



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**MEYVE SUYU ENDÜSTRİSİ YAN ÜRÜNLERİNDEN YÜKSEK
KATMA DEĞERLİ ÜRÜNLERİN GERİ KAZANIMI**

Ebru KURTULBAŞ ŞAHİN

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet BİLGİN**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ**

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Programı

İSTANBUL-2021

Bu çalışma, 22.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Temel İşlemler ve Termodinamik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Mehmet BİLGİN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Şah İsmail KIRBAŞLAR
İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. İsmail İNCİ
İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Şahika Sena BAYAZİT
Beykent Üniversitesi
Mühendislik- Mimarlık Fakültesi

Prof. Dr. Fatma Jale GÜLEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa’nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 33900 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Bu tez, 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora çalışmalarım süresince, çalışmalarımın gerçekleştirilmesi için desteğini ve yardımlarını esirgemeyen hocam, danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet BİLGİN' e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın başlangıcından en son aşamasına kadar maddi ve manevi yanımda olan, tüm bilgi ve birikimini paylaşan, akademik olarak kendimi geliştirebilmem için bilimsel çalışmalara teşvik ve dahil eden, ne kadar yoğun olursa olsun bana her zaman vakit ayıran, neşesini, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen değerli hocam, danışmanım Doç.Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ' ye en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Değerli görüşleri ile araştırmalarımı yönlendiren, tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Şah İsmail KIRBAŞLAR ve Prof. Dr. Şahika Sena BAYAZİT'e,

Doktora çalışmalarım sırasında sağlanan burs için TÜBİTAK BİDEB'e,

Sanatçı kimliği ile bildiri tasarımlarıma destek olan Abdullah SEVGİLİ' ye,

Çalışmalarım süresince hem deneysel anlamda hem manevi anlamda destekçim olan sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. İrem TOPRAKÇI YÜKSEL, Özge GÜLMEZ ve yüksek lisans öğrencisi Ayşe Gizem PEKEL'e,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemedi beni yetiştiren, eğitimimi her zaman ilk sırada tutan, bana inanan ve güvenen annem Güldane KURTULBAŞ, babam Orhan KURTULBAŞ ve ağabeyim Erdem KURTULBAŞ'a,

Doktora dönemimin her anında yanımda olan, stresli ve yoğun çalışmalarım sırasında sabrını esirgemeyen, beni her zaman motive eden en büyük destekçim, canım eşim Mehmet Yavuz ŞAHİN'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2021

Ebru KURTULBAŞ ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xvii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xxii
ÖZET	xxv
SUMMARY	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. FİTOKİMYASALLAR	4
2.1.1. Fenolik Bileşikler	4
2.1.1.1. Fenolik Asitler	5
2.1.1.2. Flavonoidler	7
2.1.1.3. Antosiyaninler	8
2.1.2. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitesi	10
2.1.2.1. Serbest Radikaller	10
2.1.2.2. Antioksidanlar	11
2.1.3. Gıda Kaynaklı Fenolik Bileşikler	14
2.2. VIŞNE	15
2.2.1. Vişne Meyvesinin Kökeni	15
2.2.2. Vişne Meyvesi ve Üretimi	16
2.2.3. Vişne Meyvesinin Fenolik Madde İçeriği	17
2.3. ŞEFTALİ	18
2.3.1. Şeftali Meyvesinin Kökeni	18
2.3.2. Şeftali Meyvesi ve Üretimi	19
2.3.3. Şeftali Meyvesinin Fenolik İçeriği	20
2.4. FENOLİK BİLEŞİKLERİN EKSTRAKSİYONU	21
2.4.1. Sokslet Ekstraksiyonu	21
2.4.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	22
2.4.2.1. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonun Çalışma Prensibi	23

2.4.2.2.	<i>Fenolik Maddelerin Özütlemeğinde Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonun Kullanımı</i>	26
2.4.3.	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	28
2.4.3.1.	<i>Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Çalışma Prensipleri</i>	29
2.4.3.2.	<i>Fenolik Maddelerin Özütlemeğinde Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Kullanımı</i>	31
2.4.4.	Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon	34
2.4.4.1.	<i>Homojenizatör Destekli Ekstraksiyonun Çalışma Prensipleri</i>	34
2.4.4.2.	<i>Fenolik Maddelerin Özütlemeğinde Homojenizatör Destekli Ekstraksiyonun Kullanımı</i>	35
2.4.5.	Otomatik Çözücü Destekli Ekstraksiyon	38
2.4.5.1.	<i>Otomatik Çözücü Ekstraksiyonunun Çalışma Prensipleri</i>	38
2.4.5.2.	<i>Fenolik Maddelerin Özütlemeğinde Otomatik Çözücü Ekstraksiyonunun Kullanımı</i>	40
2.5.	FENOLİK BİLEŞİKLER İÇİN ÇEŞİTLİ TAYİN YÖNTEMLERİ	41
2.5.1.	Spektrofotometrik Yöntemler	41
2.5.1.1.	<i>Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemi</i>	42
2.5.1.2.	<i>Toplam Antosiyanin Tayin Yöntemi</i>	43
2.5.1.3.	<i>Antioksidan Kapasitesinin Tayin Yöntemi – DPPH</i>	46
2.5.1.4.	<i>Antioksidan Kapasitesinin Tayin Yöntemi – CUPRAC</i>	47
2.5.1.5.	<i>Antioksidan Kapasitesinin Tayin Yöntemi – ABTS</i>	48
2.5.2.	Kromatografik Yöntem	49
2.5.2.1.	<i>Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – HPLC</i>	49
2.6.	DENEYSEL TASARIM VE YANIT YÜZEY METODU	51
2.6.1.	Deneysel Tasarım	51
2.6.2.	Yanıt Yüzey Metodu (YYM)	52
2.6.2.1.	<i>Merkezi Bileşik Tasarım</i>	53
2.6.2.2.	<i>Box - Behnken Tasarımı (BBD)</i>	55
2.7.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	56
3.	MALZEME VE YÖNTEM	58
3.1.	BİTKİSEL MATERYAL	58
3.2.	KİMYASAL MALZEMELER	58
3.3.	EKSTRAKSİYON	60
3.3.1.	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Denemeleri	60
3.3.2.	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Denemeleri	61
3.3.3.	Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon Denemeleri	62

3.3.4.	Otomatik Çözücü Ekstraksiyonu Denemeleri	63
3.4.	ANALİZLER	65
3.4.1.	Spektrofotometrik Analizler	65
3.4.1.1.	<i>Toplam Fenolik Madde Tayini</i>	65
3.4.1.2.	<i>Toplam Antosiyanin Tayini</i>	65
3.4.1.3.	<i>Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi – DPPH</i>	66
3.4.1.4.	<i>Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi – CUPRAC</i>	67
3.4.1.5.	<i>Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi – ABTS</i>	68
3.4.2.	Kromatografik Analiz.....	68
3.4.2.1.	<i>Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – HPLC</i>	68
3.4.3.	Morfolojik Analiz	70
3.4.3.1.	<i>Taramalı Elektron Mikroskobu – SEM</i>	70
3.5.	DENEYSEL TASARIM VE YANIT-YÜZEY YÖNTEMİ.....	70
3.6.	İSTATİSTİKSEL TASARIM	71
4.	BULGULAR	72
4.1.	VİŞNE YAN ÜRÜNLERİNE UYGULANAN EKSTRAKSİYON ÇALIŞMALARI	72
4.1.1.	Yan Ürünlerin Karşılaştırmalı Sonuçları	72
4.1.2.	Mikroalga Destekli Ekstraksiyon	74
4.1.2.1.	<i>Ön Denemeler</i>	74
4.1.2.2.	<i>Proses Parametrelerinin Etkisi</i>	75
4.1.2.3.	<i>Modelleme</i>	80
4.1.2.4.	<i>Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları</i>	84
4.1.2.5.	<i>Biyoaktif İçeriğin Değerlendirilmesi</i>	85
4.1.3.	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	88
4.1.3.1.	<i>Ön Denemeler</i>	88
4.1.3.2.	<i>Proses Parametrelerinin Etkisi</i>	89
4.1.3.3.	<i>Modelleme</i>	94
4.1.3.4.	<i>Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları</i>	97
4.1.4.	Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon	99
4.1.4.1.	<i>Ön Denemeler</i>	99
4.1.4.2.	<i>Proses Parametrelerinin Etkisi</i>	100
4.1.4.3.	<i>Modelleme</i>	107
4.1.4.4.	<i>Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları</i>	111
4.1.5.	Otomatik Çözücü Ekstraksiyonu	113

4.1.5.1.	<i>Ön Denemeler</i>	113
4.1.5.2.	<i>Proses Parametrelerinin Etkisi</i>	113
4.1.5.3.	<i>Modelleme</i>	120
4.1.5.4.	<i>Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları</i>	124
4.1.6.	Karşılaştırmalı Sonuçlar	126
4.1.7.	Morfolojik Çalışmalar	128
4.1.8.	Stabilite Çalışmaları	130
4.1.8.1.	<i>MDE Yöntemiyle Elde Edilen Vişne Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi</i>	130
4.1.8.2.	<i>UDE Yöntemiyle Elde Edilen Vişne Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi</i>	132
4.1.8.3.	<i>HAE Yöntemiyle Elde Edilen Vişne Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi</i>	134
4.1.8.4.	<i>OÇE Yöntemiyle Elde Edilen Vişne Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi</i>	136
4.2.	ŞEFTALİ YAN ÜRÜNLERİNE UYGULANAN EKSTRAKSİYON ÇALIŞMALARI	139
4.2.1.	Yan Ürünlerin Karşılaştırmalı Sonuçları	139
4.2.2.	Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	140
4.2.2.1.	<i>Proses Parametrelerinin Etkisi</i>	140
4.2.2.2.	<i>Modelleme</i>	145
4.2.2.3.	<i>Optimizasyon ve Validasyon</i>	149
4.2.3.	Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon	150
4.2.3.1.	<i>Proses Parametrelerinin Etkisi</i>	150
4.2.3.2.	<i>Modelleme</i>	154
4.2.3.3.	<i>Optimizasyon ve Validasyon</i>	158
4.2.4.	Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon	159
4.2.4.1.	<i>Proses Parametrelerinin Etkisi</i>	159
4.2.4.2.	<i>Modelleme</i>	166
4.2.4.3.	<i>Optimizasyon ve Validasyon</i>	170
4.2.5.	Otomatik Çözücü Ekstraksiyonu	171
4.2.5.1.	<i>Proses Parametrelerinin Etkisi</i>	171
4.2.5.2.	<i>Modelleme</i>	178
4.2.5.3.	<i>Optimizasyon ve Validasyon</i>	182
4.2.5.4.	<i>Biyoaktif İçeriğin Değerlendirilmesi</i>	183
4.2.6.	Karşılaştırmalı Sonuçlar	186

4.2.7. Morfolojik Çalışmalar	188
4.2.8. Stabilité Çalışmaları	190
4.2.8.1. MDE Yöntemiyle Elde Edilen Şeftali Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi.....	190
4.2.8.2. UDE Yöntemiyle Elde Edilen Şeftali Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi.....	192
4.2.8.3. HDE Yöntemiyle Elde Edilen Şeftali Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi.....	194
4.2.8.4. OÇE Yöntemiyle Elde Edilen Şeftali Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi.....	196
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	199
KAYNAKLAR.....	209
EKLER	223
Ek 1. MDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş vişne kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu.....	223
Ek 2. UDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş vişne kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu.....	224
Ek 3. HDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş vişne kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu.....	225
Ek 4. OÇE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş vişne kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu.....	226
Ek 5. MDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş şeftali kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -Kumarik asit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -Kumarik asit konsantrasyonu.....	227
Ek 6. UDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş şeftali kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -Kumarik asit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -Kumarik asit konsantrasyonu.....	228
Ek 7. HDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş şeftali kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -Kumarik asit konsantrasyonu (b)	

Depolama sonundaki <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -Kumarik asit konsantrasyonu.	229
Ek 8. OÇE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş şeftali kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri:	
(a) Başlangıç <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -Kumarik asit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki <i>p</i> -Hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -Kumarik asit konsantrasyonu.	230
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: Fitokimyasalların sınıflandırılması.	4
Şekil 2.2: Fenolik asit türleri.	6
Şekil 2.3: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.	7
Şekil 2.4: Antosiyaninlerin genel moleküler yapısı.	9
Şekil 2.5: En yaygın antosiyanidin türleri.	9
Şekil 2.6: Antioksidanların sınıflandırılması.	13
Şekil 2.7: İllere göre Türkiye’ de vişne üretimi (2019).	17
Şekil 2.8: İllere göre Türkiye’ de şeftali üretimi (2019).	20
Şekil 2.9: Sokslet Ekstraktörü.	22
Şekil 2.10: Elektromanyetik spektrum.	24
Şekil 2.11: Kavitasyon oluşumu.	30
Şekil 2.12: Rotor- stator homojenizatör (Kano ve diğerleri, 2016).	35
Şekil 2.13: Otomatik çözücü ekstraksiyonu proses aşamaları (“SER 158 Series Automatic Solvent Extractor”, 2021).	39
Şekil 2.14: Spektrofotometre çalışma prensibi.	42
Şekil 2.15: pH 1.0 ve pH 4.5 tamponlarında saflaştırılmış turp antosiyaninlerinin (asillenmiş pelargonidin-3-soforozit-5-glukozit türevleri) spektral özellikleri.	44
Şekil 2.16: Farklı pH seviyelerinde bulunan antosiyaninlerin baskın yapısal formları.	45
Şekil 2.17: DPPH· radikalinin kimyasal yapısı ve AH ile gerçekleşen bir süpürme reaksiyonu.	47
Şekil 2.18: Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH) _n) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatinin oluşumu.	48
Şekil 2.19: ABTS ⁺ radikalinin kimyasal yapısı ve AH ile gerçekleşen bir süpürme reaksiyonu.	49
Şekil 2.20: HPLC şeması.	50

Şekil 2.21: (a) iki değişken ($\alpha= 1.41$) ve (b) üç değişken ($\alpha= 1.68$) optimizasyonu için merkezi bileşik tasarımı (●) Faktöriyel tasarım noktaları, (○) eksenel noktalar ve (□) merkez nokta.	53
Şekil 2.22: Tüm değişkenlerin üç seviyede incelenmesine dayanan deneysel tasarımlar: (a) iki değişken ve (b) üç değişkenin optimizasyonu için üç seviyeli faktör tasarımı ve (c) üç değişkenin optimizasyonu için Box – Behnken tasarımı.	55
Şekil 3.1: Vişne ve şeftali meyvesi.	58
Şekil 3.2: Vişne ve şeftali yan ürünlerinin ekstraksiyonu için MDE sistemi.....	61
Şekil 3.3: Vişne ve şeftali yan ürünlerinin ekstraksiyonu için UDE sistemi.	62
Şekil 3.4: Vişne ve şeftali yan ürünlerinin ekstraksiyonu için HDE sistemi.	63
Şekil 3.5: Vişne ve şeftali yan ürünlerinin ekstraksiyonu için OÇE sistemi.	64
Şekil 4.1: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, EtOH çözücü konsantrasyonunun ekstraksiyon süresine (Mikrodalga gücü= 500W) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	78
Şekil 4.2: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, EtOH çözücü konsantrasyonunun mikrodalga gücüne göre bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği (Ekstraksiyon süresi = 90 s).	79
Şekil 4.3: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin mikrodalga gücüne göre bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği (Çözücü konsantrasyonu = % 80, v/v).	80
Şekil 4.4: Vişne kabuklarına uygulanan MDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.	84
Şekil 4.5: MDE ile hazırlanan vişne kabuğu ekstraktının TFM ile TA değerleri arasındaki ilişki.....	85
Şekil 4.6: MDE ile hazırlanan vişne kabuğu ekstraktının a) TFM ile DPPH, b) TFM ile ABTS, c) TFM ile CUPRAC, d) TA ile DPPH, e) TA ile ABTS, f) TA ile CUPRAC, g) DPPH ile CUPRAC, h) DPPH ile ABTS, ı) CUPRAC ile ABTS değerleri arasındaki ilişkisi.	88
Şekil 4.7: Vişne kabuklarına uygulanan UDE metodunda ekstraksiyon süresinin belirlenmesi.	89
Şekil 4.8: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, genlik değerinin katı madde miktarına (Çözücü konsantrasyonu= % 80, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	92
Şekil 4.9: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, genlik değerinin çözücü konsantrasyonuna (Katı madde miktarı=0,1) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	93

Şekil 4.10: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının çözücü konsantrasyonuna (Genlik= % 34,34) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	94
Şekil 4.11: Vişne kabuklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.	97
Şekil 4.12: Vişne kabuklarına uygulanan HDE metodunda karıştırma hızının TFM üzerine etkisi.	99
Şekil 4.13: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, karıştırma hızına (Ekstraksiyon süresi= 75 s, çözücü konsantrasyonu= % 40, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	104
Şekil 4.14: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, çözücü konsantrasyonuna (Ekstraksiyon süresi= 75 s, karıştırma hızı= 10000 rpm) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	105
Şekil 4.15: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, karıştırma hızının, ekstraksiyon süresine (Çözücü konsantrasyonu= %40, v/v, katı madde miktarı=0,1 g) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	106
Şekil 4.16: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin, çözücü konsantrasyonuna (Karıştırma hızı= 10000 rpm, katı madde miktarı=0,1 g) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	107
Şekil 4.17: Vişne kabuklarına uygulanan HDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.	111
Şekil 4.18: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, yıkama süresinin, daldırma süresine (Katı madde miktarı= 0,47 g, çözücü konsantrasyon = %80, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	117
Şekil 4.19: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, çözücü konsantrasyonunun, daldırma süresine (Katı madde miktarı=0,47 g, yıkama süresi =52,27 dk) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	118
Şekil 4.20: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, yıkama süresine (Daldırma süresi=23,83 dk, çözücü konsantrasyonu=%80, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	119
Şekil 4.21: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, çözücü konsantrasyonunun, katı madde miktarına (daldırma süresi=23,83 dk, yıkama süresi=52, 27 dk) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	120
Şekil 4.22: Vişne kabuklarına uygulanan OÇE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.	124
Şekil 4.23: Ekstraksiyon işlemleri önces vişne kabuğunun morfolojik yapısı.	128

Şekil 4.24: Ekstraksiyon işlemi sonrası vişne kabuğu morfolojik yapısı (a): MDE, (b): UDE, (c) HDE, (d) OÇE.....	129
Şekil 4.25: MDE yöntemiyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b) ve siyanidin-3-glukozit (c).....	132
Şekil 4.26: UDE yöntemiyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b) ve siyanidin-3-glukozit (c).....	134
Şekil 4.27: HDE yöntemiyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b) ve siyanidin-3-glukozit (c).....	136
Şekil 4.28: OÇE yöntemiyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b) ve siyanidin-3-glukozit (c).....	138
Şekil 4.29: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin EtOH çözücü konsantrasyonuna (Mikrodalga gücü= 500W) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	143
Şekil 4.30: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, EtOH çözücü konsantrasyonunun mikrodalga gücüne göre bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği (Ekstraksiyon süresi = 90 s).	144
Şekil 4.31: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin mikrodalga gücüne göre bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği (Çözücü konsantrasyonu = % 80, v/v).	145
Şekil 4.32: Şeftali kabuklarına uygulanan MDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.	149
Şekil 4.33: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, genlik değerinin katı madde miktarına (Çözücü konsantrasyonu= % 80, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	152
Şekil 4.34: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, genlik değerinin çözücü konsantrasyonuna (Katı madde miktarı=0,1) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	153
Şekil 4.35: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının çözücü konsantrasyonuna (Genlik= % 26,6) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	154
Şekil 4.36: Şeftali kabuklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.	158
Şekil 4.37: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, karıştırma hızına (Ekstraksiyon süresi= 80 s, çözücü konsantrasyonu= % 20, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	163

Şekil 4.38: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, çözücü konsantrasyonuna (Ekstraksiyon süresi= 80 s, karıştırma hızı= 6000 rpm) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	164
Şekil 4.39: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, karıştırma hızının, ekstraksiyon süresine (Çözücü konsantrasyonu= %20, v/v, katı madde miktarı=0,1 g) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	165
Şekil 4.40: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin, çözücü konsantrasyonuna (Karıştırma hızı= 6000 rpm, katı madde miktarı=0,1 g) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	166
Şekil 4.41: Şeftali kabuklarına uygulanan HDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.	170
Şekil 4.42: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, yıkama süresinin, daldırma süresine (Katı madde miktarı= 0,110 g, çözücü konsantrasyon = %75, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	175
Şekil 4.43: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, çözücü konsantrasyonunun, daldırma süresine (Katı madde miktarı=0,110 g, yıkama süresi =48,5 dk) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	176
Şekil 4.44: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, yıkama süresine (Daldırma süresi=25,4 dk, çözücü konsantrasyonu=%75, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	177
Şekil 4.45: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, çözücü konsantrasyonunun, katı madde miktarına (daldırma süresi=25,4 dk, yıkama süresi=48,5 dk) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.	178
Şekil 4.46: Şeftali kabuklarına uygulanan OÇE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.	182
Şekil 4.47: OÇE ile hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktının TFM ile TA değerleri arasındaki ilişki.	184
Şekil 4.48: OÇE ile hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktının a) TFM ile DPPH, b) TFM ile CUPRAC, c) TFM ile ABTS, d) TA ile DPPH, e) TA ile CUPRAC, f) TA ile ABTS, g) DPPH ile CUPRAC, h) DPPH ile ABTS, ı) CUPRAC ile ABTS değerleri arasındaki ilişkisi.	186
Şekil 4.49: Ekstraksiyon işlemleri öncesi şeftali kabuğunun morfolojik yapısı.	189
Şekil 4.50: Ekstraksiyon işlemi sonrası şeftali kabuğu morfolojik yapısı (a): MDE, (b): UDE, (c) HDE, (d) OÇE.	189
Şekil 4.51: MDE yöntemiyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b), <i>p</i> - kumarik asit (c) ve <i>p</i> - hidroksibenzoik asit (d) değerlerinin değişimi.	192

Şekil 4.52: UDE yöntemiyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b), <i>p</i> - kumarik asit (c) ve <i>p</i> - hidroksibenzoik asit (d) değerlerinin değişimi.	194
Şekil 4.53: HDE yöntemiyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b), <i>p</i> - kumarik asit (c) ve <i>p</i> - hidroksibenzoik asit (d) değerlerinin değişimi.	196
Şekil 4.54: OÇE yöntemiyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b), <i>p</i> - kumarik asit (c) ve <i>p</i> - hidroksibenzoik asit (d) değerlerinin değişimi.	198



