, 14(6), 767-778.

[59] Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q.A. ve Sun, D.W., (2014). "Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolics from Wine Lees: Modeling, Optimization and Stability of Extracts During Storage", Ultrason Sonochem, 21(2), 706-715.

[60] Setyaningsih, W., Saputro, I., Palma, M. ve Barroso, C., (2015). "Optimisation and Validation of The Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Compounds From Rice Grains", Food Chem, 169,141-149.

[61] Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z. ve Liu, H., (2013). "Extraction Characteristics and Optimal Parameters of Anthocyanin from Blueberry Powder under Microwave-Assisted Extraction Conditions", Sep Purif Technol, 104, 17-25.

[62] Garofulic, I.E., Dragovic-Uzelac, V., Jambrak, A.R. ve Jukic, M., (2013). "The Effect of Microwave Assisted Extraction on the Isolation of Anthocyanins and Phenolic Acids from Sour Cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. *marasca*)", J Food Eng, 117(4), 437-442.

[63] Paes, J., Dotta, R., Barbero, G.F. ve Martínez, J., (2014). "Extraction of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Residues using Supercritical CO_2 and Pressurized Liquids", J Supercrit Fluid, 95, 8-16.

[64] Vergara-Salinas, J., Vergara, M., Altamirano, C., Gonzalez, Á. ve Pérez-Correa, J. (2015). "Characterization of Pressurized Hot Water Extracts of Grape Pomace: Chemical and Biological Antioxidant Activity", Food Chem, 171, 62-69.

[65] Álvarez-Casas, M., García-Jares, C., Llompart, M. ve Lores, M., (2014). "Effect of Experimental Parameters in the Pressurized Solvent Extraction of Polyphenolic Compounds from White Grape Marc", Food Chem, 157, 524-532.

[66] Puértolas, E., Cregenzán, O., Luengo, E., Álvarez, I. ve Raso, J., (2013). "Pulsed-Electric-Field-Assisted Extraction of Anthocyanins from Purple-Fleshed Potato", Food Chem, 136(3), 1330-1336.

[67] Lamanauskas, N., Bobinaite, R., Satkauskas, S., Viskelis, P., Pataro, G. ve Ferrari, G., (2015). "Pulsed Electric Field-Assisted Juice Extraction of Frozen/ Thawed Blueberries", Zemdirbyste-Agri, 102(1), 59-66.

[68] Bernardo-Gil, M.G., Roque, R., Roseiro, L.B., Duarte, L.C., Gírio, F. ve Esteves, P., (2011). "Supercritical Extraction of Carob Kibbles (*Ceratonia siliqua* L.)", J Supercrit Fluid, 59, 36-42.

[69] Zaghdoudi, K., Framboisier, X., Frochot, C., Vanderesse, R., Barth, D., Kalthoum-Cherif, J. ve Guiavarch, Y., (2016). "Response Surface Methodology Applied to Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Carotenoids from Persimmon (*Diospyros kaki* L.)", Food Chem, 208, 209-219.

[70] Büyüktuncel, E., (2012). "Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I", Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32 (2): 209- 242.

[71] İlbay, Z., (2016). Turunçgil Meyve Ve Yapraklarının Farklı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Ekstraksiyonu Ve Matematik Modellemesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[72] Luque de Castro, M.D. ve Priego-Capote, F., (2010). "Soxhlet Extraction: Past and Present Panacea", Journal of Chromatography A, 1217, 2383-2389.

[73] Cannell, R.J.P., (1998). "Natural Products Isolation", Humana Press lnc 999 Rtvervtew Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey, 475 s.

[74] Kayahan, M. ve Tekin, A., (2006). "Zeytinyağı Üretim Teknolojisi", TMMOB G›da Mühendisleri Odası, Kitaplar Serisi.15 198.s Ankara.

[75] Handa, S.S., Khanuja, S.P.S., Longo, G. ve Rakesh, D.D., (2008). "Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants", International Centre For Science and High Technology, Trieste, Italy, 266 s.

[76] Luque-Garcia, J.L. ve Castro, M.D.L., (2004). "Ultrasound-Assisted Soxhlet Extraction: An Expeditive Approach for Solid Ample Treatment: Application to the Extraction of Total Fat from Oleaginous Seeds", Journal of Chromatography A, 1034 (1-2), 237-242.