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Dünya şeftali/ nektari üretimi (FAO, 2021).	19
Tablo 2.2: MDE' de yaygın olarak kullanılan bazı çözücüler için fiziksel sabitler ve yayılma faktörleri.	25
Tablo 3.1: Kimyasal malzemelerin CAS numaraları, tedarikçileri ve saflık özellikleri (101.33 kPa).	59
Tablo 3.2: MDE yoluyla vişne ve şeftali kabuklarına uygulanan yanıt-yüzey metodunda optimizasyon için kullanılan parametreler ve seviyeleri.	60
Tablo 3.3: UDE yoluyla vişne ve şeftali kabuklarına uygulanan yanıt-yüzey metodunda optimizasyon için kullanılan parametreler ve seviyeleri.	62
Tablo 3.4: HDE yoluyla vişne ve şeftali kabuklarına uygulanan yanıt-yüzey metodunda optimizasyon için kullanılan parametreler ve seviyeleri.	63
Tablo 3.5: OÇE yoluyla vişne ve şeftali kabuklarına uygulanan yanıt-yüzey metodunda optimizasyon için kullanılan parametreler ve seviyeleri.	64
Tablo 3.6: Spesifik polifenollerin analiz koşulları için HPLC gradient programı.	69
Tablo 4.1: Vişne yan ürünlerine uygulanan MDE sonucundaki biyoaktif özellikler*.	72
Tablo 4.2: Vişne kabuklarına uygulanan MDE ön denemeleri*.	74
Tablo 4.3: Vişne kabuklarına uygulanan MDE metodunun deneysel tasarımı.	76
Tablo 4.4: Vişne kabuklarına uygulanan MDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.	77
Tablo 4.5: MDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.	81
Tablo 4.6: MDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TA için ANOVA analizi.	81
Tablo 4.7: MDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.	83
Tablo 4.8: Vişne kabuklarının MDE için optimum koşullar ve validasyon.	84

Tablo 4.9: Vişne yapraklarına uygulanan MDE ile elde edilen ekstraktların DPPH, CUPRAC ve ABTS testleri ile ölçülen antioksidan aktivite değerlerinin karşılaştırmalı sonuçları*.....	86
Tablo 4.10: Vişne kabuklarına uygulanan UDE metodunun deneysel tasarımı.....	90
Tablo 4.11: Vişne kabuklarına uygulanan UDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.....	91
Tablo 4.12: UDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.....	94
Tablo 4.13: UDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.....	95
Tablo 4.14: UDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.....	97
Tablo 4.15: Vişne kabuklarının UDE için optimum koşullar ve validasyon.....	98
Tablo 4.16: Vişne kabuklarına uygulanan HDE metodunun deneysel tasarımı.....	100
Tablo 4.17: Vişne kabuklarına uygulanan HDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.....	102
Tablo 4.18: HDE yöntemi kullanılarak vişne yapraklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.....	107
Tablo 4.19: HDE yöntemi kullanılarak vişne yapraklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.....	109
Tablo 4.20: HDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.....	110
Tablo 4.21: Vişne kabuklarının HDE için optimum koşullar ve validasyon.....	112
Tablo 4.22: Vişne kabuklarına uygulanan OÇE ön denemeleri*.....	113
Tablo 4.23: Vişne kabuklarına uygulanan OÇE metodunun deneysel tasarımı.....	114
Tablo 4.24: Vişne kabuklarına uygulanan OÇE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.....	115
Tablo 4.25: OÇE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.....	120
Tablo 4.26: OÇE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.....	122
Tablo 4.27: OÇE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.....	123

Tablo 4.28: Vişne kabuklarının OÇE için optimum koşullar ve validasyonu.	125
Tablo 4.29: MDE, UDE, HDE ve OÇE yöntemleriyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının TFM, TA ve siyanidin-3-glukozit değerlerinin karşılaştırılması*.	127
Tablo 4.30: MDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış vişne kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA ve Siyanidin-3-glukozit değerleri.	131
Tablo 4.31: UDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış vişne kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA ve Siyanidin-3-glukozit değerleri.	133
Tablo 4.32: HDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış vişne kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA ve Siyanidin-3-glukozit değerleri.	135
Tablo 4.33: OÇE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış vişne kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA ve Siyanidin-3-glukozit değerleri.	137
Tablo 4.34: Şeftali yan ürünlerine uygulanan MDE sonucundaki biyoaktif özellikler*.	139
Tablo 4.35: Şeftali kabuklarına uygulanan MDE metodunun deneysel tasarımı.	140
Tablo 4.36: Şeftali kabuklarına uygulanan MDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.	141
Tablo 4.37: MDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.	146
Tablo 4.38: MDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TA için ANOVA analizi.	146
Tablo 4.39: MDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.	148
Tablo 4.40: Şeftali kabuklarının MDE için optimum koşullar ve validasyon.	149
Tablo 4.41: Şeftali kabuklarına uygulanan UDE metodunun deneysel tasarımı.	150
Tablo 4.42: Şeftali kabuklarına uygulanan UDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.	151
Tablo 4.43: UDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.	155
Tablo 4.44: UDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.	155

Tablo 4.45: UDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.	157
Tablo 4.46: Şeftali kabuklarının UDE için optimum koşullar ve validasyon.....	158
Tablo 4.47: Şeftali kabuklarına uygulanan HDE metodunun deneysel tasarımı.....	159
Tablo 4.48: Şeftali kabuklarına uygulanan HDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.	160
Tablo 4.49: HDE yöntemi kullanılarak şeftali yapraklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.	166
Tablo 4.50: HDE yöntemi kullanılarak şeftali yapraklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.	167
Tablo 4.51: HDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.	170
Tablo 4.52: Şeftali kabuklarının HDE için optimum koşullar ve validasyon.....	171
Tablo 4.53: Şeftali kabuklarına uygulanan OÇE metodunun deneysel tasarımı.	172
Tablo 4.54: Şeftali kabuklarına uygulanan OÇE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.	173
Tablo 4.55: OÇE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.	178
Tablo 4.56: OÇE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.	179
Tablo 4.57: OÇE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.	182
Tablo 4.58: Şeftali kabuklarının HDE için optimum koşullar ve validasyon.....	183
Tablo 4.59: Şeftali yapraklarına uygulanan OÇE ile elde edilen ekstraktların DPPH, CUPRAC ve ABTS testleri ile ölçülen antioksidan aktivite değerlerinin karşılaştırmalı sonuçları*.....	184
Tablo 4.60: MDE, UDE, HDE ve OÇE yöntemleriyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının TFM, TA ve siyanidin-3-glukozit değerlerinin karşılaştırılması.	187
Tablo 4.61: MDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış şeftali kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -kumarik asit değerleri*.....	191
Tablo 4.62: UDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış şeftali kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -kumarik asit değerleri.....	193

Tablo 4.63: HDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış şeftali kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -kumarik asit değerleri.....	195
Tablo 4.64: OÇE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış şeftali kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit ve <i>p</i> -kumarik asit değerleri.....	197



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
° C	: Derece santigrat
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
·OH	: Hidroksil radikali
3D	: 3 boyutlu
ArOH	: Antioksidan
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
H ² O ²	: Hidrojen peroksit
kHz	: Kilohertz
kPa	: Kilopaskal
kV	: Kilovolt
M	: Molar
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
n	: Deney tekrarlarının sayısı
nm	: Nanometre
NO·	: Nitrik oksit radikali
O ₂ · ⁻	: Süperoksit anyon radikali
O ₂ · [·]	: Oksijen radikali
<i>p</i>	: Olasılık
<i>r</i>	: Korelasyon katsayısı
R·	: Radikal
R ²	: Belirtme katsayısı
R ² _a	: Ayarlanmış korelasyon katsayısı
R ² _t	: Tahmin edilen korelasyon sayısı
rpm	: Dakika başına devir

s	: Saniye
tan δ	: Dağılma faktörüne
v/v	: Hacimce yüzde
W	: Watt
w/v	: Ağırlık-hacim yüzde
Xi	: Kodlanmamış faktörü
β₀	: Sabit
β_i	: Lineer etki katsayısı
β_{ii}	: İkinci dereceden kuvvetin etki katsayısı
β_{ij}	: Etkileşim katsayısı
ε'	: Dielektrik sabiti
ε''	: Dielektrik kaybı
σ	: Standart sapma

Kısaltmalar

Açıklama

ANOVA	: Varyans analizi
ASE	: Automatic solvent extraction
BBD	: Box-Behnken tasarımı
BHA	: Butillenmiş hidroksianisol
BHT	: Butillenmiş hidroksitoluen
CCD	: Merkezi bileşik tasarım
CUPRAC	: Bakır iyon indirgeyici antioksidan kapasite
CV	: Varyasyon katsayısı
DAD	: Diyot dizisi dedektörü
DG	: Dodesil gallat
EtOH	: Etanol
FCR	: Folin Ciocalteu reaktifi
FSC	: Gıda tedarik zinciri
GAE	: Gallik asit ekivalenti
HAE	: Homogenizer assisted extraction
HCl	: Hidroklorik asit
HDE	: Homojenizatör destekli ekstraksiyon
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
MAE	: Microwave assisted extraction

MDE	:	Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MeOH	:	Metanol
MW	:	Moleküler ağırlığı
OÇE	:	Otomatik çözücü ekstraksiyonu
OFAT	:	One-factor-at-a-time
OG	:	Oktil gallat
PG	:	Propil gallat
RNT	:	Reaktif nitrojen türleri
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
RSM	:	Response surface methodology
SD	:	Standart sapma
SE	:	Sokslet ekstraksiyonu
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
TA	:	Toplam antosiyanin
TBHQ	:	Üçüncül butilhidrokinondur
TEAC	:	Trolox eşdeğeri
TFM	:	Toplam fenolik madde
UDE	:	Ultrasonik destekli ekstraksiyon
UAE	:	Ultrasonic assisted extraction
YM	:	Yaş madde
YMK	:	Yüzey merkezli kompozit
YYM	:	Yanıt yüzey metodolojisi

ÖZET

DOKTORA TEZİ

MEYVE SUYU ENDÜSTRİSİ YAN ÜRÜNLERİNDEN YÜKSEK KATMA DEĞERLİ ÜRÜNLERİN GERİ KAZANIMI

Ebru KURTULBAŞ ŞAHİN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Mehmet BİLGİN

II. Danışman : Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ

Vişne ve şeftali mahsüllerinin üretim ve tüketimi dünya çapında yaygınlaşmıştır. Üretimi hızla artmaya devam eden bu ürünlerin ticari olarak işlenmesi, endüstriyel atık olarak büyük miktarlarda posa, kabuk, yaprak gibi yan ürünlerin birikmesine yol açmaktadır. Söz konusu yan ürünlerin değerlendirilmesi, ulusal ve çevresel ekonomi açısından büyük önem arz etmektedir. Gıda ve zirai atıkların değerli bileşenlerinin geri dönüşümü, gıda zincirine yeniden dahil edilmesi ve fonksiyonel katkı maddesi olarak kullanılması ileri teknolojiler sayesinde mümkündür.

Bu tez kapsamında, vişne ve şeftali atık yan ürünlerinden fenolik ve antosiyanin bileşenlerce zengin ekstrakt eldesi için çeşitli prosesler karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Öncelikle her bir meyveye ait yan ürünler, içerdikleri biyoaktif özellikler açısından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Her ikisi meyvenin de kabuklarının en yüksek oranda biyolojik olarak aktif bileşenlere sahip olduğu gözlemlendikten sonra çalışmalara bu yan ürün üzerinden devam edilmiştir. Söz konusu atıklar mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE), homojenizatör destekli ekstraksiyon (HDE) ve otomatik çözücü ekstraksiyonu (OÇE) olmak üzere 4 farklı ileri ve çevre dostu ayırma yöntemleri ile ekstrakte edilmiştir. Her bir ekstraksiyon yönteminin deneysel tasarımı, proses parametrelerinin sistem üzerine etkileri, deneysel verilerin modellenmesi ve koşulların optimizasyonu yanıt yüzey metodolojisi (YYM) ile gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, elde edilen ışığa ve ısıya duyarlı bu özütler, ekstraksiyon

sonrası kolaylıkla bozunabilmekte ve bu durum söz konusu ürünlerin endüstrideki kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Dolayısıyla bu tez kapsamında elde edilen ürünlere farklı stresler (ışık ve sıcaklık gibi) uygulanarak çeşitli stabilite testleri uygulanmıştır.

Mayıs 2021, 263 sayfa.

Anahtar kelimeler: Gıda güvenliği, vişne, şeftali, antioksidan aktivite, antosiyanin, ekstraksiyon, optimizasyon, stabilite.



SUMMARY

Ph.D. THESIS

RECOVERY OF HIGH ADDED-VALUE PRODUCTS FROM BY- PRODUCTS OF FRUIT JUICE INDUSTRY

Ebru KURTULBAŞ ŞAHİN

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemical Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet BİLGİN

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ

Production and consumption of cherry and peach crops have become widespread worldwide. Commercial processing of these products, whose production continues to increase rapidly, causes the accumulation of large amounts of by-products such as pulp, peels, leaves as industrial waste. Valorization of these by-products is of great importance in terms of national and environmental economy. It is possible to recycle the valuable components of food and agricultural waste, to be re-included in the food chain and to be used as functional additives due to advanced technologies,

In this thesis, various processes for obtaining extracts rich in phenolic and anthocyanin components from cherry and peach waste by-products have been presented comparatively. First, the by-products of each fruit were analyzed comparatively in terms of their bioactive properties. After it was observed that the peels of both fruits had the highest proportion of biologically active components, studies were continued on this by-product. These wastes were extracted using 4 different environmentally friendly novel separation methods: Microwave assisted extraction (MDE), ultrasonic assisted extraction (UDE), homogenizer assisted extraction (HDE) and automatic solvent extraction (ASE). The experimental design of each extraction method, the effects of the process parameters on the system, the modeling of the

experimental data and the optimization of the conditions were carried out with response surface methodology (RSM). On the other hand, the relevant extracts that are sensitive to light and heat can be easily degraded after extraction, which limits the use of these products in the industry. Therefore, various stability tests have been applied by applying different stresses (such as light and temperature) to the products obtained within the scope of this thesis.

May 2021, 263 pages.

Keywords: Food safety, sour cherry, peach, anthocyanin, antioxidant activity, extraction, optimization, stability.



1. GİRİŞ

Dünya tarım ve gıda sektörünün 21. yüzyılda yüzleşmesi gereken pek çok önemli zorluk bulunmaktadır. Bunların arasında gıda güvenliği ve atık yönetimi öne çıkmaktadır. Dünya genelinde, gıda üretimi, işleme, pazarlama ve tüketiminin farklı aşamalarında büyük ölçeklerde gıda atığı üretilmektedir. Durmaksızın üretilen gıda atıkları, atık arıtma tesislerinde ve düzenli depolama sahalarında giderek artan bir alan işgal etmektedir. Günümüzde, tüm Gıda Tedarik Zincirinden (FSC) türetilen birçok gıda yan ürünü, değerli kaynak israfına ve birçok çevre sorununa yol açmaktadır (Esparza ve diğ., 2020). Küresel ölçekte gıda atığı üretim miktarı, küresel olarak üretilen toplam gıdanın neredeyse üçte biri ile yarısı arasındadır. New York Times' a göre, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri, meyve atıkları, sebze atıkları ve gıda atıkları dahil olmak üzere yılda yaklaşık 162 milyar dolar değerinde, yaklaşık 60 milyon metrik ton gıda atığı üretmektedir (N. Gupta ve diğ., 2019). Gıda atıklarının sadece ekonomik değil aynı zamanda çevresel ve sosyal sonuçlarının olması, bu konuyu hem önemli hem de daha karmaşık hale getirmektedir (Eriksson ve Spångberg, 2017).

Günümüzde, bu gibi ciddi çevresel sorunlarla başa çıkabilmek için çok az seçenek mevcuttur. Gıda atıklarının oluşumunu azaltmak için önleyici tedbirler alınabilirken, mevcut birikmiş gıda atıklarının ele alınması da önemlidir. Gıda atıklarının günlük aktivitelerimizde kullanılan kimyasallara dönüştürülmesi fikri, büyük potansiyel ve fırsatlara sahip bir araştırma alanıdır. Zira mevcut teknolojiler, hedef bileşiklerin geri kazanılmasına ve farklı ürünlerde fonksiyonel katkı maddeleri olarak gıda zinciri içinde geri dönüştürülmesine izin verdiği için, günümüzde gıda atıkları ucuz bir değerli bileşen kaynağı olarak kabul edilmektedir (Galanakis, 2012). Çoğunluğu meyve ve sebze olan bu gıda atıklarının önemli miktarlarda fenolik madde içerdiği ve değerli doğal antioksidan kaynakları olabileceği görülmüştür. Fenolik bileşikler, doğal antioksidanların en önemli kategorilerinden biridir ve antioksidan potansiyeli ile hastalıkları önleme konusunda pek çok kanıt elde edilmiştir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, bazı meyvelerin kabuk ve tohumlarında antioksidan gücü yüksek fenolik bileşiklerin içeriğinin fazla olduğu görülmüştür, bu da meyve kalıntılarının doğal antioksidanlar gibi biyoaktif bileşiklerin kaynağı olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Deng ve diğ., 2012).

Türkiye, nüfusu 80 milyonu aşan büyük bir ülkedir. Sürekli artan ülke nüfusu ile birlikte tüketimde artmakta, çevre ve insan sağlığını tehdit eden gıda atığı miktarı çoğalmaktadır (Gören ve Ozdemir, 2010). Ülkemizde de geniş alana sahip olan meyve suyu endüstrilerinde, üretim sırasında yaklaşık % 45 – 60 arasında yaş meyve atığı meydana gelmektedir (Deveci, 2008). 2011 yılında hazırlanan rapor incelendiğinde, meyve suyuna işlenen başlıca meyveler arasında, ülkemizde üretimi çok yaygın olan vişne ve şeftali olduğu görülmektedir (Akdağ, 2011). Fenolik bileşenler ve antosiyanin bakımından içeriği yüksek olan bu meyvelerin, meyve suyu üretimleri sırasında oluşan yan ürünlerinin değerlendirilerek yüksek katma değerli ürünler oluşturulması büyük önem arz etmektedir.

Fenolik bileşikler, bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerdir. Geniş bir yapı çeşitliliğine sahiptirler ve bitkilerden elde edilen yiyecek ve içeceklerin başlıca organoleptik özelliklerinden, özellikle de renk ve tat özelliklerinden sorumludurlar. Ek olarak, birçok çalışma, düzenli tüketiminin sağlık üzerinde olumlu etkisi olduğunu ve kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklar ve kanser riskini azalttığını bildirmiştir. Polifenol bileşikleri arasında, flavonoidler, birçok insan ve hayvan çalışmasında faydalı etkilerle güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. İn vitro ve in vivo çalışmalarla, flavonoidlerin, anti-enflamatuar, anti-hipertansif, anti-oksidan, antiaterosklerotik, anti-proliferatif gibi çoklu aktiviteler gösterebileceği belirlenmiştir (Benayad ve diğ. 2014).

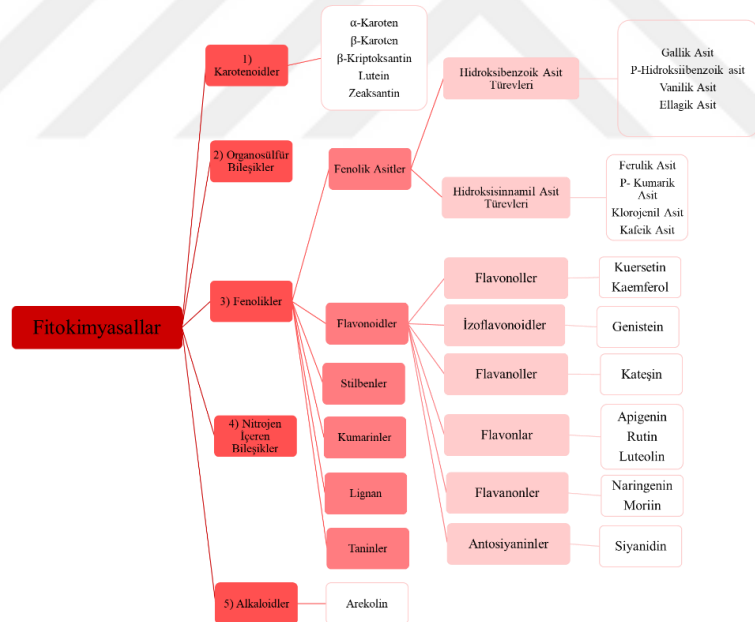
İnsan sağlığı ve çevre güvenliği için katı mevzuatların uygulanması ve ticari açıdan önemli biyolojik olarak aktif maddelerin geri kazanımı için yeni teknolojilerin ortaya çıkması, gıda tedarik zinciri atık değerlendirilmesinde büyük bir ilgi uyandırmıştır. Çevreye karşı en az olumsuz etkiye sahip ileri ayırma yöntemlerini kullanarak biyoaktif moleküllerin kazanımını sağlama fikri, gıda atıkları için ekonomik açıdan ilginç beklentileri arttırmaktadır. Bu durumda, gıda atıklarının ticari maksatlar için uygulanmasında, yüksek katma değerli ürünlerin kazanımında kullanılacak olan teknolojiler son derece önemli olmaktadır.

Bu tez kapsamında da meyve suyu endüstrisi atıkları değerlendirilmiştir. Zira meyvelerin yenilebilir kısımlarının yüksek tüketimi ve endüstriyel olarak işlenmesi nedeniyle, narenciye meyve kabukları, ananas tortuları, şeker kamışı küspesi ve diğer meyve artıkları (esas olarak kabuk ve tohumlar) gibi meyve atıkları büyük şehirlerde büyük miktarlarda üretilmektedir. Söz konusu atıkların (posa, yaprak ve kabuk) homojenizatör destekli ekstraksiyon (HDE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) ve otomatik

2. GENEL KISIMLAR

2.1. FİTOKİMYASALLAR

Fitokimyasallar, meyveler, sebzeler, tahıllar ve diğer bitkisel gıdalardaki temel kronik hastalık riskini azaltmaya yardımcı, doğal olarak oluşan biyolojik olarak aktif bitki bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Dillard ve Bruce German, 2000). 'Fito-' kelimesi Yunanca bitki anlamına gelen “phyto” kelimesinden türemiştir (Doughari ve diğ., 2009). Bitkisel gıda ve yan ürünlerinde 5000’ den fazla farklı fitokimyasal bulunduğu tahmin edilmektedir. İnsan yaşamında biyokimya ve metabolizmaya yönelik farklı biyo-aktivitelere sahip bitki bileşenleri olan fitokimyasallar, beslenme açısından aktif bileşenler olarak gıdalarda kullanılmaktadır. Fitokimyasallar, karotenoidler, fenolikler bileşikler, organosülfür bileşikler, nitrojen içeren bileşikler ve alkaloid bileşiklerden oluşmaktadır (Şekil 2. 1) (Alasavar ve Shahidi, 2008).



Şekil 2.1: Fitokimyasalların sınıflandırılması.

2.1.1. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, 8000'den fazla yapı ile, bitkiler alemindeki, en yaygın bileşik gruplarından birini temsil ederler. Yapısal açıdan incelendiğinde, fenolik bileşikler, bir veya daha fazla

hidroksil (-OH) grubu taşıyan bir aromatik halkaya sahip olmaları ile karakterize edilmektedir (Shetty ve diğ., 2006). Fenolik bileşikler, bitkiler tarafından normal gelişim sırasında ve enfeksiyon, darbe, UV ışınlaması, otçullar ve reaktif oksijen türleri gibi stres koşullarına yanıt olarak sentezlenen ikincil (sekonder) metabolitlerdir. Polifenoller olarak bilinen fenolik bileşikler, antioksidan aktiviteleri ve radikal temizleme kapasiteleri ile bilinen önemli biyoaktif bileşiklerdir. Diğer antioksidanlardan daha yüksek in vitro antioksidan kapasiteye sahiptirler ve vitaminler, karotenoidler gibi gıda antioksidanlarının en kararlı ve güçlü türüdürler. Bu bakımdan serbest radikallerin neden olduğu zararlardan diğer bileşikler veya dokuları savunurlar (Martins ve diğ., 2011).

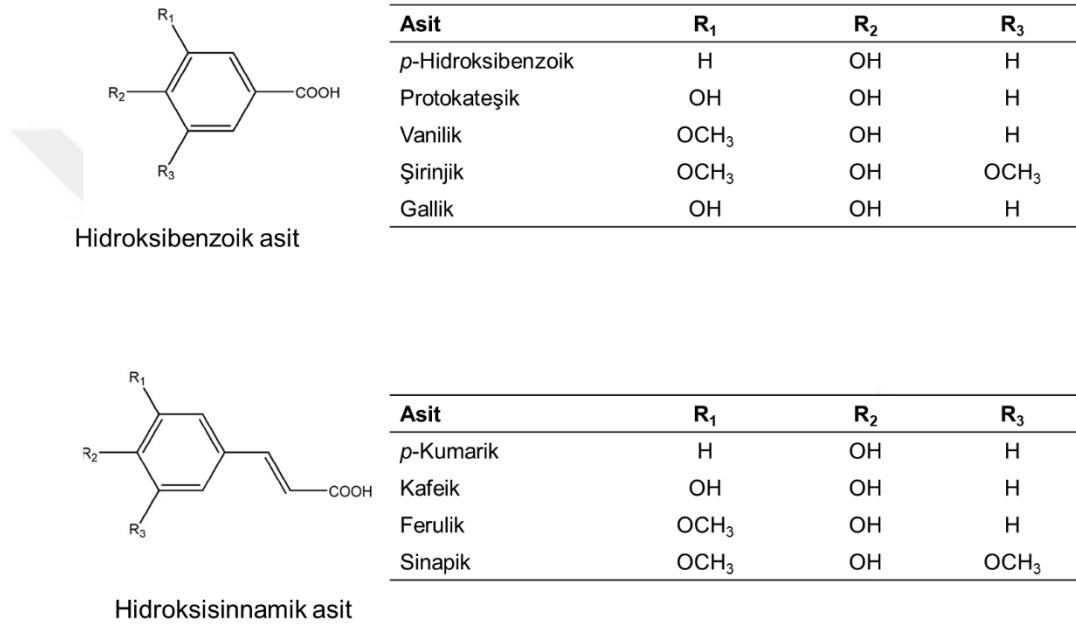
Bitki polifenollerini birçok yönden alifatik yapıya sahip alkollere benzer, ancak aromatik halkanın varlığı, fenolik hidroksil grubunun hidrojen atomu onları zayıf asitler yapar (Kumar ve Goel, 2019). Fenolik bileşikler, içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bunları birbirine bağlayan elementlerin yapısına göre sınıflandırılırlar. Temel fenolik bileşikler grupları flavonoidler, fenolik asitler, taninler, lignanlar, stilbenler ve kumarinlerdir (Fereidoon Shahidi ve Ambigaipalan, 2015). Gıdaların duyusal, burukluk, acılık gibi özelliklerini etkilemektedirler ve bu bileşiklerin bazıları suda çözünürken bazıları çözünmemektedir. (B. Singh ve diğ., 2017)

Fenolik bileşikler kendi kaynaklarından elde edilebilir ve daha sonra renklendirme özellikleri ve antioksidan etkileri nedeniyle bazı gıdalara eklenebilirler. Antiinflamatuvar, antikanser, antimikrobiyal, antialerjik, antiviral, antitrombotik, hepatoprotektif, gıda katkı maddesi, sinyal molekülleri ve daha pek çoğu gibi çok çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklerde anahtar role sahip güçlü doğal antioksidanlar olarak kabul edilirler (Kumar ve Goel, 2019).

2.1.1.1. Fenolik Asitler

Çok amaçlı biyoaktif bileşikler olarak işlev gördüğü bilinen fenolik asitler, bitkiler aleminde geniş çapta bulunmaktadır. Fenolik asitlerin pek çoğu insan beslenmesinin ayrılmaz bir parçasıdır ve aynı zamanda takviye gıda olarak da tüketilmektedir. Fenolik bileşiklerin sağlığı koruyucu etkilerinin çoğu, antioksidan, antimutajenik, antikarsinojenik, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve diğer biyolojik özelliklerine atfedilmiştir. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerinin türevi olan fenolik asitler bitkilerde oldukça yaygındır. Özellikle hidroksisinnamik asit türevleri daha baskın bir biçimde bulunmaktadır (Şekil 2.2). Bu türevlerin yapıları aromatik halkadaki hidroksilasyon ya da metilasyona göre farklılık gösterir. Fenolik

asitler, bazı bitkisel besinlerde çoğunlukla bağlı formda bulunur. En yaygın hidroksisinnamik asitler, yiyeceklerde sıklıkla kinik asit veya glikozlu basit esterler olarak ortaya çıkan kafeik, *p*-Kumarik ve ferulik asitlerdir. Genellikle en iyi bilinen bağlı hidroksisinnamik asit, kafeik ve kinik asit kombinasyonundan oluşan klorojenik asittir. Hidroksisinnamatların aksine, hidroksibenzoik asit türevleri esas olarak gıdalarda glukozidler şeklinde bulunur; *p*-Hidroksibenzoik, vanillik ve protokatekuik asitler en yaygın formlarıdır (Fereidoon Shahidi ve Ambigaipalan, 2015).



Şekil 2.2: Fenolik asit türleri.

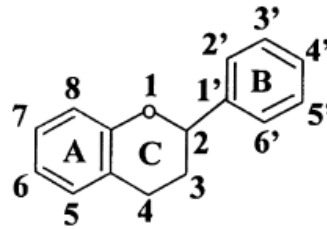
Fenolik asitler, fenol halkalarının reaktivitesinden dolayı antioksidan görevi görürler. Bu nedenle fenolik asitlerin antioksidan davranışı ve potansiyel sağlık yararları konusunda bir farkındalık ve ilgi vardır. Özellikle yapılan son çalışmalarda beslenme antioksidanları olarak faydaları dikkat çekmektedir. Bitkisel gıdaların neredeyse hepsinde bulunmaları nedeniyle, insanlar günlük olarak fenolik asitleri tüketirler. Tahmini tüketim aralığı, beslenme türüne bağlı olarak günde 25 mg - 1 gr' dır (Clifford, 2000).

Ayrıca fenolik asitler, antimikrobiyal aktivite sergiler. Hidroksil grupları, zar yapılarını bozmak için bakteri hücre zarı ile etkileşime girebilmektedir. Şirinjik ve vanilik asitler, immun sistem aracılı karaciğer iltihabının baskılayıcıları olarak görev yapmaktadırlar. Ferulik asitin ise ağız kanserine karşı kemopreventif aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Sıçanlar üzerinde yapılan deneylerde sinapik asit, antihiperглиsemik bir etki sergilemiştir (Amarowicz ve Pegg, 2019).

2.1.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde bol miktarda bulunan biyoaktif kimyasalların önemli çeşitlerinden biridir. Bunlar, bitki metabolitlerinden meydana gelen doğal polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidlerin antioksidan, antiinflamatuvar, antiproliferatif, ışık koruyucu, depigmentasyon, antiaging gibi önemli farmakolojik özellikleri, çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde oldukça umut vericidir. Bu nedenle, flavonoidlerin çeşitli topikal uygulama sistemleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Nagula ve Wairkar, 2019). Aynı zamanda geniş bir yapı çeşitliliğine sahiptirler ve bitkisel yiyecek ve içeceklerin önemli duyuşal özelliklerinden, özellikle renk ve tat özelliklerinden sorumludurlar. Meyve ve sebzelerin besleyici özelliklerine de katkıda bulunurlar (Karak, 2019).

Flavonoidler, düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir ve azotlu olmayan bitki pigmentleri olarak belirtilirler. A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan gruplarını bulundurlar ve yapılarında bulunan C₆-C₃-C₆ halkalarına göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonoidler (izoflavonlar), flavanoller ve antosiyaninler olarak 6 alt gruba ayrılmaktadırlar (Şekil 2.3.) (Middleton, 1998). Flavonoid türleri arasındaki farklar, hidroksilasyon derecesi, C-2' de bir çift bağ varlığı, C halkasının oksidasyonu ve doyunluğu, şeker grubu varlığı gibi kimyasal çeşitliliklerinden kaynaklanmaktadır (Rice-Evans ve Parker, 2003).



Şekil 2.3: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

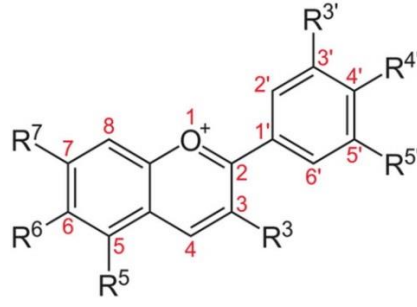
Flavonoidler, düşük redoks potansiyelleri sayesinde, yüksek oranda serbest radikal süpürme kabiliyetine sahiptirler. Bu sayede hücresel membran hasarına ve hücre ölümüne neden olan lipid oksidasyonunu büyük ölçüde önleyebilirler (Corradini ve diğ., 2011).

2.1.1.3. Antosiyaninler

Antosiyaninler, birçok bitki ve meyvede bulunan ve gıda, kozmetik ve ilaç ürünlerinde kullanılabilen flavonoid grubuna ait pigmentlerdir. Latince çiçek ve mavi anlamına gelen antosiyaninler turuncu, kırmızı, menekşe ve mavi arasında değişen renkler sağlarlar ve düşük toksisiteleri nedeniyle doğal renklendiriciler olarak büyük potansiyele sahiptirler. Ayrıca, antosiyaninlerin serbest radikalleri inhibe etme yetenekleri, kalp hastalıkları ve kanser riskini azaltma kapasiteleri gibi nutrasötik özellikleri de bulunmaktadır (Tonon ve diğ., 2010).

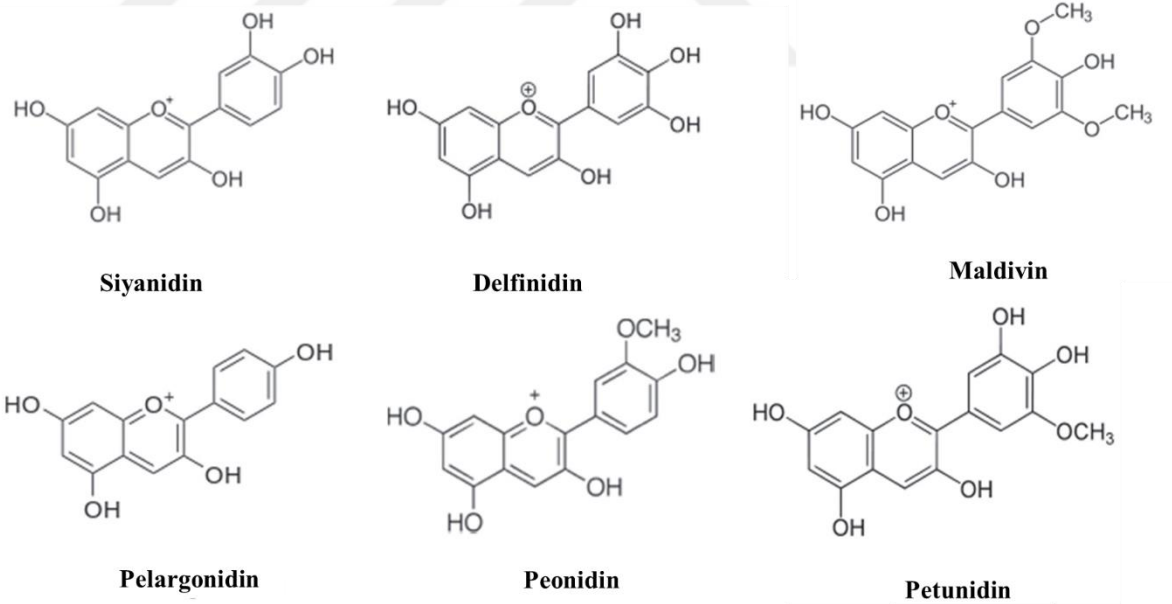
Meyve, sebze ve bitkilere renk veren, pH derecesine göre kırmızı, mor veya mavi görünebilen, suda çözünen doğal bileşiklerdir. Asidik durumda, antosiyaninler kırmızı pigment olarak görünürken, alkali koşullarda mavi pigment olarak görülürler (Khoo ve diğ., 2017). Bu bileşikler, yapraklar, gövdeler, kökler, çiçekler ve meyveler dahil olmak üzere damarlı bitkilerin tüm dokularında bulunurlar. Vişne, böğürtlen, ahududu, nar, çilek, kuş üzümü ve diğer kırmızı, mavi renkli meyvelerden elde edilen antosiyanin renkli pigmentleri oldukça güçlü antioksidanlardır. Ayrıca, antosiyanin bakımından zengin siyah havuç, kırmızı lahana ve mor patates, hastalıkların önlenmesi için tüketilen potansiyel fonksiyonel gıdalar arasında yer almaktadır (He ve diğ., 2011). Giderek daha fazla araştırma, antosiyaninlerin karaciğer disfonksiyonu, hipertansiyon, görme bozuklukları, mikrobiyal enfeksiyonlar ve ishal gibi sayısız insan hastalığına karşı koruma sağladığını göstermektedir (Fan ve diğ., 2008).

Antosiyaninler, bazik flavonoid yapının C - halkasının oksijen atomunda pozitif bir yüke sahip olmasına rağmen, flavonoidlerden biri olarak kabul edilir. Flavilyum (2-fenilkromenilyum) iyonu olarak da adlandırılırlar. Antosiyaninlerin genel moleküler yapısı Şekil 2.4' te gösterilmektedir. Stabiliteleri pH, ışık, sıcaklık ve yapılarına bağlı olarak değişmektedir (Khoo ve diğ., 2017).



Şekil 2.4: Antosiyaninlerin genel moleküler yapısı.

Antosiyaninler, fenolik fitokimyasalların alt sınıflarından biridir. Doğada antosiyanidinler veya antosiyanidinlerin aglikonu olan glikozit formunda bulunabilirler. Antosiyanidinler, 3-hidroksiantosiyanidinler, 3-deksiantosiyanidinler ve O-metillenmiş antosiyanidinler olarak gruplanırken; antosiyaninler, antosiyanidin glikozitler ve asillenmiş antosiyaninler formundadırlar. En yaygın antosiyanidin türleri siyanidin, delfidin, pelargonidin, peonidin, petunidin ve malvidindir (Şekil 2.5.). Bitkilerde tipik antosiyaninlerin yanı sıra asillenmiş antosiyaninler de görülmektedir (Zhang ve diğ., 2001) .



Şekil 2.5: En yaygın antosiyanidin türleri.

2.1.2. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitesi

2.1.2.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, normal hücresel metabolizmanın ürünleridir. Bir serbest radikal, atomun en dış elektron kabuğunda veya dış yörüngede bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren bir atom veya molekül olarak tanımlanabilmekte ve bağımsız bir biçimde bulunabilmektedir. Serbest radikaller, tek sayıda elektrona sahip oldukları için kararsız, kısa ömürlü ve oldukça reaktiftirler. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle, kararlılığa ulaşmak için elektronları diğer bileşiklerden ayırabilirler. Böylece saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybeder ve kendisi serbest bir radikal haline gelir ve sonunda canlı hücreye zarar veren bir zincirleme reaksiyon başlatır (Phaniendra ve diğ., 2015). Lipidler, proteinler ve nükleik asitler üzerindeki bu tür oksidatif hasarlar, koroner kalp hastalıkları, ateroskleroz, kanser ve yaşlanma gibi çeşitli kronik hastalıkları tetikleyebilmektedir (Valentão ve diğ., 2002).

Hem reaktif oksijen türleri (ROT) hem de reaktif nitrojen türleri (RNT) olan serbest radikaller, endojen kaynaklardan (mitokondri, peroksizomlar, endoplazmik retikulum, fagositik hücreler vb.) veya ekzojen kaynaklardan (kirlilik, alkol, tütün dumanı, ağır metaller, geçiş metalleri, endüstriyel çözücüler, pestisitler, halotan, parasetamol ve radyasyon gibi bazı ilaçlar) dolayı meydana gelebilirler. Aşırı ROT/RNT üretimi ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan eksikliği oksidatif stres ve nitrozatif stres birikimine neden olur. En önemlisi, aşırı ROT, lipidler, proteinler ve DNA dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküllerin bütünlüğüne zarar vererek, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, kardiyovasküler hastalıklar, solunum hastalıkları, katarakt gibi çeşitli hastalıkların nüksetmesine neden olabilir (Pham-Huy ve diğ., 2008).

Radikal örnekleri arasında süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), oksijen radikali ($O_2^{\cdot\cdot}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$), alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$), nitrik oksit radikali ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksit ($NO_2^{\cdot}$) radikalleri bulunmaktadır. Bu radikallerin yüksek reaktivitesi, kararlı hale ulaşmak için başka bir elektron elde etme veya onu bağışlama eğiliminde olan eşleşmemiş bir elektronun varlığından kaynaklanmaktadır. Serbest radikaller, nükleik asitler, lipitler ve proteinler gibi çeşitli önemli biyolojik molekül sınıflarını olumsuz etkilemekte, böylelikle normal redoks durumunu değiştirerek oksidatif stresin artmasına neden olabilmektedir. Ancak yinede insan vücudunun, doğal olarak yerinde üretilen veya takviyeler yoluyla dışarıdan

sağlanan gıdalarla antioksidanlar üreterek oksidatif strese karşı koymak için çeşitli mekanizmaları vardır (Valentão ve diğ., 2002).

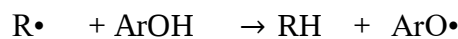
2.1.2.2. Antioksidanlar

Antioksidanlar, gıdalarda mevcut oldukları takdirde, oksitlenebilir bir substratına kıyasla düşük konsantrasyonlarda bulunduklarında, substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddelerdir (F. Shahidi, 2000). Esas olarak, lipid oksidasyonunun başlama ya da yayılma aşamasını geciktiren veya inhibe eden böylece neden olan uçucu bozunma ürünlerinin (örneğin, aldehitler ve ketonlar) oluşumunu azaltan serbest radikal temizleyiciler olarak sınıflandırılırlar (Fereidoon Shahidi ve Ambigaipalan, 2015).

Antioksidanlar, neredeyse tüm gıda ürünlerinde doğal olarak bulunan ve oksidatif saldırıya karşı güçlü bir koruma sağlayan maddelerdir (Hudson, 1990). Antioksidanlar ayrıca gıdalardaki lipid oksidatif ekşimeyi geciktirir, bu nedenle gıdaların kalitesini iyileştirmek için kullanılan gıda katkı maddeleridir. Gıdalardaki antioksidanların rolü, oksidasyonu geciktirmek veya kontrol etmektir. Gıdalardaki otoksidasyon ve ekşimenin gelişim süreci, başlatma, yayılma ve sonlandırma aşamalarından oluşan bir serbest radikal zincir mekanizmasını içerir. Radikaller "başlatma" aşamasında üretilirken, doymamış yağ asitleri ile, en az enerji gerektiren bir siteden, yani "yayılma" aşamasındaki alilik veya dialilik pozisyonu çıkararak reaksiyona girerler. Yayılma adımıdaki reaksiyonlar, bir "sonlandırma" reaksiyonu oluşana kadar zincirleme bir reaksiyon oluştururlar (F. Shahidi, 2000).

Oksitleyici zincir reaksiyonlarını, reaktif oksijen türlerinin doğrudan söndürülmesi, enzimlerin inhibisyonu ve metal iyonlarının şelatlanması dahil olmak üzere çeşitli şekillerde inhibe edebilirler (Fe^{3+} , Cu^{2+}). Antioksidanların koruyucu özelliklerini gösterebileceği temel mekanizmalar birkaç şekilde sınıflandırılabilir.

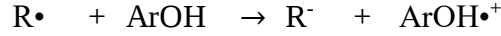
1. Antioksidan (ArOH), kendisinden bir hidrojen atomunu serbest radikale vererek onları daha zayıf bir moleküle dönüştürür:



Bu mekanizmaya H-atom transferi adı verilir. $\text{ArO}\cdot$ radikalinin daha yüksek stabilitesi, antioksidan ArOH 'nin daha iyi bir etkinliğine karşılık gelir, bu nedenle substrat ile reaksiyona

girmesi olası değildir. Genel olarak hidrojen bağları, konjugasyon ve rezonans gibi reaktif olmayan bir fenoksil radikaline dönüşürler. Bu mekanizmada, O—H bağlarının bağ ayrışma entalpisi, antioksidan etkisinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir, çünkü OH bağı ne kadar zayıfsa, serbest radikal inaktivasyonunun reaksiyonu o kadar kolay olacaktır.