[77] Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F. ve Siebenhandl, S., (2006). "The Application of Response Surface Methodology to The Production of Phenolic

Extracts of Lemon Grass, Galangal, Holy Basil And Rosemary", International Journal of Food Science and Technology, 41: 121-133.

[78] Silva, M., Rogez, H. ve Larondelle, Y., (2007). "Optimization of Extraction of Phenolics from *Inga edulis* Leaves using Response Surface Methodology", Separation and Purification Technology, 55(3): 381- 387.

[79] Pompeu, D. R., Silva, E. M. ve Rogez, H., (2009). "Optimisation of the Solvent Extraction of Phenolic Antioxidants from Fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology", Bioresource Technology, 100, 6076-6082.

[80] Mason, T.J. ve Lorimer, J.P., (2002). "Applied Sonochemistry", Wiley-VCH Verlag GmbH, ISBN 3-527-30205-0.

[81] Halliday, D. ve Resnick, R., (1992). "Fizigin Temelleri-1", (Çeviren: Prof. Dr. Cengiz Yalçın), Arkadaş Kitabevi, 3 baskı, 368-369.

[82] Feng, H., Barbosa-Cánovas, G.V. ve Weiss, J., (2011). "Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing", Springer, New York.

[83] Vinatoru, M., (2001). "An Overview of the Ultrasonically Assisted Extraction of Bioactive Principles From Herbs", Ultrasonics Sonochemistry, 8, 303-313.

[84] Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S. ve Akkaya, Z., (2009). "Bitkisel Ürünlerin Atıklarından Antioksidan Maddelerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu", Gıda Dergisi, 34(3):175-182.

[85] Sevindik, O. ve Selli, S., (2017). "Üzüm Çekirdek Yağı Eldesinde Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri", Gıda Dergisi, 42 (1): 95-103

[86] Blake, J. R. ve Gibson, D.C., (1987). "Cavitation Bubbles Near Boundaries", Annual Review of Fluid Mechanics., 19, 99-123.

[87] İrkilmez, M.U., Başlar, M., Sağdıç, O., Arıcı, M. ve Ertugay, M.F., (2016). "The Effect of Ultrasonic Treatments on Turbidity, Microbial Load, and Polyphenol Oxidase (PPO) Activity of Plum Nectar", Journal of Food Measurement and Characterization, 11: 380-387.

[88] Wang, L. ve Weller, C.L., (2006). "Recent Advanced in Extraction of Nutraceuticals from Plants", Trends in Food Science & Technology, 17: 300-312.

[89] Vieira, G. S., Cavalcanti R. N., Meireles M. A. A. ve Hubinger, M., (2013). "Chemical and Economic Evaluation of Natural Antioxidant Extracts Obtained by Ultrasound Assisted and Agitated Bed Extraction from Jussara Pulp (*Euterpe edulis*)", Journal of Food Engineering, 119(2):196-204.

[90] Wu, H., Zhu, J., Diao, W. ve Wang, C., (2014). "Ultrasound Assisted Enzymatic Extraction and Antioxidant Activity of Polysaccharides from Pumpkin (*Cucurbita moschata*)", Carbohydrate Polymers, 113:314–324.

[91] Gonzalez, R., Serra, F. C., Femenia, A., Rossello, C. ve Simal, S., (2015). "Effect of Power Ultrasound Application on Aqueous Extraction of Phenolic Compunds and Antioxidant Activity from Grape Pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental Kinetics and Modeling", Ultrasonics Sonochemistry, 22, 506-514.

[92] Prakash Maran, J. Manikandan, S. Vigna Nivetha, C. ve Dinesh, R., (2017). "Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from *Nephelium lappaceum* L. fruit peel using central composite face centered response surface design", Arabian Journal of Chemistry, 10: S1145-S1157.

[93] Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguieres, A., Renouard, S., Blondeau, J. P., Ferroud, C., Doussot, J., Laine, E. ve Hano, C., (2015). "Development and Validation of an Efficient Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Flax (*Linum usitatissimum* L.) Seeds", Ultrasonic Sonochemistry, 26: 176- 185

[94] Hossain, M., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana A.B. ve Barry-Ryan C., (2012). "Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Antioxidant Compounds from Marjoram (*Origanum majorana* L.) Using Response Surface Methodology", Ultrasonics Sonochemistry, 19(3):582-590.