2. Tek elektron transferi ile antioksidan, serbest radikalın kendisinde radikal bir katyon haline gelen bir elektron verebilir.



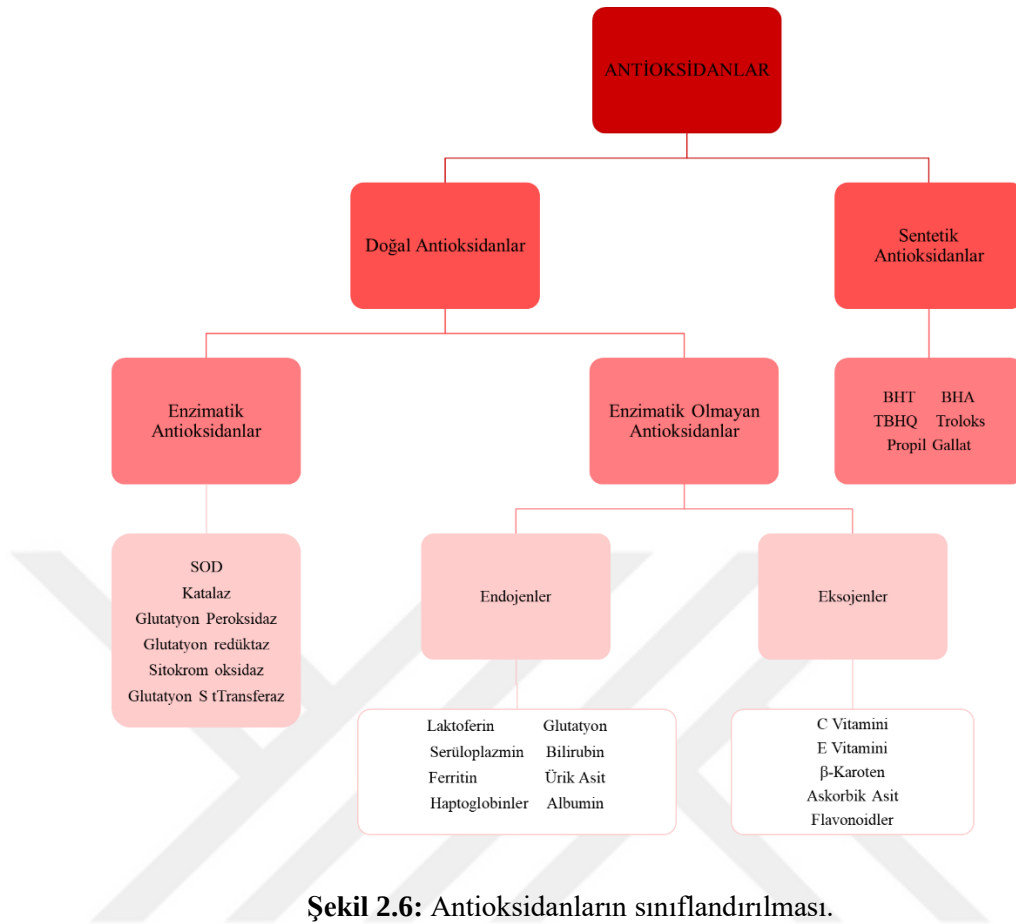
Ayrıca bu durumda, elektron transferinden kaynaklanan radikal katyonun kararlı olması gerekir, bu nedenle substrat molekülleri ile reaksiyona girmez. Bu son çalışmalara göre, iyonizasyon potansiyeli, süpürme aktivitesi değerlendirmesi için en önemli enerjik faktördür. İyonlaşma potansiyeli ne kadar düşükse, elektron soyutlaması o kadar kolay olabilmektedir (Leopoldini ve diğ., 2004).

3. Reaktif oksijen türlerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp, fonksiyonlarını engelleyici etkis gösterebilirler.

4. Reaktif oksijen türlerinin meydana getirdiği hasarı onararak “onarıcı” etki gösterebilirler.

İdeal bir antioksidan, vücut tarafından kolaylıkla emilmeli ve serbest radikal oluşumunu önlemeli/söndürmeli veya fizyolojik olarak uygun seviyelerde redoks metallerini şelatlamalıdır. Sulu ortamda veya membran sistemlerinde etkin olmalı ve gen ekspresyonunu olumlu yönde etkilemelidir (Poljsak ve diğ., 2013)

Antioksidanlar çeşitli şekillerde kategorize edilebilirler (Şekil 2.6). İlk olarak, suda veya lipidlerde çözünürlüklerine göre yapılabilir. Antioksidanlar, suda çözünür ve yağda çözünür antioksidanlar olarak kategorize edilebilir. Suda çözünür antioksidanlar (örneğin, C vitamini), sitozol veya sitoplazmik matris gibi hücresel sıvılarda mevcuttur. Yağda çözünür antioksidanlar (örneğin E vitamini, karotenoidler ve lipoik asit) ağırlıklı olarak hücre zarlarında bulunurlar.



Şekil 2.6: Antioksidanların sınıflandırılması.

Aktivitelerine göre sınıflandırma yapıldığında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ayrılmaktadırlar. Enzimatik antioksidanlar, serbest radikalleri parçalayarak ve ortadan kaldırarak çalışırlar. Antioksidan enzimler, tehlikeli oksidatif ürünleri, bakır, çinko, manganez ve demir gibi kofaktörlerin varlığında çok aşamalı bir işlemde hidrojen peroksit (H_2O_2) ve sonra suya dönüştürür. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise, serbest radikal zincir reaksiyonlarını kesintiye uğratarak etki gösterirler. Enzimatik olmayan antioksidanların birkaç örneği, C vitamini, E vitamini, bitki polifenolü, karotenoidler ve glutatyonudur (Moure ve diğ., 2001).

Antioksidanlar doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olarak da ikiye ayrılmaktadır. Hali hazırda gıdalarda kullanılmasına izin verilen sentetik fenolik antioksidanlar ise, butillenmiş hidroksianisol (BHA), butillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG) ve üçüncül butilhidrokinondur (TBHQ). Ek olarak oktil gallat ve dodesil gallat da sentetik bir antioksidan olarak kullanılmaktadır (Ratnam ve diğ., 2006). Bu sentetik fenolik antioksidanlar, yağların, sıvı yağların ve lipid içeren gıdaların işlenmesi ve depolanması sırasında lipid oksidasyonunun başlamasını önlemek veya geciktirmek için ürünlere bilinçli olarak eklenmekte

ve gıda endüstrisi tarafından yaklaşık 60 yıldır kullanılmaktadır. Ancak yine de sentetik fenolik antioksidanların gıda maddelerinde kullanımı, potansiyel toksisite etkileri nedeniyle hükümetler tarafından sıkı bir şekilde denetlenmektedir. BHA ve BHT'nin laboratuvar hayvanlarında yüksek seviyelerde kullanıldığında karaciğer hasarı ve karsinogenezden sorumlu olduğundan şüphelenilmiştir. Sentetik fenolikler birçok gıda sisteminde etkilidir; ancak, güvenlik endişeleri ve doğal ürünlere yönelik tüketici talebi nedeniyle gıda endüstrisinde kullanımları son zamanlarda azalmıştır (Fereidoon Shahidi ve Ambigaipalan, 2015).

Doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C ve E vitaminleri), fenolik bileşikler (basit fenolik ve hidroksisinnamik asitler, flavonoidler vb.) ve karotenoidlerden oluşmaktadır (Nimse ve Pal, 2015). Doğal antioksidan kaynakları, öncelikle bitkilerin her yerinde bulunabilen bitki fenolikleridir. Meyvelerde, sebzelerde, sert kabuklu yemişlerde, tohumlarda, yapraklarda, unlarda, köklerde ve kabuklarda bulunabilirler. Güçlü antioksidanlar ve serbest radikal temizleyiciler olan fenoliklerin biyolojik aktiviteleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Fereidoon Shahidi ve Ambigaipalan, 2015). Doğal antioksidan kaynakları olarak farklı meyve ve sebzeler incelenmiş ve çoğu fenolik bileşik olarak tanımlanan antioksidan aktiviteye sahip çeşitli bileşikler elde edilmiştir. Bu nedenle, bu bileşiklerden elde edilen faydalı etkiler, antioksidan aktivitelerine atfedilmiştir (Heim ve diğ., 2002).

2.1.3. Gıda Kaynaklı Fenolik Bileşikler

Neredeyse tüm bitki kökenli gıdalar fenolik bileşikler içermesine karşın, fenolik bileşiklerin insan beslenmesindeki ana kaynakları meyveler, sebzeler ve içeceklerdir (Adil, 2006). C vitamini, E vitamini ve karotenoidler gibi antioksidanların çoğu beslenme bileşenler içerisinde bulunmaktadır. Kırmızı soğan (Petersson ve diğ., 2010), mor tatlı patatesler (Fan ve diğ., 2008), kahve telvesi (Mussatto ve diğ., 2011), üzüm çekirdekleri (Ghafoor ve diğ., 2009), mandalina yaprağı atığı (Ateş ve diğ., 2017), zeytin ağacı (*Olea europaea*) yaprakları (Bilgin ve Şahin, 2013) gibi gıda yan ürünlerinden temel fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu konu alan çalışmalar literatürde yaygın olarak görülmektedir. Mevcut çalışmalar, fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri nedeniyle büyük önem taşımaktadır.

Dahmoune ve diğ. *Citrus* limonu kabuklarının mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) ve ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemleri ile farklı parametrelerin toplam fenolik bileşiklerin geri kazanımı ve antioksidan aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla bir

çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışma sonucunda MDE ve UDE için optimum koşullar altında tahmin edilen maksimum toplam fenolik madde geri kazanımlarının sırasıyla 15,74 ve 15,08 mg gallik asit eşdeğeri / g madde miktarı olduğu görülmüştür (Dahmoune ve diğ., 2013).

Bir başka çalışmada Boeing ve diğ. karadut, böğürtlen ve çilekten oluşan üç farklı kırmızı meyve türünden antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonunda çözücü etkisini değerlendirmişlerdir. Elde edilen ekstraktlar toplam fenolik madde, antosiyanin içeriği ve antioksidan kapasitesi bakımından değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda antioksidan maddelerin kullanılan çözücü kombinasyonlarından yüksek derecede etkilendiği görülmüştür. Organik çözücü-su karışımları, antioksidan bileşiklerin özütlenmesinde ilgili saf organik çözücülerden daha etkili olduğu saptanmıştır (Boeing ve diğ., 2014).

Akhbari ve diğ. çalışmalarında, *Solanum melongena* L. (patlıcan) kabuklarından elde edilen ekstraktlardaki toplam antosiyanin ve toplam fenolik madde içeriğin optimizasyonları çözücü tipi, alkol/su oranı hacmi, asit tipi, asit hacmi, katı kütlenin çözücü hacmine oranı, partikül boyutu, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi parametreleri gözönüne alınarak incelenmiştir. Sonuçlarda, katı kütlenin çözücü hacmine oranının ve sıcaklığın toplam ekstraksiyon verimi üzerinde önemli pozitif etkilere sahip olduğu, alkol/su oranı hacminin ise önemli olumsuz etki gösterdiğini görülmüştür. Ayrıca patlıcan kabuklarının dikkate değer miktarda antioksidan aktivite ve antosiyanin madde içeriği gösterdiği belirlenmiştir (Akhbari ve diğ., 2019).

Şahin ve diğ. ticari olarak temin edilebilen mısırözü yağını zeytin yaprağı ve melisa otu ekstraktları ilave edilerek polifenoller bakımından zenginleştirmiştir. Çalışmada işlenmiş ve işlenmemiş mısırözü yağının, toplam fenolik ve karotenoid içerikleri, antioksidan aktivite ve indüksiyon süresi gibi parametreler aracılığıyla yağ kalitesi değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda mısırözü yağına zeytin yaprağı ve melisa otu ekstraktlarının eklenmesinin yağların radikal süpürme aktivitesini % 0,12 – 0,15 arasında arttırdığı ve oksidatif stabiliteye katkıda bulunduğu görülmüştür (Şahin ve diğ., 2017).

2.2. VIŞNE

2.2.1. Vişne Meyvesinin Kökeni

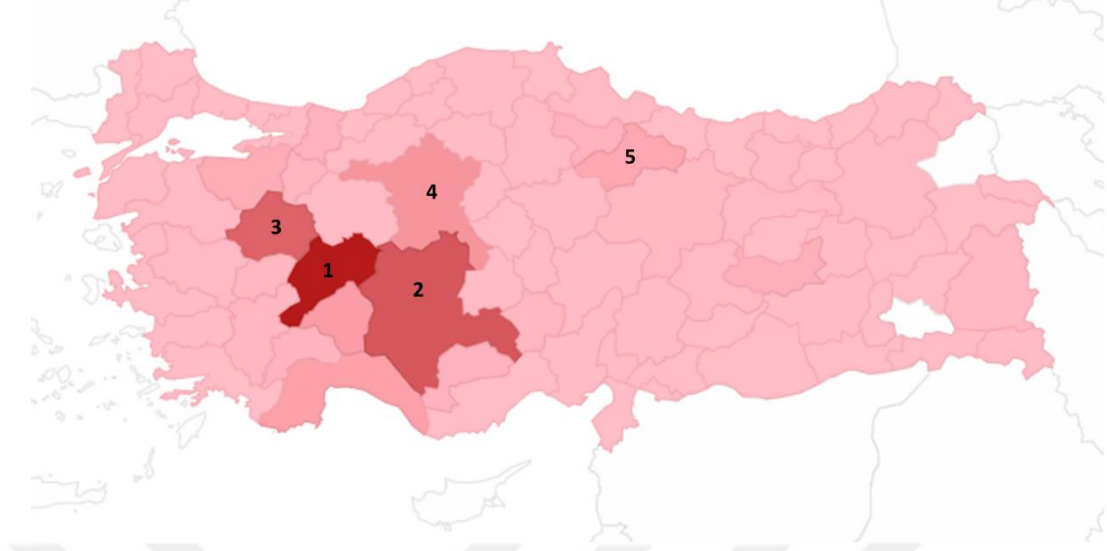
Prunus, gülgiller familyasından (Rosaceae) kiraz, kayısı, şeftali, badem ve erik gibi meyve ağaçlarını içeren cinstir. Hem Eski hem de Yeni Dünyada geniş çapta yayılmış olan yaklaşık

200 ağaç ve çalı türünün bir cinsi olan *Prunus* (Rosaceae), ılıman bölgelerdeki ekonomik açıdan en önemli meyve mahsullerinin çoğunun yanı sıra süs bitkisi olarak yetiştirilen türleri, kerestelik ve tıbbi amaçlı kullanılan diğer türleri içerir. En bilindik türleri Kuzey Yarım Küre'nin ılıman bölgesinde olmakla beraber, Asya ve Amerika' daki tropikal bölgelerde de yaygındır (Nayik, 2020). M.Ö. 5000-4000 yıllarına dayanan vişne çekirdeği arkeolojik kanıtları, vişnenin insanlar tarafından tüketim için kullanılan en eski meyvelerden biri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Vişnenin arkeolojik kanıtları arasında bulunan vişne çekirdekleri ilk olarak Avrupa mağaralarında bulunmuştur. Theophrastus, MÖ 300 yıllarında kırmızı ve yuvarlak meyveler taşıyan büyük bir ağaç şeklinde vişneyi ilk betimleyen ve tanımlayan ilk kişidir. Vişne ağacı, o yıllarda ismi “Kerasum” olan Giresun şehrinden esinlenerek “Kerasus” olarak adlandırılmıştır. Almanya'daki arkeolojik kazılara göre, meyve, Roma döneminde de beslenme bileşeninin bir parçası olduğu görülmüştür (Newman ve Kirker, 2021).

2.2.2. Vişne Meyvesi ve Üretimi

Vişne ve kiraz, çoğu Avrupa ve Asya'ya özgü olan Gülgiller (Rosaceae) familyasındaki *Prunus* cinsi, *Cerasus* alt cinsine aittir. Meyveleri için yetiştirilen *Prunus* bölümünün baskın türleri kiraz (*Prunus avium* L.), vişne (*Prunus cerasus* L.) ve yer kirazlarıdır (*Prunus fruticosa* Pall.) (Serradilla ve diğ., 2015). Kiraz (*P. avium*, L.) ve vişne (*P. cerasus*, L.) ağaçları, ekonomik açıdan en değerli iki çekirdekli meyve ağacı türleridir. Belirtildiği gibi, bu türlerin kökeni Orta Avrupa'da ve Hazar ve Karadeniz'i çevreleyen bölgelerde bulunur ve Avrupa ana karası ile Batı Asya bölgelerinde yaygındır (Serradilla ve diğ., 2015).

Türkiye, Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü 2018 raporlarına göre 184.167 ton vişne üreterek dünya vişne üreticileri sıralamasında dördüncü sırada yer almıştır (FAOSTAT, 2018). Diğer önde gelen üreticiler arasında Ukrayna, Rusya ve Polonya bulunmaktadır. TUIK, 2019 verilerine göre ülkemizde 5792 adet meyve veren vişne ağacı bulunmaktadır. Aynı verilere göre 2019 yılında ülkemizde toplamda 182.162 ton vişne üretilmiştir. Afyonkarahisar' da 44.623 ton, Konya' da 29.203 ton, Kütahya' da 25.972 ton, Ankara' da 11.715 ton, Tokat' ta 6238 ton vişne üretimi gerçekleşmiştir (Şekil 2.7) (TUIK, 2019).



Şekil 2.7: İllere göre Türkiye’ de vişne üretimi (2019).

Vişne (*Prunus cerasus* L.), çoğunlukla gıda endüstrisinde taze meyve suyu, nektar ve reçel üretimi için kullanılan temel ürünlerden biridir. Türkiye’ de üretilen toplam vişne mahsulünün yaklaşık % 40’ ı, tüketici tercihleri nedeniyle vişne suyu üretimine katkıda bulunmaktadır (Damar ve Ekşi, 2012).

Türkiye’ de üretilen vişnelerin, kaliteli meyve suları üretiminde oldukça saygın bir konuma sahip olduğu bilinmektedir. Vişne meyvesi, karakteristik ekşi tadı nedeniyle % 100 meyve suyuna işlenemez. Euromonitor International’ ın “Türkiye’de Meyve / Sebze Suyu” konulu raporu, Türkiye’deki nektar (% 25-99 meyve suyu) satışlarının 2006-2011 yıllarında toplam meyve / sebze suyu satışlarının yaklaşık % 65’ ini oluşturduğuna dikkat çekmiştir. Aynı raporda, perakende satış hacminin yaklaşık % 35’ine sahip olan şeftali nektarından sonra perakende satış hacminin % 25-30’ u ile vişne nektarının ikinci önde gelen lezzet olduğu da belirtilmiştir (Toydemir, 2013).

2.2.3. Vişne Meyvesinin Fenolik Madde İçeriği

Vişne, özellikle Amerika Birleşik Devletleri’ nde son 15 yılda bildirilen sağlığa faydalı özelliklerinden dolayı “süper gıdalar” olarak değerlendirilen meyveler listesinde üst sıralarda yer almaktadır. Vişne, kirazlara kıyasla daha düşük miktarda basit şeker içermektedir. Aynı şekilde kiraz meyvesine göre daha yüksek miktarda A vitamini ve β -karoten içerikleri ve daha yüksek toplam fenolik madde miktarı sergilemektedir. Ayrıca, vişne meyvesinin, kiraz meyvesine kıyasla daha yüksek antosiyanin içerdiği bazı makalelerde bildirilmiştir. Vişne

çeşitlerinde tespit edilen yüksek seviyelerde polimerik prosiyanidinin, yüksek antioksidan aktivitelere katkıda bulunmakta olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (Blando ve Oomah, 2019).

Vişne, mükemmel bir fenolik bileşik ve polifenol kaynağı olarak kabul edilmektedir. Vişne meyvesinin polifenol bileşimi çeşitli çalışmalarla incelenmiştir. Vişnelerin önemli seviyelerde antosiyanin içerdiği bulgusu, bu türe üzerine dikkatlerin toplanmasına yol açmıştır (Wang ve diğ., 1997) Vişnelerde bulunan üç ana fenolik madde antosiyaninler, flavan-3-oller ve hidroksisinnamik asitlerdir. Vişnelerde, kirazlardan çok daha yüksek miktarda prosiyanidin, flavonol glikozitler ve flavanoller bulunur (Yılmaz ve diğ., 2019).

Vişnede bulunan baskın antosiyaninler arasında, siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-glukozilrutinozit, siyanidin-3-soforozit, siyanidin-3-rutinozit bulunduğu görülmüştür (Elez Garofulić ve diğ., 2013; Ferretti ve diğ., 2010; Kołodziejczyk ve diğ., 2013; Yılmaz ve diğ., 2019). Bahsedilen antosiyaninlerin yanı sıra, vişnede peonidin-3-glukozit, malvinidin-3-glukozit, delfinidin-3-glukozit antosiyaninlerinin yer aldığı gözlenmiştir.

Vişneler ayrıca flavonoidlerin oligomer veya polimerlerinden oluşan en zengin prosiyanidin kaynaklarındandır. Prosiyanidin polimerizasyonunun derecesi bağırsak sistemindeki emilimlerine göre, iki ila birkaç yüz alt birim arasında değişebilmektedir. Kısa zincirli prosiyanidinler koroner kalp hastalığının önlenmesinde önemli olduğundan, ortalama dört monomer zincir uzunluğuna sahip prosiyanidinler bu konuda dikkat çekmektedir (Yılmaz ve diğ., 2019).

2.3. ŞEFTALİ

2.3.1. Şeftali Meyvesinin Kökeni

Gülgiller familyası (Rosaceae) 19. en büyük bitki ailesidir. Gülgiller familyası, Prunus (şeftali), Pirus (elma) gibi bazı yaygın cinsleri içerir. Yaklaşık 90-125 cins ve 3370-3500 ağaç, çalı ve ot türünden oluşan geniş bir ailedir (Kant ve diğ., 2018). Gülgiller familyasından olan şeftali (Prunus Persica) 20 milyon tona yakın yıllık üretimi ile dünya çapında son derece popüler bir ağaç meyvesidir. Şeftali meyvesi Avrupa'ya, Roma İmparatorluğu tarafından 1. Yüzyılda İran'dan getirildiği için bilimsel adı İran'ın Latince isminden yola çıkılarak "Prunus Persica" olarak kullanılmıştır. Ancak yıllar sonra yapılan çalışmalarla şeftalinin anavatanının Çin olduğu ve şeftalinin en eski kayıtlarının Çin arkeolojik kayıtlarında olduğu görülmüştür (Su ve diğ., 2015;

Zheng, Crawford ve Chen, 2014). Çin arkeolojik kayıtlarına göre, Çin'de şeftali yetiştiriciliğinin M.Ö 1000' e dayandığı ve muhtemelen Çin'den batıya deniz yoluyla Hindistan'a, Orta Doğu ve İran'a ipek yolu ile taşındığı düşünülmektedir (Kant ve diğ., 2018).