[95] Hammi, K. M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H. ve Ksouri, R., (2015). "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidant Compounds From Tunisian *Zizyphus lotus* Fruits Using Response Surface Methodology", Food Chemistry, 184: 80-89.

[96] Rodrigues, S., Pinto, G.A.S. ve Fernandes, F.A.N., (2008). "Optimization of Ultrasound Extraction of Phenolic Compounds from Coconut (*Cocos nucifera*) Shell Powder by Response Surface Methodology", Ultrasonics Sonochemistry, 15, 95-100.

[97] Temur, Ergan, B., (2013). Mikrodalga Destekli Proseslerin Kinetik-Mekanistik-Termodinamik Modellenmesi ve Analizi, Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen bilimleri Enstitüsü, Kocaeli

[98] Mitra, S., (2003). Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, 162, New Jersey,

[99] Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G.M. ve Taylor, D.K., (2011). "Microwave-Assistance Provides very Rapid and Efficient Extraction of Grape Seed Polyphenols", Food Chemistry, 129(2): 570-576.

[100] Konak, Ü.İ., (2009). "Gıda Sanayisinde Mikrodalga Uygulamaları", Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 20-31.

[101] Letellier, M. ve Budzinski, H., (1999). "Microwave Assisted Extraction of Organic Compounds", Analusis, 27(3), 259

[102] Camel, V., (2000). "Microwave-Assisted Solvent Extraction of Environmental Samples", Trac-Trends in Analytical Chemistry, 19(4), 229

[103] Gupta, A., Naraniwal, M. ve Kothari, V., (2012). "Modern Extraction Methods for Preparation of Bioactive Plant Extracts", Int J Appl N Sci, 1(1), 8-26.

[104] Renoe, B.W., (1994). "Microwave-Assisted Extraction", American Laboratory, 26(12), 34

[105] Saim, N., Dean, J.R., Abdullah, M.P. ve Zakaria, Z., (1997). "Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Contaminated Soil Using Soxhlet Extraction, Pressurised and Atmospheric Microwave-Assisted Extraction, Supercritical Fluid Extraction and Accelerated Solvent Extraction", Journal of Chromatography A, 791(1-2), 361

[106] Kaufmann, B. ve Christen, P., (2002). "Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwaveassisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction", Phytochem Anal 13(2), 105-113.

[107] Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H. ve Madani, K., (2015). "Optimization of Microwaveassisted Extraction of Polyphenols from *Myrtus communis* L. Leaves", Food Chem, 166, 585-595.

[108] Svarc-Gajic, J., Stojanovic, Z., Carretero, A.S., Román, D.A., Borrás, I. ve Vasiljevic, I., (2013). "Development of a Microwave-Assisted Extraction for The Analysis of Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*", J Food Eng, 119(3), 525-532.

[109] Roy, R., Close, K. ve Ghosh, D., (2012). "Novel Extraction Technology for Antioxidants and Phytochemicals", Innovation in healthy and functional foods, CRC Press, pp:343-360.

[110] Liazid, A., Palma, M., Brigui, J. ve Barroso, C.G., (2007). "Investigation on Phenolic Compounds Stability During Microwave-assisted Extraction", Journal of Chromatography A, 1140(1-2): 29-34.

[111] Grigoras, C.G., Destandau, E., Zubrzycki, S. ve Elfakir, C., (2012). "Sweet Cherries Anthocyanins: An Environmental Friendly Extraction and Purification Method", Sep Purif Technol, 100, 51-58.

[112] Montgomary, D.C., (2006). "Design and Analysis of Experiments", John Wiley and Sons, New York.

[113] Koç, B. ve Ertekin, F.K., (2010). "Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları", Gıda, 35: 63-70.

[114] Değirmencioğlu, A. ve Yazgı, A., (2006). "Tepki Yüzeyleri Metodolojisi Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları", Tarım Makinaları Bilimi Dergisi, 2 (2): 111-115.

[115] Karasu, S., Kılıçlı, M., Başlar, M., Arıcı, M., Sağdıç, O. ve Karaağaçlı, M., (2015). "Dehydration Kinetics and Changes of Bioactive Compounds of Tulip and Poppy Petals as a Natural Colorant under Vacuum and Oven Conditions", Journal of Food Processing and Preservation, 39: 2096-2106.