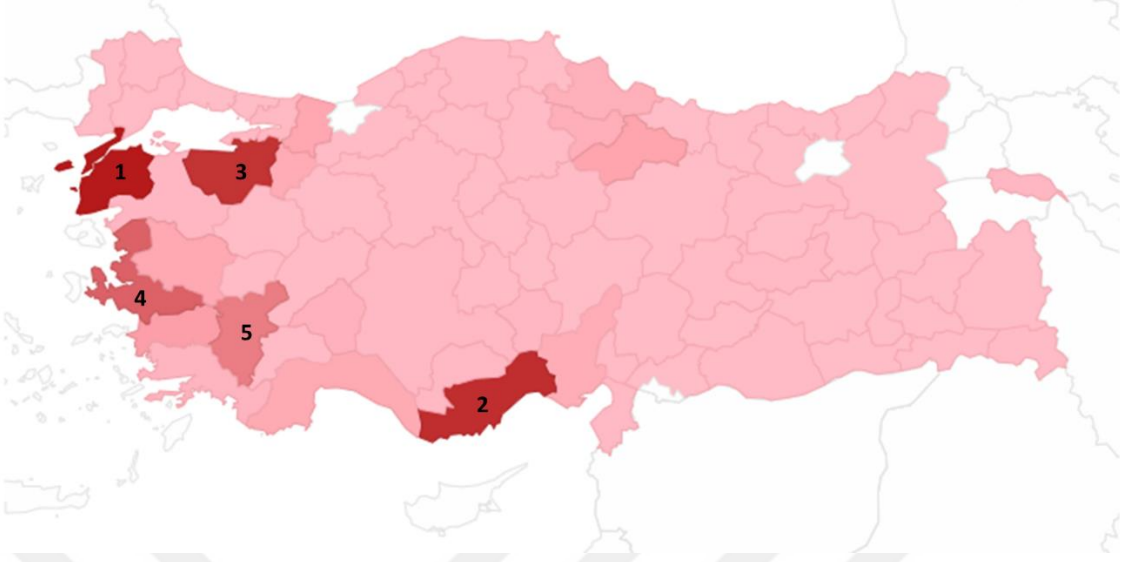
2.3.2. Şeftali Meyvesi ve Üretimi

Şeftali, farklı ekolojik koşullara kolaylıkla uyum sağlayabilen bir meyve türüdür. Düşük kış sıcaklıkları, türünün soğuma isteği ve ilkbaharın geç donları üretimi ekonomik olarak sınırlayan faktörlerdir. Türkiye'de şeftali, çekirdekli meyveler içerisinde çoğunlukla kayısıdan sonra en çok yetiştirilen meyve çeşididir. Şeftali üretimi yıldan yıla artmakta ve özellikle son yıllarda kamu kurumları tarafından sağlanan verimli ve kaliteli türlerinin yaygınlaşmasıyla ağaç başına verim miktarı artmıştır (Aydın ve Aktürk, 2018).

Tablo 2.1: Dünya şeftali/ nektari üretimi (FAO, 2021).

Sıra	Ülke	Alan (ha)	Üretim (ton)
1	Çin	838.878	15.825.757
2	İspanya	77.700	1.545.610
3	İtalya	60.430	1.224.940
4	Yunanistan	41.410	926.620
5	Türkiye	46.294	830.577
6	ABD	36.380	739.900
7	İran	32.155	591.412
8	Mısır	15.748	358.012
9	Şili	15.651	330.232
10	Arjantin	12.835	210.000
2019	Dünya Toplamı	1.527.052	25.737.841

Dünyadaki ticari üretimin tamamına yakını Güney ve Kuzey 30° – 40° enlemlerinden elde edilmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2019 verilerine göre dünyada çekirdekli meyve üreten başlıca ülkeler Çin, ABD, İtalya, İspanya ve Türkiye'dir (Tablo 2.1).



Şekil 2.8: İllere göre Türkiye’ de şeftali üretimi (2019).

Bu gruptaki en popüler meyvelerden biri olan şeftali/nektari için, 2019 yılı toplam üretimi 25.7 milyon tondur. Dünyada taş çekirdekli meyveler arasında önemli bir tür olan şeftali, ülkemiz tarım ve sanayisi içinde büyük bir öneme sahiptir. 2019 verilerine göre Türkiye’ de yılda 830.577 ton şeftali üretilmiştir (FAO,2021). Bu üretimin büyük bir kısmı Çanakkale, Mersin, Bursa, İzmir ve Denizli’ de gerçekleşmiştir.

2.3.3. Şeftali Meyvesinin Fenolik İçeriği

Şeftali (*Prunus persica L.*) ekonomik ve besin değeri yüksek meyveler arasındadır. Şeftali meyvesinin ana bileşenleri arasında bulunan karbonhidratlar, organik asitler, mineraller ve lifler, bu meyvenin hem yaş meyvelerinin hem de meyve sularının besin kalitesine katkı sağlamaktadır. Şeftali, organik asitler ve doğal şekerler gibi önemli miktarda diğer değerli bileşenlere sahip olmasının yanı sıra A vitamini ve potasyum açısından son derece zengindir. Bu bileşenler şeftalinin besleyiciliğini arttırmaktadır. (Manzoor ve diğ., 2012).

Şeftali, A, B ve C vitaminleri, karotenoidler ve klorojenik ve neoklorojenik asitler, kateşin, epikateşin, siyanidin ve kuersetin türevleri gibi fenolik bileşiklerin önemli bir kaynağı olan antioksidanlar açısından oldukça zengindir. Şüphesiz şeftalinin kimyasal bileşimi ve dolayısıyla bu fitokimyasalların türü ve miktarı, genotip, coğrafi ve iklim koşulları, mevsimler ve hava koşulları, tarımsal uygulamalar, olgunluk aşaması, saklama koşulları gibi çeşitli

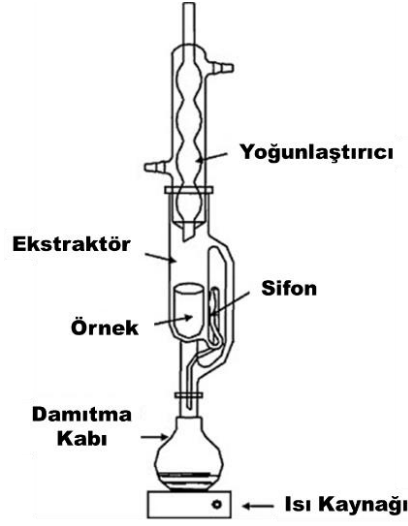
faktörlere bağlıdır ve bunlara göre değişmektedir. Şeftali ve nektarilerde bulunan ana fenolik asitler hidroksisinnamik asit türevleridir: klorojenik asit ve izomeri olan neoklorojenik asit. Hidroksisinnamik asitlere kıyasla daha düşük olsa da gallik asitte bulunabilmektedir.

2.4. FENOLİK BİLEŞİKLERİN EKSTRAKSİYONU

2.4.1. Sokslet Ekstraksiyonu

Sokslet ekstraksiyonu (SE), yüzyılı aşkın süredir kullanılan standart bir yöntem haline gelmiş ve bu yöntem referans alınarak yeni ekstraksiyon yöntemlerinin performans ölçümleri gerçekleştirilmektedir. SE' nin avantajları ve dezavantajları çeşitli modifikasyonların geliştirilmesi için kullanılmaktadır. Son on yılda bildirilen modifikasyonların çoğu, ekstraksiyon sürelerini kısaltarak, yardımcı enerjileri kullanarak ve ekstraksiyon düzeneğini otomatikleştirerek SE' yi katı örnek hazırlama için daha yeni tekniklere yaklaştırmayı amaçlamaktadır.

SE' nin geleneksel uygulamasında, numune, bir damıtma şişesinden yoğunlaştırılmış çözücü ile kademeli olarak doldurulan bir kartuş içine yerleştirilir. Sıvı taşma seviyesine ulaştığında, bir sifon kartuştan onu içine çeker ve damıtma şişesine geri yükler, böylece ekstrakte edilen analitleri sıvıya taşır. İşlem, tam ekstraksiyon elde edilene kadar tekrar edilir. Bu performans, SE' yi sürekli-kesikli bir teknik yapar. Ekstraktör adım adım hareket ettiğinden, bir bütün olarak kesikli sistem olarak çalışmaktadır; bununla birlikte, ekstraksiyon maddesi numune boyunca yeniden dolaştırılır, böylece sistem de bir şekilde sürekli bir şekilde çalışmış olur (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Sokslet Ekstraktörü.

Geleneksel SE' nin en göze çarpan avantajları şunlardır: numune, çözücü ile tekrar tekrar temas ettirilir, böylece kütle transfer dengesinin yer değiştirmesine yardımcı olur; damıtma şişesine uygulanan ısı bir dereceye kadar ekstraksiyon boşluğuna ulaştığı için sistemin sıcaklığı nispeten yüksek kalır; süzdürme aşamasından sonra hiçbir filtreleme gerekmez; ve temel ekipman ucuz olduğu için eşzamanlı paralel ekstraksiyon ile numune verimi artırılabilir (Luque de Castro ve Priego-Capote, 2010).

Diğer geleneksel katı numune hazırlama tekniklerine kıyasla SE' nin en ciddi dezavantajları ise şunlardır: ekstraksiyon için gereken uzun süre ve sadece bertaraf edilmesi pahalı olmakla kalmayıp kendisi de ek olarak çevre sorunlarına neden olabilen büyük miktarda çözücü atığıdır. Numuneler genellikle çözücünün uzun bir süre alan kaynama noktasında ekstrakte edilir ve ısıl-kararsız bileşiklerin termal ayrışma olasılığı göz ardı edilemez; geleneksel SE cihazı, adımı hızlandıracak olan çalkalama sağlayamaz; büyük miktarda çözücü kullanıldığından, ekstraksiyondan sonra bir buharlaştırma/konsantrasyon aşaması zorunludur; ve teknik, çözücü seçiciliği ile sınırlıdır ve kolayca otomatikleştirilemez (López-Bascón-Bascon ve Luque de Castro, 2019).

2.4.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Mikrodalga teknolojisi, organik, inorganik ve organometalik bileşiklerin sentezi, kataliz, çözücü ekstraksiyonu, numune kurutma, nem ölçümü, analit adsorpsiyonu ve desorpsiyonu, numunelerin temizlenmesi, kromojenik reaksiyonlar, damıtma ve mikrodalga plazma atomik

spektrometresi dahil olmak üzere kimyasal alanlarda birden fazla kullanım alanı bulmaktadır. Birçok numune türü için uygulamaya elverişli olmasının yanında, bu işlemlerin çoğunun tamamlanması için harcanan sürenin azaltılmasına da yardımcı olabilmektedir (Llompart ve diğ., 2019). Mikrodalga ev fırınlarının laboratuvarlarda kullanımı ilk kez Samra ve diğ. tarafından 1975'te biyolojik numunelerin işlenmesi için metal iz analizinde kullanılmıştır. Böylelikle örnek hazırlamada mikrodalga radyasyon uygulamasının başlangıcı gerçekleşmiştir. Organik sentezle ilgili ilk yayınlar 1986' da yayınlanmıştır. Bu çalışmalar, geleneksel ısıtma ve daha yüksek sentez geri kazanımlarına kıyasla farklı kinetikler göstermiştir. Organik bileşiklerin mikrodalga ışımasıyla ekstraksiyonu ise 1986' da Ganzler ve diğ. ve Lane ve Jenkins tarafından gerçekleştirilmiştir. O tarihten bu yana, çok sayıda laboratuvar bu yeni ekstraksiyon tekniğinin analitik olasılıklarını incelemektedir (Letellier ve Budzinski, 1999).

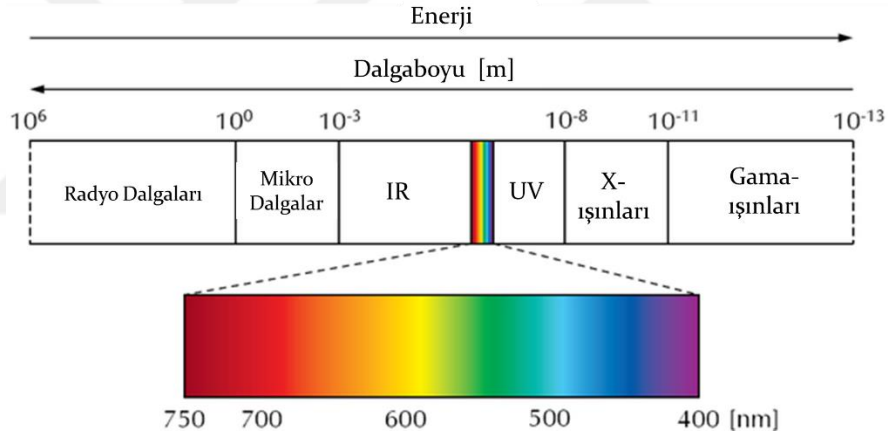
2.4.2.1. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonun Çalışma Prensibi

Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), mikrodalga enerjisi ve geleneksel solvent ekstraksiyonunun kullanımını birleştiren bir ekstraksiyon tekniğidir. MDE' de mikrodalga enerjisi, katı veya sıvı örneklerle temas halinde olan çözücülerini ısıtmak ve ilgili bileşiklerin numuneden çözücüye dağılımını teşvik etmek için kullanılır. Geleneksel ısıtmanın aksine, mikrodalgalar çözeltiyi doğrudan ısıtır.

Sonuç olarak, sıcaklık gradyanları minimumdur ve mikrodalga radyasyonu kullanan ısıtma hızı daha hızlıdır (Llompart ve diğ., 2019). MDE işleminin temelleri geleneksel yöntemlerden (katı-sıvı veya basit ekstraksiyon) farklıdır. Çünkü ekstraksiyon, elektromanyetik dalgaların neden olduğu hücre yapısındaki değişikliklerin sonucu olarak gerçekleşmektedir. MDE' de, prosesin hızlanması ve yüksek ekstraksiyon verimi, iki taşınma olayının sinerjik bir kombinasyonunun sonucu meydana gelebilmektedir: aynı yönde çalışan ısı ve kütle değişimleri. Öte yandan, geleneksel ekstraksiyonlarda, ısı transferi substratın dışından içe doğru gerçekleşmesine rağmen, kütle transferi içten dışa gerçekleşmektedir. Ek olarak, geleneksel ekstraksiyonda ısı, ısıtma ortamından numunenin içine aktarılmasına rağmen, MDE' de ısı, ısıtılmış ortam içinde hacimsel olarak dağılmaktadır (Chemat ve Cravotto, 2013).

Mikrodalgalar, iki salınımlı alandan oluşan elektromanyetik dalgalardır: bir elektrik alanı ve bir manyetik alan. İki alan birbirine dik olarak çalışır ve yayılma yönü sinüzoidal olarak değişir. Mikrodalga enerjisi, iki mekanizma ile moleküler harekete neden olan, 300 ile 300.000 MHz

arasında frekans aralığına sahip iyonlaşmayan bir radyasyondur, iyonların göçü ve dipollerin dönüşüm hareketiyle oluşmaktadır. Manyetik alan, elektromanyetik enerjinin bir kısmını absorbe edebilen ve onu ısıya dönüştürebilen malzeme üzerinde dalgaların doğrudan etkisini üretir (Llompart ve diğ., 2019). Cep telefonu frekansları ve telekomünikasyon ile herhangi bir paraziti önlemek için tüm ev tipi mikrodalga fırınlar ve kimyasal sentezler için 12,25 cm dalga boyuna karşılık gelen 2,45 GHz frekansı kullanılmaktadır (Şekil 2.10). Mikrodalga ısıtması, elektrik radyasyon alanının, dipol dönüşleri veya iyonların göçü gibi moleküler eylemleri etkileyebilecek maddeyle etkileşiminden kaynaklanır. Ancak düşük enerji içeriği nedeniyle çapraz atomları iyonize edemezler veya moleküler yapıyı değiştiremezler. Aslında, seçici bir ısıtma fonksiyonuna sahiptir. Başka bir deyişle, polar olmayan moleküller mikrodalga elektrik alanlarında etkisizdir; yüksek dielektrik sabiti ve düşük moleküler ağırlığa sahip polar moleküller, seçici olarak mikrodalga enerjisini emebilmektedirler.



Şekil 2.10: Elektromanyetik spektrum.

Bazı bileşiklerin bu şekilde seçici olarak ısıtılması, reaksiyon karışımının bütününün sahip olduğu sıcaklıktan çok daha yüksek bir sıcaklığa sahip mikro bölgelerin oluşumuna yol açabilmektedir. Bu yüksek sıcaklık mikro bölgelerine "sıcak noktalar" adı verilir. Böylece, kimyasal reaksiyon hızının hızlanmasında bir artışa yol açabilecek hızlı bir sıcaklık artışı üretilir. Mikrodalgaları ısıtma aracı olarak kullanan transestrifikasyon gibi kimyasal reaksiyonlar için polar moleküller daha fazla avantaj sağlayabilmektedirler (Sadeghi ve diğ., 2017).

Dipol dönüşü, elektrik alanı ile aynı hizaya gelmeye çalışan polar moleküllerin alternatif hareketi ile ilgilidir. Dipolar polarizasyon (yönelim polarizasyonu olarak da anılır), mikrodalga

ekstraksiyonunda en önemli ısıtma mekanizmasıdır. 2.45 GHz'de, çözücü moleküllerinin çift kutuplarının yeniden hizalanması, tipik olarak saniyede 4900 milyon kez olmak üzere, hızla değişen bir elektronik alan içinde gerçekleşir.

Çözücü molekülleri, kendilerini elektrik alanı içinde yeniden hizalamaya çalışırlar. Bu durum, titreşime ve moleküllerin bu hareketinden kaynaklanan çoklu çarpışmalara yol açar, bu da enerji salınımına neden olur, sürtünme kuvvetinden dolayı ısı üretilir ve dolayısıyla sıcaklığı artar.

Mikrodalga alanında ısı üretiminin gerçekleşebilmesi için, bir dielektrik bileşiğin varlığına ihtiyaç duyulur. Yalnızca kalıcı dipol malzemeler veya çözücüler mikrodalgalarla ısıtılabilir. Bir çözücünün mikrodalga enerjisini absorbe etme ve onu ısı biçiminde diğer moleküllere geçirme yeteneği, kısmen dağılma faktörüne ($\tan \delta$) bağlı olacaktır. Dağılma faktörü denklem 2.1 ile ifade edilmiştir:

$$\text{Dağılma faktörü } (\tan \delta) = (\epsilon'') / (\epsilon') \quad (2.1)$$

Mikrodalga absorpsiyonu, elektrik alanı tarafından kalıcı dipollerin yeniden yönlendirilmesiyle meydana geldiğinden, absorbe edilen enerji miktarı, numunenin mikrodalga enerjisini absorbe etme kabiliyetini ölçen solvent dielektrik sabiti (ϵ') ile orantılıdır. Kayıp faktörü veya dielektrik kaybı (ϵ'') ise mikrodalga enerjisini ısıya dönüştürme verimliliğinin bir ölçüsüdür. Polar moleküller ve iyonik çözeltiler (genellikle asitler) mikrodalga enerjisini güçlü bir şekilde emer çünkü mikrodalgalarla etkilenecek kalıcı bir dipol momenti vardır. Ancak hekzan gibi polar olmayan çözücüler mikrodalgalarla maruz kaldığında ısınmayacaktır. Tablo 2.2 'de, uygulamaların % 90' ından fazlasında kullanılan çözücüler için dielektrik sabitleri ve dağılma faktörleri dahil olmak üzere seçilen fiziksel parametreler gösterilmektedir.

Tablo 2.2: MDE' de yaygın olarak kullanılan bazı çözücüler için fiziksel sabitler ve dağılma faktörleri.

Çözücü	Dielektrik sabiti (ϵ')*	Dipol momentii**	Dağılma Faktörü ($\tan \delta \times 10^{-4}$)	Kaynama Noktası (°C)***
Su	78,3	2,3	1570	100
Etanol	24,3	1,96	2500	78

Tablo 2.2 (devam):

Metanol	32,6	2,87	6400	65
Aseton	20,7	2,88		56
Asetonitril	37,5	3,44		82
Hekzan	1,89			69
2-Propanol	19,9	1,66	6700	82

*20°C' de belirlenmiştir.

**25°C' de belirlenmiştir.

***101.4 kPa' da belirlenmiştir.

Metanol ve su arasındaki basit bir karşılaştırma, metanolün daha düşük bir dielektrik sabitine sahip olduğunu ancak sudan daha yüksek bir dielektrik kaybına sahip olduğunu göstermektedir. Bu, metanolün suya kıyasla mikrodalga ışınlarını engelleme yeteneğinin daha düşük olduğunu, ancak mikrodalga enerjisini ısıya dağıtma yeteneğinin daha yüksek olduğunu gösterir (Sparr Eskilsson ve Björklund, 2000).

2.4.2.2. Fenolik Maddelerin Özütlenmesinde Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonun Kullanımı

Literatürde, gıdalardan fenolik bileşiklerin özütlenmesi için mikrodalga enerjisinin kullanımı üzerine pek çok çalışma bulunmaktadır. Bunun başlıca sebepleri MDE sulu çözeltilerin hızlı bir şekilde ısıtılmasına izin vermesi, geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre daha yüksek verimlilik, daha kısa ekstraksiyon süresi, daha düşük solvent tüketimi, hedef moleküllere karşı daha yüksek seçicilik ve daha yüksek otomasyon seviyesi gibi avantajları bulunmasıdır.

Dahmoune ve diğ. *Citrus* limon kabuklarından fenolik bileşiklerin geri kazanımında ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerini yanıt yüzey metodolojisi ile optimize ederek karşılaştırmıştır. MDE için optimum koşullar; çözücü olarak % 48 etanol, 28/1 mL/g çözücü/katı oranı, 123 saniye ekstraksiyon süresi ve 400 W mikrodalga gücü olarak belirlenmiştir. UDE için ise optimum koşulların çözücü olarak % 63,93 etanol, 40/1 mL/g çözücü/katı oranı, 15,05 dakika ekstraksiyon süresi ve %77,79 genlik gücü olduğu

görülmüştür. MDE ve UDE için optimize edilmiş koşullarda öngörülen maksimum toplam fenolik madde (TFM) geri kazanımı sırasıyla 15,74 ve 15,08 mg GAE/g olarak tespit edilmiş ve deneysel sonuçların $15,78 \pm 0,8$ ve $15,22 \pm 0,88$ mg GAE/g olarak model ile uyumlu olduğu görülmüştür. Önerilen MDE yönteminin hem UDE hem de konvansiyonel solvent ekstraksiyonundan daha iyi olduğu görülmüş ve daha kısa çalışma süresi ve daha düşük solvent tüketimi ile daha yüksek geri kazanım verimi ve spesifik antioksidan aktivitesi sağlanmıştır (Dahmoune ve diğ., 2013).

Bir diğer çalışmada endüstriyel elma posasından polifenoller MDE yöntemi ile ekstraksiyonu basit ve verimli bir şekilde, yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak verimin maksimize edilmesiyle geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Araştırmada ekstraksiyon için optimum çalışma koşullarının 650,4 W mikrodalga gücü, 53,7 s ekstraksiyon süresi % 62,1 etanol konsantrasyonu ve 22,9:1 çözücü/katı oranı olarak belirlenmiştir. Validasyon testlerinde polifenol veriminin $62,68 \pm 0,35$ mg GAE/100 mg kuru elma posası olduğu ve öngörülen verim ile uyumlu olduğu saptanmıştır. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri, reflüks ekstraksiyonu ve ultrasonik destekli ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında, MDE yönteminin, daha yüksek verim ve daha düşük solvent tüketimi ile daha verimli bir yöntem olarak önerilmiştir (Bai ve diğ., 2010).

Routray ve Orsat yaptıkları çalışmada fenolik maddelerin eldesi için alternatif bir kaynak olan yaban mersini yapraklarını, daha kısa sürede daha yüksek verim sağlayan ve solvent ekstraksiyonuna kıyasla daha az solvent tüketen MDE ile ekstrakte etmişlerdir. Çalışmada Highbush yaban mersini çeşidi olan "Bluetta" yaprakları, potansiyel olarak zengin bir fenolik bileşik kaynağı olarak gösterilmiş ve mikrodalga destekli ekstraksiyon, bu çalışma sırasında kullanılan ekstraksiyon yöntemleri arasında organik çözücülerden yararlanılarak mümkün olan en kısa sürede fenolik bileşiklerin eldesini sağlayan en iyi ekstraksiyon yöntemi olarak belirtilmiştir. Hem ekstraksiyon süresi hem de mikrodalga güç seviyesinin, fenolik bileşiklerin mikrodalga destekli ekstraksiyonunu etkileyen önemli faktörler olduğu görülmüştür. Ayrıca, ultrasonik destekli ekstraksiyonun, bir mikrodalga ekstraksiyon ünitesinin bulunmaması durumunda yaban mersini yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için potansiyel bir alternatif olabileceği de gözlenmiştir (Routray ve Orsat, 2014).

Hayat ve diğ. turuncgil mandalina kabuklarından fenolik asitlerin eldesi için verimli bir yöntem olan mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemini kullanmıştır. Proses parametreleri yanıt yüzey

metodolojisi ile optimize edilerek 152 W mikrodalga gücü, 49 s ekstraksiyon süresi, 16 sıvı/katı oranı ve % 66 metanol konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Çalışma koşulları belirlendikten sonra fenolik asitlerin ekstraksiyon verimi ve ekstraktın antioksidan aktivitesi geleneksel yöntemlerle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, MDE' nin turunçgil mandalina kabuklarındaki fenolik bileşiklerin kantitatif analizi için hızlı ve güvenilir bir yöntem olabileceğini göstermiştir (Hayat ve diğ., 2009).

Albarri ve diğ. *Moringa oleifera* yapraklarından biyoaktif materyallerin eldesi için mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) yöntemini uygulamıştır. Araştırma ekstraksiyon termodinamik ve kinetiği, difüzyon ve kütle transfer katsayıları üzerine sıcaklık, güç ve ekstraksiyon süresi parametrelerinin etkisini incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. 80 mL çözücüye (% 60 etanol) 1 g *Moringa oleifera* yaprağı ilave edilerek, farklı sıcaklık değerleri (304, 305, 308 ve 309 K), zaman periyotları (30-400 s) ve mikrodalga güç değerleri (200, 300, 400 ve 500 W) altında birkaç kez ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Kinetik çalışmaya göre, uygulanan MDE sistemi için aktivasyon enerjisi 243,367 kJ/mol olarak hesaplanmış, ekstraksiyon hızı sıcaklıkla arttığı gözlemlenmiştir. Artan sıcaklık ile seçilen kütle transfer parametrelerinin paralel olarak yükseldiği görülmüştür. Sonuç olarak, *Moringa oleifera* yaprağının zengin bir biyoaktif içerik kaynağı olduğu gösterilmiştir (Albarri ve diğ., 2021).

Cassol ve diğ. üç farklı ekstraksiyon prosesi uygulayarak hibiscus çanak yapraklarından fenolik bileşenlerinin eldesini incelemiştir. Bulgular incelendiğinde en iyi ekstraksiyon koşulunun 1,63 mg/g antosiyanin, 29,62 mg/g toplam fenolik ve 133,25 μ mol/g antioksidan aktivite değerleriyle 8 dakika süreyle 700 W mikrodalga gücünde gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca MDE ardından asidik sulu çözelti içinde ekstraksiyonun, hibiskustan fenolik bileşiklerin geri kazanılmasında en iyi alternatif olduğunu görülmüştür (Cassol ve diğ., 2019).

2.4.3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

Ultrason, sürdürülebilir "yeşil" kimya ve ekstraksiyon hedefine ulaşmada anahtar teknolojilerden biridir. Ultrasonun kimya ve gıda endüstrisindeki çeşitli işlemlerin verimi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu iyi bilinmektedir. Ultrason kullanılarak, ekstraksiyonlar artık yüksek tekrarlanabilirlik ile dakikalar içinde tamamlanabilir, solvent tüketimini azaltılır, işletme ve çalışmayı basitleştirir, nihai ürünün daha yüksek saflığını sağlar,

geleneksel ekstraksiyon yöntemi için gerekli olan fosil enerjinin yalnızca bir kısmını tüketir ve atık suyun son arıtımını ortadan kaldırır (Chemat ve diğ., 2017).

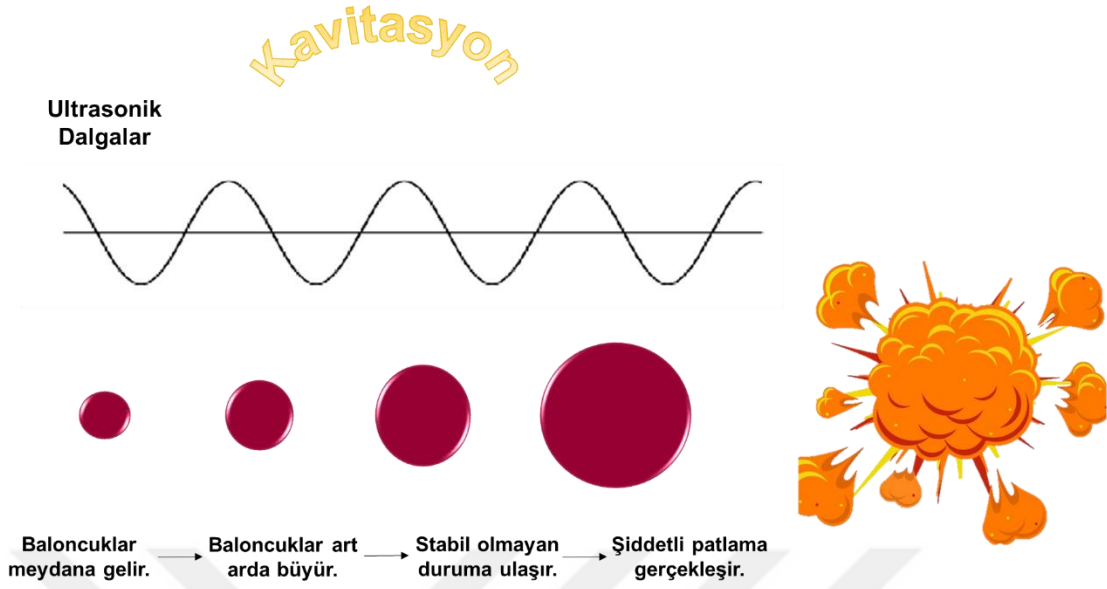
Ultrasonik destekli ekstraksiyon (UDE), biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyon verimliliğini arttırmak için uygun olan yeni, yeşil ve hızlı gelişen bir teknolojidir. Ultrason esas olarak biyolojik matriste kavitasyon kabarcıkları üreterek etki eder bu sayede biyoaktif bileşiklerin yüksek verim ve ekstraksiyon oranlarına ulaştığı bildirilmiştir. Dahası, dikkate değer ekonomik ve çevresel faydalar sağlamakta ve geliştirme-uygulama çalışmaları için büyük bir potansiyele sahiptir (Wen ve diğ., 2018).

2.4.3.1. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Çalışma Prensibi

Ultrason, insan işitsel algılaması için eşik olan frekans değerinin 20 kHz'yi aştığı durum olarak tanımlanmıştır. Ultrasonun çıkış kaynağı genellikle çevreleyen ortamın titreşmesini sağlayan ve ardından ultrason dalgasının enerjisi diğer komşu parçacıklara aktarmasını sağlayan titreşimli bir gövdedir. Ultrasonik proseslerde hayati rol oynayan ana fiziksel parametreler arasında güç, frekans ve genlik bulunmaktadır. Ultrasonik dalgaların ortam boyunca yayıldığı enerji seviyesi, ultrason gücü (W), ultrason yoğunluğu (W/cm) veya akustik enerji yoğunluğu (W/cm veya W/mL) olarak ifade edilebilmektedir.

Bitkisel doku, duvarlarla çevrili hücrelerden oluşmaktadır. Ekstraksiyon mekanizması iki tür fiziksel fenomeni içerir: hücre duvarları boyunca difüzyon ve duvarlar kırıldıktan sonra hücre içeriklerinin yıkanması (durulanması). Her iki olay da ultrasonik ışınlamadan önemli ölçüde etkilenmektedir. Ultrasonik dalgalar, ortamda kavitasyon ve dolayısıyla parçalanma, titreşim, ezilme, karışma gibi etkileri meydana getirerek hücre duvarının kırılmasına neden olarak ve doğal ürün bileşenlerinin ekstraksiyonunu başarılı bir şekilde sağlamaktadır (Chemat ve diğ., 2017; Vilkhue ve diğ., 2007).

Bir sıvıda ultrasonun sonokimyasal etkileri, akustik kavitasyon olayından meydana gelmektedir (Şekil 2.11). Kavitasyon genellikle sıvı bir ortamda bir ultrason dalgasının yayılması sırasında meydana gelen kabarcık oluşumu, büyüme ve içe doğru patlama ile ilgilidir. Kavitasyon, ortamda yüksek kesme kuvvetlerine yol açmaktadır. Bir ürünün yüzeyinde kavitasyon kabarcıklarının patlaması, yüzey soyulması, erozyon ve partikül parçalanması gibi çeşitli etkiler oluşturan mikro jetleme ile sonuçlanır ve ek olarak, sıvı ortamda kavitasyon kabarcıklarının patlaması makro türbülanslara ve mikro karışmaya yol açar.



Şekil 2.11: Kavitasyon oluşumu.

Parçalanma, yüzey alanını arttırarak daha yüksek kütle transferine yol açar ve tam ekstraksiyonu desteklemektedir. Ultrasonik kavitasyon tarafından üretilen erozyon, yerel olarak yüksek sıcaklık ve yerel olarak yüksek basınç sağlamaktadır. Ultrasonun kılcal etkisi, sıvının malzeme gözeneklerine nüfuz etme oranını artırarak kütle transferini de iyileştirir. Hücre duvarlarının bozulması olarak da bilinen doku bozulması, hücre zarları boyunca kütle transferini artırmanın başka bir olgusudur. Sonoporasyon, hücre zarlarının geçirgenliği için ultrason baloncukları tarafından oluşturulur ve dağılımı kolaylaştırmaktadır (Şahin ve diğ., 2018).

Ultrason mekanik bir dalga olduğu için frekans, dalga boyu ve genlik gibi özellikleri akustik kavitasyonu ve dolayısıyla ekstraksiyonu etkileyebilmektedir. Başlangıç gücünün etkisi ile reaktör tasarımı ve şekli, ekstraksiyon verimini etkileyen faktörler arasındadır.

Bir sonokimyasal işlemde uygulanan gerçek akustik gücün ölçümü her zaman rapor edilmemektedir, ancak uygulanan enerjinin doğrudan veya dolaylı ölçümüne izin veren bazı fiziksel yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler, ultrason uygulandığında ortamdaki kimyasal veya fiziksel değişiklikleri ölçerek aktarılan enerjiyi tahmin eder. En yaygın fiziksel yöntemler, hidrofonlar veya optik mikroskoplar kullanılarak akustik basıncın ölçülmesi ve kalorimetrik yöntemlerdir. Örnek olarak, gücü kalorimetre ile hesaplamak için, cihazdan gerçek giriş gücünün ortamda dağılan ısıya dönüştürüldüğü düşünülmektedir.

Çeşitli çalışmalar, yüksek ultrasonik gücün daha büyük kesme kuvvetleri oluşturarak (ortamın doğasına ve özelliklerine bağlı olarak) malzemelerde büyük değişikliklere neden olduğunu göstermektedir; bununla birlikte, gıda endüstrisinde bu parametre genellikle en iyi sonuçları elde etmek için minimum gücü kullanmak üzere optimize edilmektedir. Genel olarak, UDE' nin ekstraktların verimi ve bileşimi açısından en yüksek verimliliği, ultrason gücünü artırarak, çözücü-katı temasını artırmak için gıda matrislerinin nemini azaltarak ve daha kısa bir ekstraksiyon süresine izin verecek şekilde sıcaklığı optimize ederek elde edilebilmektedir. Bununla birlikte, ultrasonik dalga frekansı da ekstraksiyon sürecini etkilemektedir. UDE süreçlerinde en sık kullanılan frekans değerleri 20 kHz ile 100 kHz arasındadır. Ultrasonik destekli ekstraksiyon için daha yüksek frekansların kullanımı sadece birkaç çalışmada araştırılmıştır. Ultrason frekansı arttıkça sıvıda kavitasyon üretimi ve yoğunluğu azalmaktadır. Kavitasyon kabarcıklarının büyüdüğü evre olan seyrekleşme aşamasında belirli bir süreye ihtiyaç duyulur, bu aşamanın kısa olması kavitasyon kabarcıklarının büyümesi için yetersiz olmaktadır. Seyrelme aşamasının uzunluğu ile ultrasonik frekansla ters orantılıdır; bu nedenle yüksek frekanslarda, kavitasyon oluşturmak için daha büyük genlikler ve yoğunluklar gereklidir (Chemat ve diğ., 2017).

2.4.3.2. Fenolik Maddelerin Özütlemeinde Ultrasonik Destekli Ekstraksiyonun Kullanımı

Ultrason destekli ekstraksiyon, ucuz, kurulumu kolay, zamandan tasarruf sağlayan ve çevre dostu proses olmasının yanı sıra kütle ve ısı transferini artırması, küçültülmüş ekipman boyutu ve "yeşil kimya" için önemli olan güvenilir çözücülerin kullanımına izin vermesi avantajlarından dolayı son yıllarda önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle UDE, gıda, ilaç ve arıtma endüstrilerinde zaman ve enerji tasarrufu için tercih edilmektedir (Şahin ve diğ., 2015).

Tian ve diğ. çalışmasında nar çekirdeği yağının ultrasonik destekli ekstraksiyonunun verimini, çeşitli çözücüler kullanılarak değerlendirmiştir. Çalışmada yağ ekstraksiyonu için en etkili çözücünün sırasıyla petrol eteri, n-hekzan, etil asetat, dietil eter, aseton ve izopropanol olduğu görülmüştür. Ultrasonik güç, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve çözücü hacmi/tohum ağırlığı oranı gibi çeşitli parametrelerin etkisi yanıt yüzey metodolojisi yardımıyla incelenmiştir. En yüksek yağ verimi, 140 W ultrason gücü, 40° C ekstraksiyon sıcaklığı, 36 dak ekstraksiyon süresi ve 10 mL çözücü hacmi/tohum ağırlığı oranı için en uygun koşullar altında petrol eteri kullanılarak % 25,11 olarak elde edilmiştir. UDE ile ekstrakte edilen nar çekirdeği

yağı veriminin, sokslet ekstraksiyonu (% 20,50) ve süperkritik sıvı ekstraksiyonu (% 15,72) kullanılarak elde edilenden önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Tian ve diğ., 2013).

Bir başka çalışmada gıda sınıfı çözücü olarak etanol kullanılarak pirinç kepeğinden polifenollerin ve antioksidanların ekstraksiyonu için ultrasonik teknoloji uygulanmıştır. Yanıt yüzey metodolojisi (RSM), polifenollerin ve antioksidanların ekstraksiyonu için deney koşullarını optimize etmek için kullanılmıştır. Çözücü konsantrasyonu (%), sıcaklık (° C) ve zaman (dakika) gibi üç bağımsız değişkenin etkisi incelenmiştir. Etanol konsantrasyonunun etkisinin tüm yanıtlar üzerinde önemli olduğu bulunmuştur. Toplam fenolik içeriği 2,37 ile 6,35 mg gallik asit eşdeğeri / g kuru örnek arasında değişmiştir. Araştırma sonucunda ultrasonik destekli ekstraksiyonun, ekstraksiyon için çözücülerin, sıcaklığın, sürenin ve su tüketiminin azaltılması gibi birçok avantaj sunduğu görülmüştür. Bu nedenle, pirinç kepeğinden ultrasonik destekli antioksidan ekstraksiyonu, sentetik antioksidanların yerini almayı amaçlayan doğal antioksidanlar açısından zengin ekstraktların hazırlanması için çevre dostu bir işlem olarak belirtilmiştir (Tabaraki ve Nateghi, 2011).

Rodsamran ve Sothornvit' in araştırmasında yeşil limon kabuğu atıklarından mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yardımıyla doğal fenolik bileşiklerin elde incelenmiştir. Üç seviyeli ve üç faktörlü Box-Behnken tasarımına sahip bir yanıt yüzey metodolojisi, toplam fenolik içerik, antioksidan aktivite ve yarı maksimum inhibitör konsantrasyona dayalı olarak her bir ekstraksiyon parametresinin optimal koşullarını tahmin etmek için kullanılmıştır. Öngörülen optimum koşullarda ultrasonik destekli ekstraksiyonun mikrodalga destekli ekstraksiyona göre yüksek antioksidan kapasiteli toplam fenolik madde eldesinde (54,4 mg GAE/g) zamandan %33 tasarruf sağlayarak daha verimli olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda UDE' nin gıda endüstrisi için doğal antioksidan ekstraktlarının hazırlanmasına yönelik bir teknik olarak güçlü bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (Rodsamran ve Sothornvit, 2019).

Şahin ve Şamlı, zeytinyağı ve sofralık yağ üretimi endüstriyel atıklarından ve zeytin ağacı (*Olea europaea*) yaprağı tarımsal atıklarından polifenollerin UDE yöntemiyle eldesini incelemiştir. Çalışmada çözücü konsantrasyonu (% 0 - 100 etanol (EtOH), v/v), çözücü/katı oranı (25 - 50 mg/mL), ekstraksiyon süresi (20 - 60 dk) parametrelerini inceleyerek yanıt yüzey metodolojisi aracılığıyla bu parametrelerin mümkün olan en iyi kombinasyonlarının eldesi amaçlanmıştır.

Sonuçlar incelendiğinde zeytin ağacı (*Olea europaea*) yaprağının, polifenoller açısından zengin potansiyel bir kaynak olduğu görülmüştür. UDE aracılığıyla maksimum ekstraksiyon performansına ulaşmak için, optimum çalışma koşulları olarak % 50 EtOH, 500 mg kuru yaprak/ 10 mL çözücü ve 60 dakika süre belirlenmiştir. İncelenen parametreler arasında çözücü konsantrasyonunun UDE tarafından elde edilen ekstraksiyon performansını etkileyen en önemli parametresi olduğu kanıtlanmıştır (Şahin ve Şamli, 2013).

UDE yönteminden yararlanılan bir diğer çalışmada Campbell Early üzüm tohumundan değerli fenolik bileşenlerin eldesi araştırılmıştır. Fenolik bileşiklerin, antioksidan aktivitelerin ve antosiyaninlerin maksimum ekstraksiyonu için yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak etanol konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin mümkün olan en iyi kombinasyonları belirlenmiştir. Fenoliklerin ve antioksidanların ekstraksiyonu için ekstraksiyon süresinin oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. YYM ile üzüm çekirdeğinden UDE için elde edilen optimal koşullar % 53,15 etanol, 56,03° C sıcaklık ve 29,03 dk olarak belirlenmiştir. Belirtilen koşullar altında elde edilen sonuçlar öngörülen değerlerle uyumlu olmuştur. UDE' nin mevcut ekstraksiyon süreçlerini iyileştirebileceği ve yeni ticari ekstraksiyon fırsatları ve süreçlerini etkinleştirebileceği sonucuna varılmıştır (Ghafoor ve diğ., 2009).