[116] Karaman, S., Yılmaz, M.T., Ertugay, M.F., Başlar, M. ve Kayacier, A., (2012). "Effect of Ultrasound Treatment on Steady and Dynamic Shear Properties of Glucomannan Based Salep Dispersions: Optimization of Amplitude Level, Sonication Time and Temperature Using Response Surface Methodology", Ultrason Sonochem, 19: 928-938.

[117] Singleton, V.L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R.M., (1999). “Analysis of Total Phenols and other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent”, Methods in Enzymology, 299, 152–178.

[118] Apak, R., Guçlü, K., Özyürek, M. Ve Karademir, S.E., (2004). “Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C And E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability In The Presence Of Neocuproine: CUPRAC Method”, J Agric Food Chem. 52(26), 7970–7981.

[119] Zhishen, J., Mengcheng, T. ve Jianming, W., (1999). “The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals”, Food Chemistry, 64(4), 555– 559.

[120] Yıldırım, R.M., Özülkü, G., Toker, O.S., Başlar, M., Durak, M.Z. ve Sağdıç, O., (2017). "Modeling of Bioactive Compound Content of Different Tea Bags: Effect of Steeping Temperature and Time", Journal of Food Processing and Preservation, 41.

[121] Erşan, M. ve Açıkel, Ü., (2014). “R. Delemar’ın Asit Fosfataz Üretimi ve Zn (II) Biyobirikiminin Cevap Yüzey Yöntemi Kullanarak Optimize Edilmesi”, Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi, 29 (2):321-329.

[122] Prasad, N. K., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, W. K., Ramanan, N. R., Azlan, A., Ismail, A., (2011). “Response Surface Optimisation for the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacities of Underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. Peels”, Food Chemistry, 128(4), 1121- 1127.

[123] Zuorro, A., Maffei, G. ve Lavecchia, R., (2015). “Reuse Potential of Artichoke (*Cynara Scolimus* L.) Waste for the Recovery of Phenolic Compounds and Bioenergy”, Journal of Cleaner Production, In Press.

[124] Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y. ve Li, X., (2008). “Optimisation of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Wheat Bran”, Food Chemistry, 106, 804-810.

[125] Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y. ve Jo, I. H., (2009). “Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57,4988-4994.

[126] Tabaraki, R. ve Nateghi, A., (2011). “Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from Rice Bran Using Response Surface Methodology”, Ultrasonics Sonochemistry, 18, 1279-1286.

[127] Galvan d’Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, I. ve Dimitrov, K., (2012). “Ultrasound Assisted Extraction of Polyphenols from Black Chokeberry”, Separation and Purification Technology, 93, 42-47.

[128] Rostagno, M.A., Palma, M. ve Barroso, C.G., (2003). “Ultrasound-Assisted Extraction of Soy İsoflavones”, Journal of Chromatography A, 1012, 119-128.

[129] İçyer, N.C., Toker, Ö.S., Karasu, S., Törnük, F., Bozkurt, F., Arıcı, M. ve Sağdıç, O., (2016). "Combined Design as a Useful Statistical Approach to

Extract Maximum Amount of Phenolic Compounds from Virgin Olive Oil Waste", LWT - Food Science and Technology, 70: 24-32.

[130] Pham, H.N.T., Vuong, Q.V., Bowyer, M.C. ve Scarlett, C.J., (2017). "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of *Helicteres hirsuta* Lour. for Enhanced Total Phenolic Compound and Antioxidant Yield", Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 7: 113-123.

[131] Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X. ve Xia, W., (2009). "Optimized Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Acid from *Citrus mandarin* Peels and Evaluation of Antioxidant Activity in Vitro", Seperation and Purification Technology, 70(1): 63- 70.

[132] Bhuyan, D.J., Van Vuong, Q., Chalmers, A.C., van Altena, I.A., Bowyer, M.C. ve Scarlett, C.J., (2015). "Microwave-Assisted Extraction of *Eucalyptus robusta* Leaf for the Optimal Yield of Total Phenolic Compounds", Industrial Crops and Products, 69: 290-299.

[133] Ali, A., Lim, X.Y., Chong, C.H., Mah, S.H. ve Chua, B.L., (2018). "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from *Piper betle* Using Response Surface Methodology", Lwt, 89: 681-688.