Oancea ve diğ. güçlü farmakolojik ve antioksidan etkileri ile bilinen, antosiyanin bakımından zengin olan böğürtlen ve kiraz meyvelerinden zenginleştirilmiş antosiyanin ekstraktı elde etmek için geleneksel yöntem ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemini karşılaştırmışlardır. Geleneksel yöntemde antosiyanin eldesi için 2 saat ve 24 saat süreyle 4° C sıcaklıkta kesikli olarak ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak hidroetanolik çözelti ve asitleştirilmiş etanol çözeltisi kullanılmış ve tüm denemelerde asitleştirilmiş etanol çözeltisi ile daha yüksek verim elde edilmiştir. UDE' de böğürtlen meyvesinde en yüksek geri kazanılan antosiyanin içeriği (107,81 mg/100 g FM) 10/1 çözücü / katı oranı ile 30° C'de 5 dakika süreyle elde edilmiştir. Kiraz meyvesinden maksimum antosiyanin ekstraksiyon verimi elde etmek için optimum UDE koşulları, 15/1 katı/çözücü oranı ve 30° C' de 5 dakika olarak belirlenmiştir. UDE teknolojisi, farklı mahsul çeşitlerinden, yabani floradan veya gıda endüstrisinin yan ürünlerinden elde edilen antosiyaninlerin kantitatif değerlendirilmesinde önce gelen hızlı bir yöntem olarak kullanılabildiğinden, pratik açıdan ilgi çekici bulunmuştur. Etkili ultrasonik cihazların tasarımındaki iyileştirme, standart bir tekniğin

geliştirilmesine yol açabileceği ve gelecekte büyük ilgi çekeceği düşünülmüştür (Oancea ve diğ., 2013).

2.4.4. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon

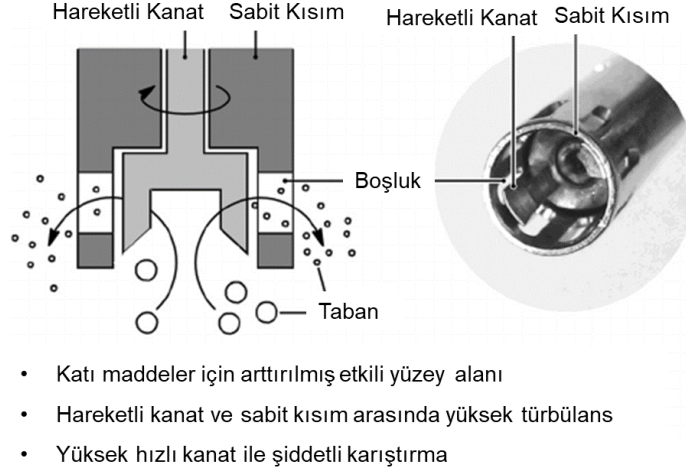
Rotor-stator homojenizatörleri, rotor (döner mil) ile stator (sabit kısım) arasında küçük bir boşluk ve ayrıca boşlukta çok yüksek kesme hızları ve stator bölgesinde çok yüksek enerji kaybı oranları oluşturan yüksek bir rotor uç hızı ile karakterize edilirler (C. Liu ve diğ., 2013). Rotor-stator homojenizatörlerin, katı-sıvı faz-transfer reaksiyonlarını hızlandıran etkili bir karıştırma aracı olduğu bilinmektedir (Kano ve diğ., 2016).

2.4.4.1. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyonun Çalışma Prensibi

Döner mil ve sabit kısım arasındaki yüksek hız ve minimum boşluk, partikül boyutunun küçültülmesi ve şiddetli karıştırma ile sonuçlanan son derece güçlü kesme kuvvetleri üretmektedir. Rotor-stator homojenizatörlerin bu özellikleri, katı maddelerin kullanıldığı faz-transfer reaksiyonları için çok uygun ortam sağlamaktadır.

Bu cihazların, diğer homojenizasyon tekniklerine kıyasla çeşitli avantajları vardır, örneğin: kurulumu ve çalışması nispeten kolay; nispeten düşük yatırım maliyetleri gerektirir; nispeten yüksek verim; viskoz sistemlerle uyumlu; büyük hacimli emülsiyon hazırlığına vb. izin verir. Homojenizatörlerde etkili damla ayrılma enerjisi, türbülanslı akıştaki atalet ve kesme kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır (Gazolu-Rusanova ve diğ., 2020).

Rotor-stator düzeneği, iki veya daha fazla kanattan oluşan bir rotor (hareketli kısım) ve homojenleştirici hücrenin duvarı etrafında dikey veya eğimli boşluklara sahip bir statordan (sabit kısım) oluşur. Rotor, statorun içinde eşmerkezli olarak yerleştirilmiştir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Rotor- stator homojenizatör (Kano ve diğerleri, 2016).

Hareketli kısım döndükçe, sıvıyı düzeneğin içine ve dışına çekmek için bir vakum oluşturur, böylece ortamda bir sirkülasyon meydana gelir. Dağılmış damlacıkların boyutunu azaltabilen iki ana kuvvetten biri, yüksek sıvı ivmesi nedeniyle duvara doğru mekanik çarpma kuvvetidir. Diğer bir kuvvet ise, esas olarak rotor ve stator arasındaki boşlukta yer alan kesme kuvvetidir. Yüksek dönüş hızlarında, bu bölgedeki akış oldukça çalkantılıdır ve farklı ölçeklerde girdaplar içerir. Standart bir manyetik karıştırıcı yerine rotor-stator homojenleştirici ile karıştırarak kütle transfer reaksiyonlarının daha hızlı olduğu görülmüştür (Kano ve diğ., 2016).

2.4.4.2. Fenolik Maddelerin Özütlenmesinde Homojenizatör Destekli Ekstraksiyonun Kullanımı

Bilgin ve diğ., kızıl adaçayı (*Salvia coccinea*) yapraklarını, yeni teknolojiler kullanma amacıyla homojenizatör destekli ekstraksiyon ve ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemleriyle su, etanol, metanol ve bu solventlerin sulu karışımları ile ekstrakte etmiştir. Elde edilen en iyi sonuçlar, geleneksel Soxhlet yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. En yüksek ekstraksiyon verimi 368,87 mg/g KM değerinde saf su ile elde edilmiş ve en yüksek toplam fenolik içerik 43,18 mg-GAE/g KM olarak % 100 metanol ve her iki sonuçta HDE yöntemi ile elde edilmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçları, HDE ve UDE' nin, karıştırma ve ultrasonik gibi bazı yardımcı tekniklerin uygulanması nedeniyle daha az zaman ve solvent tüketimi gerektirdiklerinden,

çevre dostu ve geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine ekonomik alternatifler olduğunu göstermektedir. Ayrıca alkole su ilavesinin, suyun bitki matrisi üzerindeki şişme etkisinin bir sonucu olarak, yüksek antioksidan kapasiteye sahip toplam fenoliklerin ekstraksiyonunu iyileştirdiği görülmüştür (Bilgin ve diğ., 2013).

Viscum album L. (Ökseotu), birçok ülkede çeşitli amaçlarla kullanılan en ünlü bitkilerden biridir. Stefanucci ve diğ. çalışmalarında ökseotu bitkisinin çeşitli kısımlarını (yaprak, meyveler ve tohumlar) kimyasal profillerini ve biyolojik aktivitelerini tanımlamak amacıyla HDE ve UDE yöntemleriyle ekstrakte etmişlerdir. Biyolojik değerlendirme için antioksidan (radikal süpürme, indirgeme gücü, metal şelasyonu ve fosfomolibdenum deneyleri) ve enzim inhibe edici özellikler (kolinesterazlar, amilaz, glukozidaz ve tirozinaz) seçilmiştir. Bitkinin kimyasal profili HPLC - MS / MS ile incelenmiş ve özütlerde 32 bileşik tanımlanmış; kafeoilkinik asitler ve türevleri, dimetile flavonoidlerin en önemli bileşenler olduğu görülmüştür. Ekstraksiyon için gerekli süreler karşılaştırıldığında, homojenizasyon 5 dakika ile en hızlı yöntem iken, ultrasonikasyon için 30 dakikaya ihtiyaç duyulmuştur. Çalışma sonucunda UDE yönteminin, hücre duvarlarının bozulmasından sonra hücre içeriğinin salınmasına neden olan bitki hücre duvarlarının yakınında kavitasyon kabarcıklarına neden olan ses dalgalarının üretimini içerdiği, HDE' nin ise, yüksek hızlı karıştırması nedeniyle, bitki matrisindeki morfolojik değişikliği etkilediği ve bu nedenle bileşiklerin daha hızlı salınmasına neden olur ve bu nedenle ekstraksiyon işlem süresini önemli ölçüde azaltır. Sonuçlar, daha yüksek derecede bir parçalanmanın, hücre duvarında önemli bir bozulmaya neden olduğunu ve hücre içi molekülleri kolayca serbest bıraktığını göstermiştir (Stefanucci ve diğ., 2020).

Bir diğer çalışmada, bir tür muz olan (*Musa paradisiaca L.*) kabuklarının klorofil a, b ve toplam içeriğinin belirlenmesi amacıyla HDE yöntemiyle ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve katı/çözücü oranı, karıştırma hızı ve ekstraksiyon süresi gibi faktörler optimizasyon parametresi olarak alınarak Box – Benhken tasarımı yapılmıştır. Proses değişkenlerinin (katı / çözücü oranı, karıştırma hızı (dakika başına devir, rpm) ve HDE'de ekstraksiyon süresi) klorofil a, b ve toplam içerik üzerindeki bireysel etkisi ve etkileşimleri incelenmiştir. Optimum çalışma koşulları, 0,025 g/L katı/çözücü oranı, 13508 rpm karıştırma hızı ve 90 s ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Öngörülen değerler ile deneysel sonuçların uyumlu olduğu ve HDE yönteminin geleneksel yöntemden (maserasyon) daha verimli olduğu tespit edilmiştir (Ordóñez-Santos ve Garzón-García, 2021).

Eyiz ve diğ. fenolik asitler, flavonoidler ve antosiyaninler gibi fitokimyasal içeriği yüksek olan üzüm posasından bu bileşiklerin eldesi için HDE yöntemiyle optimizasyon gerçekleştirmişlerdir. Cevap değişkenleri olarak toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içeriği, serbest radikal temizleme aktivitesi, toplam monomerik antosiyanin içeriği, toplam proantosiyonidin ve askorbik asit içeriğinin seçildiği çalışmada, çözücü konsantrasyonu ve sıvı/katı oranı bağımsız değişken olarak belirlenmiştir. Çözücü olarak ucuz, toksik olmayan ve yeşil çözücü sınıfından olan gliserol tercih edilmiştir. Karışım, bir homojenizatör kullanılarak önce 30 saniye süreyle 10.000 rpm'de ve ardından 30 saniye süreyle 15.000 rpm'de homojenize edilmiştir. Araştırma sonucunda, gliserol konsantrasyonunun tüm yanıt değişkenlerini önemli ölçüde etkilediğini ve konsantrasyonun artmasının fitokimyasalların daha yüksek ekstraksiyonu ile sonuçlandığını görülmüştür. % 50 (w/v) gliserol konsantrasyonu ve 22.4 sıvı/katı oranı üm yanıtları maksimize etmek için optimum koşul olarak belirlenmiş ve deneysel olarak doğrulanmıştır. Genel olarak, çalışma, yeşil bir çözücü olarak gliserol kullanarak homojenizatör destekli ekstraksiyonun, gıda işleme yan ürünlerinden fitokimyasalların ekstraksiyonu için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir (Eyiz ve diğ., 2020).

Muz kabuklarının geri kazanımının amaçlandığı bir diğer çalışmada toplam fenolik bileşiklerin eldesi için homojenizatör destekli ekstraksiyon kullanılmıştır Yanıt yzey metodolojisinden yararlanılarak muz kabuğundan TFM ekstraksiyonu üzerindeki etanol çözücü konsantrasyonu (% 20-70, v/v) ve katı-çözücü oranı (% 2.5-7.5, w/v) etkisi değerlendirilmiştir. Optimum koşullar % 54 (v/v) etanol konsantrasyonu ve % 7.5 (w/v) katı-çözücü oranı olarak belirlenmiş ve bu koşullarda sadece 30 saniyelik ekstraksiyon ile muz kabuğundan yüksek bir TFM içeriği (2.44 g GAE/100 g km) sağlanmıştır. HDE' nin, bitki materyalinden antioksidan bileşiklerin güvenli, hızlı ve düşük çevresel etkiye sahip ekstraksiyonunda kullanılabileceği sonucu bildirilmiştir (Pereira ve diğ., 2017).

Yeşil ve sürdürülebilir teknolojiler kullanarak gıda atıklarının değerlendirilmesi gelecekteki ekonomik modellerin geliştirilmesi hakkındaki tartışmaların merkezinde yer almaktadır. Bu düşünceyle biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonuna odaklanan, entegre bir mango atık biyorefineri konseptine dayalı fizibilite ve teknolojik olanaklar araştırmak amacıyla Zuin ve diğ. mango atıklarından biyoaktif bileşenlerin eldesi üzerine çalışmışlardır. Ek olarak, istatistiksel açıdan sağlam bir metodoloji, sürdürülebilir, düşük zaman ve enerji tüketimi sağlayan HDE tekniğinin (homojenizatör destekli ekstraksiyon) değişkenlerini optimize

edilmiştir. Biyoaktif bileşiklerin maksimum konsantrasyonları benzer çalışma koşullarında elde edilmiştir. Etanol/su konsantrasyonu (%67,73-70,11) katı/sıvı oranı (%29,33-28,17) ve ekstraksiyon süresi (4,47-5,00 dk) şartlarında mangiferin içeriği 354,4 mg/kg km ve hiperosit içeriği 258,7 mg/kg km olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, entegre bir mango biyorafinerisi konseptine dayalı olarak Brezilya'da çok yaygın ve önemli bir tropikal meyve atığından biyoaktif bileşikler elde etmek için önerilen HDE yönteminin etkinliğini göstermiştir (Zuin ve diğ., 2020).

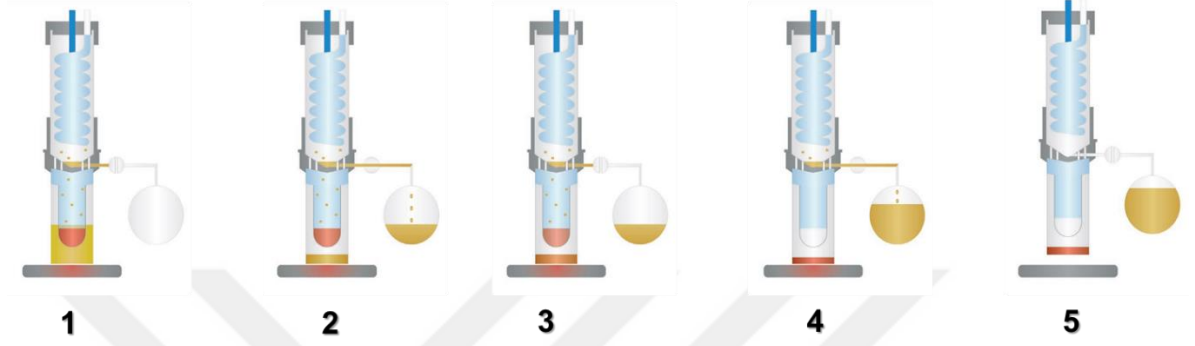
2.4.5. Otomatik Çözücü Destekli Ekstraksiyon

Son yıllarda hammadde temini ve sürdürülebilirlik açısından biyokütlenin değerlendirilmesi acil bir zorunluluk haline gelmiştir. Fosil yakıtlardan üretilen malzemeler zamanla tükenmektedir ve öte yandan bitkiler gibi doğal hammaddeler, dünya çapında birçok hastalığa karşı tedavi için potansiyel bir kaynak olmuştur. Henüz tespit edilmemiş, biyolojik olarak aktif bileşenlerine sahip çok sayıda bitki çeşidi vardır. Ayrıca söz konusu maddelerin elde edilme yöntemleri de ürünün değerini etkileyen bir diğer çarpıcı faktördür. Bu nedenle, uygulanan işlemler, ilgili biyolojik aktif maddeleri elde etmek için biyo-dönüşümün gerçekleştiği hayati aşamadır (Şahin ve diğ., 2021). Mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon gibi yüksek katma değerli ürünlerin geri kazanımı için alternatif prosesler ve bunların mikrodalga destekli enzimatik ekstraksiyon, ultrasonik destekli enzimatik ekstraksiyon ve ultrasonik mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi kombinasyonları literatüre tanıtılmıştır. Son zamanlarda, “yeşil ekstraksiyon” ilkelerini gözetmek amacıyla otomatik sokslet ekstraktör ve otomatik çözücü ekstraktörü gibi otomatikleştirilmiş ekipmanlar üretilmiştir (Chemat ve diğ., 2019).

2.4.5.1. Otomatik Çözücü Ekstraksiyonunun Çalışma Prensibi

Sokslet ekstraksiyonunun özellikleri (aşırı uzun ekstraksiyon süreleri, yüksek solvent tüketimi, ısıya ve ışığa aşırı maruz kalma) düşünüldüğünde, otomatik çözücü ekstraksiyonunun (OÇE) doğal ürünlerden fenolik bileşenlerin eldesi için mükemmel bir alternatif olabileceği düşünülmüştür. Otomatik çözücü ekstraksiyonu solvent kullanımını azaltarak ekolojik dengeye katkı sağladığı gibi verimi de arttırmaktadır. Geleneksel sokslet yönteminin olumsuz yönlerini ortadan kaldıran OÇE, beş kat daha hızlı sonuç vermektedir. Diğer açılardan OÇE, daha kısa

proses yollarına ve daha hassas bir ekstraksiyon sürecine izin vermektedir (Geiss ve diğ., 2018). Gelişmiş yazılım ve güvenli yazılımı ile güvenli ve güçlü ısıtma, tekrarlanabilir ekstraksiyon süreçlerini sağlamaktadır. Bu gelişmiş katı-sıvı ekstraksiyon işlemi ile çözücü katı matrisinden 5 adımda uzaklaştırılarak geri kazanılmaktadır (Şekil 2.13):



Şekil 2.13: Otomatik çözücü ekstraksiyonu proses aşamaları (“SER 158 Series Automatic Solvent Extractor”, 2021).

1. Daldırma: Etkili bir kütle transferi sağlamak için katı örneğin kaynayan çözücü içerisine daldırıldığı aşamadır.
2. Uçurma: Çözücü seviyesi otomatik olarak ekstraksiyon kartuşunun altına indirilir. Çözücünün bir kısmı geri kazanım tankında toplanır, geri kalanı numune üzerinden akmaya devam eder.
3. Yıkama: Yoğunlaştırılmış olan çözücü, ekstraksiyon işlemi tamamlamak amacıyla numune üzerinden ve kartuş içerisinden akarak yıkama gerçekleştirir.
4. Geri Kazanım: Ekstraksiyonun büyük oranda tamamlandığı ve çözücünün % 90' ından fazlasının geri kazanıldığı aşamadır.
5. Soğutma: Ekstraksiyon tamamlanır ve ısıtıcılar kapatılır. Ekstraktları içeren kaplar, özütlenen maddenin yanmasını önlemek için otomatik olarak yukarı kaldırılır.

Cam-seramikten yapılmış olan yüksek hızlı ısıtma plakaları sayesinde çözücünün hızlı bir şekilde kaynama noktasına ulaşması sağlanır. Titanyum kondansatörler, soğutulmuş geri kazanım tankında toplanan çözücünün %90 seviyelerinde geri kazanımını gerçekleştirir. OÇE ile çözünür maddenin aşırı ısınması ve yanması önlenir. Belirlenen yöntemler kayıt edilerek, proses şartları sabitlenir. OÇE ile özellikle daha yüksek ekstraksiyon sıcaklıklarında geniş

çözücü çeşitliliği sayesinde basınç yükseltilerek ekstraksiyon karışımlarının sıvı halde tutulabilir.

2.4.5.2. Fenolik Maddelerin Özütlenmesinde Otomatik Çözücü Ekstraksiyonunun Kullanımı

Şahin ve diğ. *Hibiscus sabdariffa* örneklerinden fenolik bileşenlerin eldesi için OÇE yöntemini kullanmışlardır. “Yeşil kimya” ilkeleriyle yürütülen çalışmada çözücü olarak fiyat, güvenlik ve sağlık açısından uygun olan etanol seçilmiştir. Ekstraksiyon sisteminde proses parametreleri etanol konsantrasyonu (% 10 – 80), yıkama süresi (40- 60 dk) ve katı *Hibiscus sabdariffa* (0,5 – 2 mm) numunesinin partikül boyutu olarak belirlenmiştir. Yanıt yüzey metodolojisinin uygulandığı çalışmada proses yanıtı olarak toplam fenolik içeriği ve toplam antosiyanin içeriği olarak seçilmiştir. Optimum koşulların %80 etanol konsantrasyonu, 60 dk yıkama süresi ve 0,5 mm partikül boyutu olarak belirlenmiş ve bu şartlarda 164,695 mg-GAE/g toplam fenolik madde, 28,349 mg-C3G/g antosiyanin içeriği olduğu görülmüştür. Çalışma sonucunda otomatik solvent ekstraksiyonunun, daha az zaman, solvent tüketimi, ısı ve ışığa maruz kalma açısından biyokütle / biyoatıkların değerli kimyasallara dönüştürülmesi için iyi bir alternatif olabileceği kararlaştırılmıştır (Şahin ve diğ., 2021).

Geniş beslenme ve biyo-fonksiyonel amaçlar için uygun olan *Xanthoceras sorbifolia* altın boynuz tohumu yağının içeriği subkritik n-bütan, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve otomatik çözücü ekstraksiyon yöntemleri ile incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Çalışmada, tohum yağının yağ verimi, fizikokimyasal özellikleri, yağ asidi profili, Fourier dönüşümü kızılötesi spektrumları, tokoferol içeriği, antioksidan aktivitesi, oksidatif ve ısıl kararlılığı ve reolojik özellikleri analiz edilmiştir. Elde edilen verilerde otomatik çözücü ekstraksiyonunun %97,29 verimine karşılık, subkritik n-bütan ile %58,79, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile %56,47 verim sağlanmıştır. Ekstrakte edilen tüm yağların linoleik asit (379,61-385,86 mg/g yağ) ve oleik asit (276,58-285,77mg/g yağ) bakımından zengin olduğu, yüksek termal stabilite ve Newtonian akış davranışında olduğu görülmüştür (Gu ve diğ., 2019).