[134] Alara, O.R., Abdurahman, N.H. ve Olalere, O.A., (2018). "Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids and Antioxidants from *Vernonia amygdalina* Leaf Using Response Surface Methodology", Food and Bioproducts Processing, 107: 36-48.

[135] Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A.S., Dangles, O. ve Chemat, F., (2010). "Ultrasound-Assisted Extraction of Polyphenols (flavanone glycosides) from Orange (*Citrus sinensis* L.) peel", Food Chemistry 119, 851-858.

[136] Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G. ve Perego, P., (2010). "Extraction of Phenolics from *Vitis vinifera* Wastes Using Non-Conventional Techniques", Journal of Food Engineering 100, 50-55.

[137] Da Porto, C., Porretto, E. ve Decorti, D., (2013). "Comparison of Ultrasound-Assisted Extraction with Conventional Extraction Methods of Oil and Polyphenols from Grape (*Vitis vinifera* L.) Seeds", Ultrasonics Sonochemistry 20, 1076-1080.

[138] Cheng, X.L., Wan, J.Y., Li, P. ve Qi, L.W., (2011). "Ultrasonic/Microwave Assisted Extraction and Diagnostic ion Filtering Strategy by Liquid Chromatographyequadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Flavonoids in *Spatholobus suberectus*", Journal of Chromatography A 1218, 5774-5786.

[139] Pellati, F., Prencipe, F.P., Bertelli, D. ve Benvenuti, S., (2013). "An Efficient Chemical Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids in Raw Propolis by Microwave-Assisted Extraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography Using the Fused-Core Technology", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 81-82, 126-132.

[140] Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z. ve Wang, J., (2009). “Optimised Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids from Folium Eucommiae and Evaluation of Antioxidant Activity in Multi-Test Systems in Vitro”, Food Chemistry 114, 1147-1154.

[141] Zhang, G., He, L. ve Hu, M., (2011). “Optimized Ultrasonic-Assisted Extraction of Flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and Evaluation of Antioxidant Activities in Vitro”, Innovative Food Science & Emerging Technologies 12, 18-25.

[142] Pan, G., Yu, G., Zhu, C. ve Qiao, J., (2012). "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) of Flavonoids Compounds (FC) from Hawthorn Seed (HS)", Ultrason Sonochem, 19: 486-490.

[143] Chebrolu, K.K., Jayaprakasha, G., Jifon, J. ve Patil, B.S., (2011). “Optimization of Flavanones Extraction by Modulating Differential Solvent Densities and Centrifuge Temperatures”, Talanta 85, 353-362.

[144] Rostagno, M.A., Palma, M. ve Barroso, C.G., (2007). “Microwave Assisted Extraction of Soy Isoflavones”, Analytica Chimica Acta 588, 274-282.

[145] Terigar, B., Balasubramanian, S., Boldor, D., Xu, Z., Lima, M. ve Sabliov, C., (2010). “Continuous Microwave-Assisted Isoflavone Extraction System: Design and Performance Evaluation”, Bioresource Technology 101, 2466-2471.

[146] Orsat, V. ve Routray, W., (2017). Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids, ed. Water Extraction of Bioactive Compounds. 221-244.

[147] Xiao, W., Han, L. ve Shi, B., (2008). "Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids from *Radix astragali*", Separation and Purification Technology, 62: 614-618.

[148] Wang, W., Jung, J., Tomasino, E. ve Zhao, Y., (2016). "Optimization of Solvent and Ultrasound-Assisted Extraction for Different Anthocyanin Rich Fruit and Their Effects on Anthocyanin Compositions", LWT-Food Science and Technology, 72: 229-238.

[149] Bonfigli, M., Godoy, E., Reinheimer, M.A. ve Scenna, N.J., (2017). "Comparison Between Conventional and Ultrasound-Assisted Techniques for Extraction of Anthocyanins from Grape Pomace. Experimental Results and Mathematical Modeling", Journal of Food Engineering, 207: 56-72.

[150] İnce, A.E., Şahin, S. ve Sümnü, S.G., (2013). “Extraction of Phenolic Compounds from Melissa Using Microwave and Ultrasound”, Turkish Journal Of Agriculture And Forestry, 37, 6-75.

[151] Kala H.K., Metha R., Sen K.K., Tandey R. ve Mandal V., (2017). “Strategizing Method Optimization of Microwave-assisted Extraction of Plant Phenolics by Developing Standard Working Principles for Universal Robust Optimization”, Analytical Methods, 9, 2089-2103.

[152] Bampouli, A., Kyriakopoulou, K., Papaefstathiou, G., Louli, V., Krokida, M. ve Magoulas, K., (2014). “Comparison of Different Extraction Methods of *Pistacia lentiscus* var. *chia* Leaves: Yield, Antioxidant Activity and Essential Oil Chemical

Composition”, Journal Of Applied Research On Medicinal And Aromatic Plants ,1 (3): 81-91.

[153] Dahmoune, F. Spigno, G. Moussi, K. Remini, H. Cherbal, A. ve Madani, K., (2014). "*Pistacia lentiscus* Leaves as a Source of Phenolic Compounds: Microwave-Assisted Extraction Optimized and Compared with Ultrasound-Assisted and Conventional Solvent Extraction", Industrial Crops and Products, 61: 31-40.

[154] Odabaş, H.İ., (2013). Farklı Yöntemlerle Fındık Zarından Antioksidan Ekstraksiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

[155] He, B., Zhang, L.L., Yue, X.Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X.L. ve Yue, P.X., (2016). "Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds and Anthocyanins from Blueberry (*Vaccinium ashei*) Wine Pomace", Food Chem, 204: 70-76

[156] Caldas, T.W., Mazza, K.E.L., Teles, A.S.C., Mattos, G.N., Brígida, A.I.S., Conte-Junior, C.A., Borguini, R.G., Godoy, R.L.O., Cabral, L.M.C. ve Tonon, R.V., (2018). "Phenolic Compounds Recovery from Grape Skin Using Conventional and Non-Conventional Extraction Methods", Industrial Crops and Products, 111: 86-91.

[157] Pedro, A.C. Moreira, F. Granato, D. ve Rosso, N.D., (2016). "Extraction of Bioactive Compounds and Free Radical Scavenging Activity of Purple Basil (*Ocimum basilicum* L.) Leaf Extracts as Affected by Temperature and Time", An Acad Bras Cienc, 88: 1055-1068.

[158] Yesiloglu, Y. ve Sit, L., (2012). "Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts from Purple Basil", Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 95: 100-106.

[159] Cheung, L., Cheung, P.C.K. ve Ooi, V.E.C., (2003). “Antioxidant Activity and Total Phenolics of Edible Mushroom Extracts”, Food Chemistry, 81, 249-255.

[160] Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. ve van Beek, T. A., (2004). “Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts”, Food Chemistry, 85, 231-237.

[161] Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R. ve Anelli, G., (2008). “Extraction of Natural Antioxidants from Hazelnut (*Corylus avellana* L.) Shell and Skin Wastes by Long Maceration at Room Temperature”, Food Chemistry, 110, 659-669.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Başak Ebru KOCAMAZ ÖZCAN

Doğum Tarihi ve Yeri :01.03.1990 , Osmaniye

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :b.e.kocamaz@yandex.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Gıda Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2018
Lisans	Gıda Mühendisliği	Hacettepe Üniversitesi	2015
Lise	Fen Bilimleri	Osmaniye Merkez Anadolu Lisesi	2008

YAYINLARI

Bildiri

1. Kocamaz, B.E., Sağdıç, O. ve Karasu, S., (2018). “Optimization of the Parameters of Microwave (MAE) and Ultrasound Assisted (UAE) Extraction of Purple Basil Leaf Phenolics”, International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 11-13 April 2018, Antalya.

2. Kocamaz, B.E. ve Sağdıç, O., (2018). “Curcumin as a Natural Food Coloring”, International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 11-13 April 2018, Antalya.

3. Kocamaz, B.E., Sağdıç, O. ve Şanlıdere Aloğlu, H., (2017). “Applied Novel Techniques in Extraction of Bioactive Compounds”, 8th The International Advanced Technologies Symposium, 19-21 October 2017, Elazığ.

4. Kocamaz, B. E., Şanlıdere Aloğlu, H. ve Sağdıç, O., (2017). “Fortification of Foods with Encapsulated Iron”, 8th The International Advanced Technologies Symposium, 19-21 October 2017, Elazığ.

ÖDÜLLERİ

1. “Applied Novel Techniques in Extraction of Bioactive Compounds” adlı bildiri ile The International Advanced Technologies (IATS17) sempozyumunda en iyi poster ödülü.