Aryee and Simpson’ ın somon derisinden çözücü ile ekstrakte edilmiş yağın verimi ve kalitesi üzerine yapmış olduğu karşılaştırmalı çalışmalarda; atlantik somon derisinden yağ eldesi için farklı çözücü sistemleri uygulanmıştır. Geleneksel çözücü ekstraksiyonu ve otomatik çözücü konsantrasyonunun kıyaslandığı araştırmada elde edilen yağ verimi ve yağların içerdiği serbest

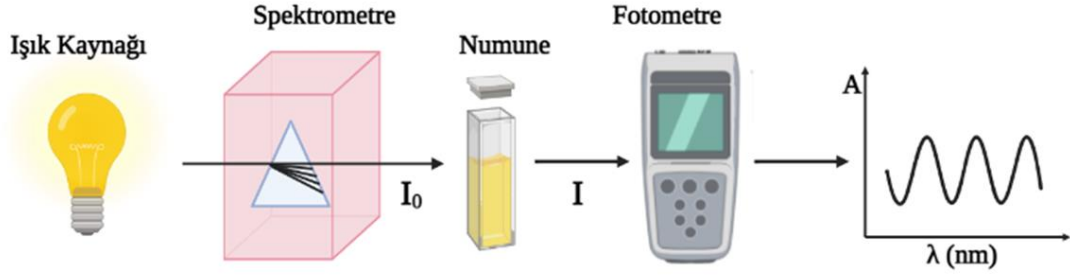
yağ asidi miktarı incelenmiştir. Geleneksel sokslet yönteminden sonra geliştirilen OÇE yönteminin bir grup numuneyi tamamlamak için gereken ekstraksiyon süresini önemli ölçüde azalttığı, gerekli çözücü miktarını azalttığı ve çalışma sonunda solvent geri kazanımı sağladığı belirtilmiştir. OÇE yönteminin deneysel sonuçları, ekstraksiyon süresinde ve çözücü hacminde önemli kazanımla birlikte, geleneksel sokslet yöntemine göre daha yüksek yağ verimi göstermiştir. Daha güvenli kullanım ve petrol eteri ile karşılaştırıldığında daha ucuz heksan fiyatı ile birlikte, çözücü olarak heksan kullanıldığında daha yüksek miktarda yağ geri kazanılmıştır. Bu yöntemin, hızlı ve güvenli ekstraksiyon prosedürünün rahatlığını sağladığı belirtilmiştir (Aryee ve Simpson, 2009).

2.5. FENOLİK BİLEŞİKLER İÇİN ÇEŞİTLİ TAYİN YÖNTEMLERİ

2.5.1. Spektrofotometrik Yöntemler

UV-Vis spektroskopisi, UV ve görünür ışığın 200 ile 780 nm dalga boyu aralığında farklı kimyasal bileşiklerle etkileşimlerini izleyip ölçebilen bir yöntemdir. Teknik, örnek içindeki absorpsiyon, saçılma, kırınım, kırılma ve yansıma gibi farklı fiziksel ışık ve analit tepkilerini kullanmaktadır. UV ve görünür ışık absorpsiyonu fenomeni, spesifik kromoforlar ve tanımlanmış moleküler fonksiyonel gruplara sahip çeşitli kimyasal türlerle sınırlıdır. UV-Vis spektroskopisine dayalı kantitatif analiz, nihayetinde Beer-Lambert yasası tarafından tanımlanmıştır ve molekül tarafından emilen gelen ışığın miktarı, numune, ışık yolu uzunluğu ve matristeki emici bileşik veya molekül konsantrasyonu arasındaki korelasyondur. Ayrıca yöntem, gıda matrisi içindeki hedef molekül konsantrasyonunun belirlenmesine ve ölçülmesine izin vermektedir.

Spektrofotometre cihazı, ışık kaynağı, dedektör ve dalgaboyu seçicisi kısımlarını içermektedir. Optik sinyal dedektör tarafından elektrik sinyaline dönüştürülür ve kaydedilir. Bu temel kısımlar dışında, gelen ışığı toplayan, odaklayan, yansıtan, iki ayrı parçaya bölen ve numuneye gönderen mercekler, aynalar, ışık bölücüleri ve giriş-çıkış yarıkları bulunur. Numuneler, uygun dalgaboyu alanında cam, kuartz materyallerden yapılmış ışık prizmalarına aktarılarak ışık yoluna konur (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Spektrofotometre çalışma prensibi.

Kullanılan ışık kaynağı, spektrofotometre cihazı gibi etkenlerden ufak değişiklikler kaynaklanabileceği için yüzde geçirgenlik “Transmitans” ya da yüzde absorpsiyon terimi kullanılır. Spektrofotometreden geçen ışık miktarı ile fotometreye gelen ışık arasındaki fark absorbans değerini verir. Absorbans değeri Beer-Lambert yasası ile hesaplanır (Denklem 2.2-2.3).

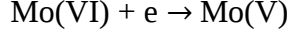
$$\text{Işığın geçme miktarı (Transmitans): } T = \frac{I}{I_0} \quad (2.2)$$

$$\text{Absorbans: } A = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.3)$$

2.5.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayin Yöntemi

Kolorimetrik reaksiyonlar uygulaması kolay, hızlı ve rutin laboratuvar kullanımında uygulanabilir ve düşük maliyetli olması sebebiyle UV / VIS spektrofotometrik tayinlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Folin Ciocalteu reaktifi (FCR) ilk olarak reaktifin protein tirozin (bir fenol grubu içeren) kalıntısına yönelik aktivitesinden yararlanarak proteinlerin analizi için tasarlanmıştır. Yıllar sonra, Singleton ve diğ. bu testi şaraptaki toplam fenollerin analizinde uygulamış ve daha sonra yöntem pek çok uygulamada yaygınlaşmıştır. FCR genellikle sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 g), sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 g), konsantre hidroklorik asit (100 mL), % 85 fosforik asit (50 mL) ve su (700mL) karışımının ilk kaynatılmasıyla (10 saat) yapılır. Kaynattıktan sonra, FC reaktifine karışıma yoğun sarı bir renk vermesi için lityum sülfat ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 150 g) ilave edilir. FC reaktifinin kimyasal yapısı tam olarak bilinmemekle beraber heteropolifosfotun – molibdatlar içerdiği düşünülmektedir (Huang ve diğ., 2005). Reaksiyonda, bir “fosfotungsticphosphomolybdenum kompleksi” tarafından oluşturulan mavi bir kromofor meydana gelir; burada kromoforların

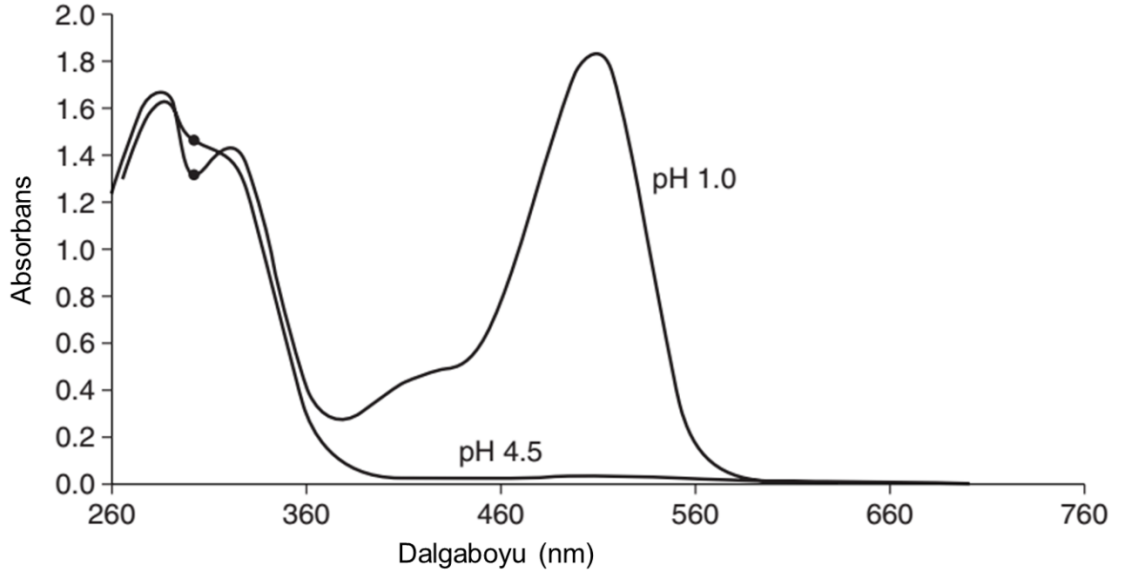
maksimum absorpsiyonu, alkali çözeltiye ve fenolik bileşiklerin konsantrasyonuna bağlıdır (Blainski ve diğ., 2013). Esasen, komplekste molibdenin indirgenmesinin daha kolay olduğu ve indirgeyiciler ile Mo (VI) arasında elektron transfer reaksiyonunun meydana geldiğine düşünülmektedir:



FC reaktifi fenolik bileşikler için spesifik değildir, çünkü birçok fenol olmayan bileşik (örn., C vitamini, Cu (I), vb.) tarafından indirgenebilmektedir. Fenolik bileşikler, FCR ile yalnızca bazik koşullar altında reaksiyona girer. Bu nedenle yöntemde çözelti ortamı sodyum karbonat çözeltisi ile pH -10'a ayarlanmıştır. FCR' nin tanımlanmamış kimyasal yapısına rağmen, FCR ile yapılan toplam fenol analizi uygun, basit ve tekrarlanabilir. Sonuç olarak, büyük miktarda veri toplanarak ve fenolik antioksidanların çalışılmasında rutin bir deney haline gelmiştir (Huang ve diğ., 2005).

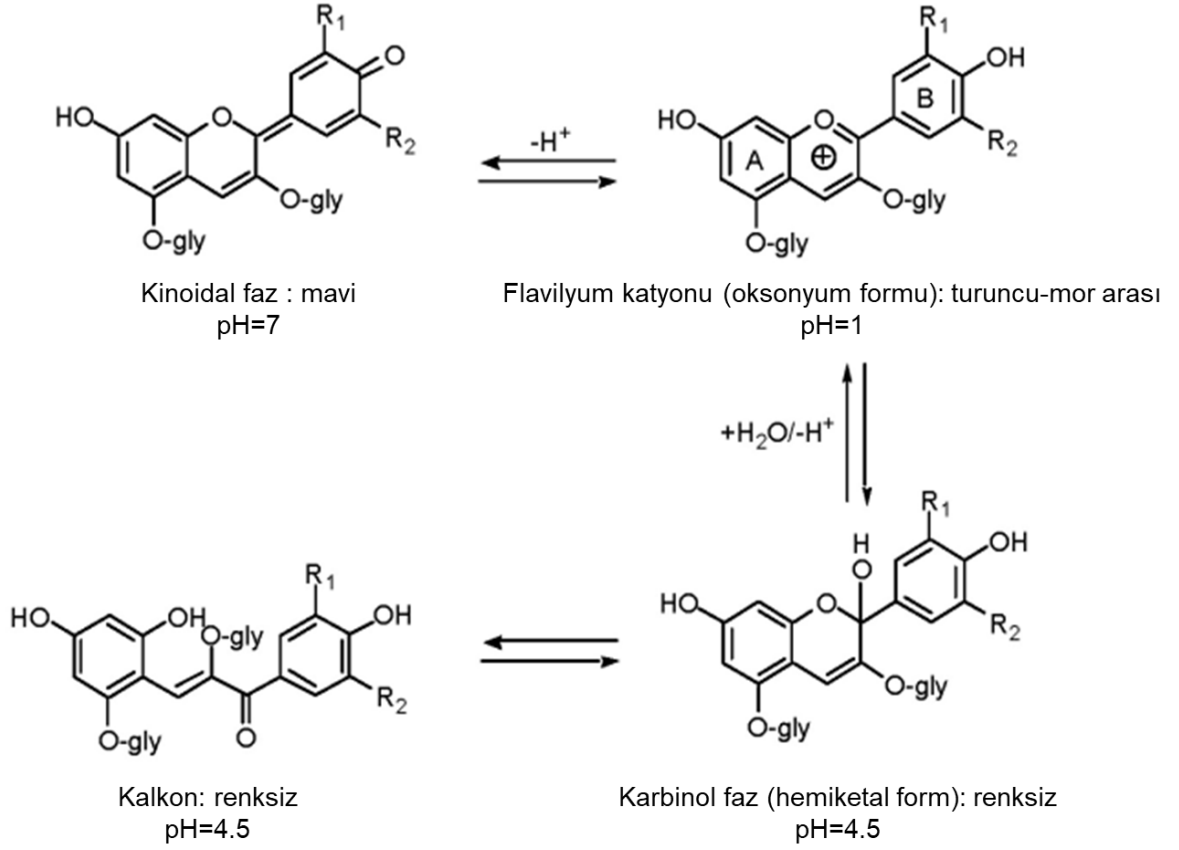
2.5.1.2. Toplam Antosiyanin Tayin Yöntemi

Antosiyanin pigmentleri, renge ve görünüme katkılarından dolayı gıda kalitesi açısından önemlidir. Olası sağlık yararları nedeniyle yiyeceklerin ve nutrasötiklerin antosiyanin içeriğine artan bir ilgi vardır. Antosiyanin pigment içeriği ayrıca meyve sularının, nutrasötiklerin ve doğal renklendiricilerin kalite kontrolünde ve satın alma şartnamelerinde faydalı bir kriterlerden biridir. pH diferansiyel yöntemi, taze ve işlenmiş meyve ve sebzelerin kalitesini değerlendirmek için gıda teknolojisi uzmanları ve bitki üreticileri tarafından yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Yöntem, antosiyanin kromoforunun pH 1.0 ile 4.5 arasındaki yapısal değişikliğine bağlı olarak toplam monomerik antosiyanin içeriğinin belirlenmesi için uygulanmaktadır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: pH 1.0 ve pH 4.5 tamponlarında saflaştırılmış turp antosiyaninlerinin (asillenmiş pelargonidin-3-soforozit-5-glukozit türevleri) spektral özellikleri.

Bir malzemede bulunan antosiyanin miktarını 2 farklı pH değerinde (3.4 ve 2.0) absorbanstaki değişikliği ölçerek belirleme kavramı ilk olarak 1948' de Sondheimer ve Kertesz (1) tarafından tanıtılmıştır. Daha sonra araştırmacılar 1.0 ve 4.5 (2-5) pH değerlerini kullanmayı önermişlerdir. Monomerik antosiyaninler, pH' ın bir fonksiyonu olarak tersine çevrilebilir bir yapısal dönüşüme uğrayabilmektedir. Renkli oksonyum formu pH 1.0'da ve renksiz hemiketal form pH 4.5'te baskındır (Şekil 2.16). Bu nedenle, pigmentin vis-max (yaklaşık 520 nm) 'de absorbanstaki fark, pigment konsantrasyonu ile orantılıdır.



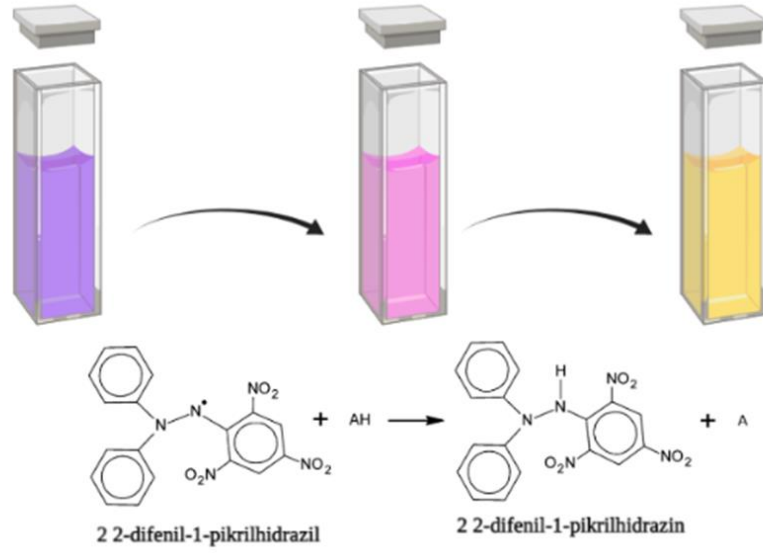
Şekil 2.16: Farklı pH seviyelerinde bulunan antosiyaninlerin baskın yapısal formları.

Absorbans, pigment çözeltisinin vis-max'ında ölçülmeli ve pigment içeriği, matristeki majör antosiyaninin moleküler ağırlığı (MW) ve molar yok olma katsayısı kullanılarak hesaplanmalıdır. Bununla birlikte, doğal matrisler normalde bir antosiyanin karışımı içerir ve bu antosiyaninlerin oranları doğal olarak değişecektir. Sonuç olarak, çeşitli ölçümler doğrultusunda, farklı çözümler için orta seviye olan 520 nm'de ölçüm alınması önerilmiştir. Sonuçlar, doğada bulunan en yaygın antosiyanin pigmenti olan siyanidin-3-glukozitin eşdeğerleri olarak ifade edilmektedir. Yöntemde hem 520 hem de 700 nm'de pH 1.0 tampon, ve pH 4.5 tampon, ile absorbans belirlenmektedir. 700 nm'de absorbansı ölçmenin nedeni bulanıklığı düzeltmektir (Lee ve diğ., 2005).

2.5.1.3. Antioksidan Kapasitesinin Tayin Yöntemi – DPPH

Doğal bileşiklerin antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi, ilaç, gıda ve kozmetikte kullanımları nedeniyle çok önemlidir. Canlı sistemlerde çeşitli metabolik süreçler ve çevresel stresler nedeniyle çeşitli reaktif türler üretmektedirler. Bunlar serbest radikallerdir ve esas olarak reaktif oksijen türleridir (ROT). Artan ROS seviyesi, biyomoleküllerin yapısına zarar verebilir ve işlevlerini değiştirebilir ve hücresel işlev bozukluğuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Artmış ROT' un kümülatif etkisi oksidatif stresi sistemik düzeyde artırabilir ve kanser, yaşa bağlı hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli sağlık sorunları şeklinde kendini gösterir. Hücresel ROT, canlı sistemlerdeki karmaşık antioksidan makinelerin etkileşimi ile düzenlenmektedir. Doğa, yaşayan sistemlere çok sayıda antioksidan molekülü bahşetmiştir. Bu doğal antioksidanların, canlı sistemdeki serbest radikallerin olumsuz etkilerini en aza indirdiği bilinmektedir.

DPPH yöntemi, bir antioksidan molekülün serbest radikal temizleme potansiyelinin değerlendirilmesi için rutin olarak uygulanmakta ve saf bileşiklerin antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesi için standart ve kolay kolorimetrik yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. DPPH, çözelti içinde stabil, birkaç kararl ve ticari olarak temin edilebilen organik nitrojen radikallerinden biridir ve metanol içinde 515 nm'de emici mor renkte görünür. Bu yöntem, süpürücü molekülden bir hidrojen (H) atomunun DPPH[•] radikaline geçtiği yani, DPPH[•] ' in DPPH₂ ' ye indirgenmesine neden olduğu, mor rengin sarıya dönüştüğü ve 515 nm'de soğurmada eşzamanlı bir azalma olduğu ilkesine dayanmaktadır. Renk değişimi spektrofotometrik olarak izlenebilmekte ve antioksidan özellikler için parametrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Şekil 2.17).



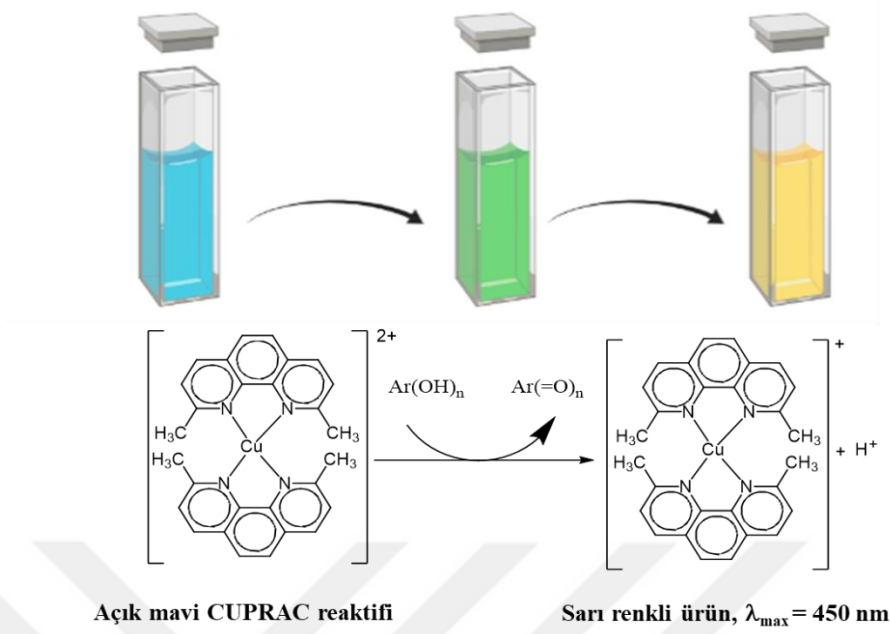
Şekil 2.17: DPPH· radikalinin kimyasal yapısı ve AH ile gerçekleşen bir süpürme reaksiyonu.

DPPH, birkaç kararlı ve ticari olarak temin edilebilen organik nitrojen radikallerinden biridir ve 515 nm'de maksimum UV-vis absorpsiyonuna sahiptir. İndirgeme üzerine, çözelti rengi solar; reaksiyonun ilerlemesi, bir spektrofotometre ile rahatça izlenebilmektedir. (Mishra ve diğ., 2012; Pyrzynska ve Pekal, 2013). Farklı laboratuvarlarda yaygın olarak uygulanan bir prosedüre göre uygun miktarda fosfat tampon, numune ve metanolik DPPH· çözücüsü karıştırılarak 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletilir. Absorbanstaki azalma 515-517 nm'de izlenir. DPPH· radikal süpürme kapasitesi Denklem (2.4) kullanılarak hesaplanır.

$$\text{DPPH} \cdot \text{ süpürme etkisi (\%)} = \left[\left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100 \right] \quad (2.4)$$

2.5.1.4. Antioksidan Kapasitesinin Tayin Yöntemi – CUPRAC

CUPRAC yöntemi, fenolik asitler, hidroksisinnamik asitler, flavonoidler, karotenoidler, antosiyaninler ve tioller, sentetik antioksidanlar ve vitamin C ve E dahil olmak üzere pek çok çeşitli polifenol için yararlı olan basit ve çok yönlü bir antioksidan kapasite analizidir. Bu yöntem, 2004 yılında 'bakır iyon azaltıcı antioksidan kapasitesi' olarak adlandırılmış ve CUPRAC yöntemi olarak kısaltılmıştır. Uygun konumlanmış fenolik hidroksiller, CUPRAC redoks reaksiyonu ile tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı (Şekil 2.18), 450 nm'de maksimum absorbanı verir.



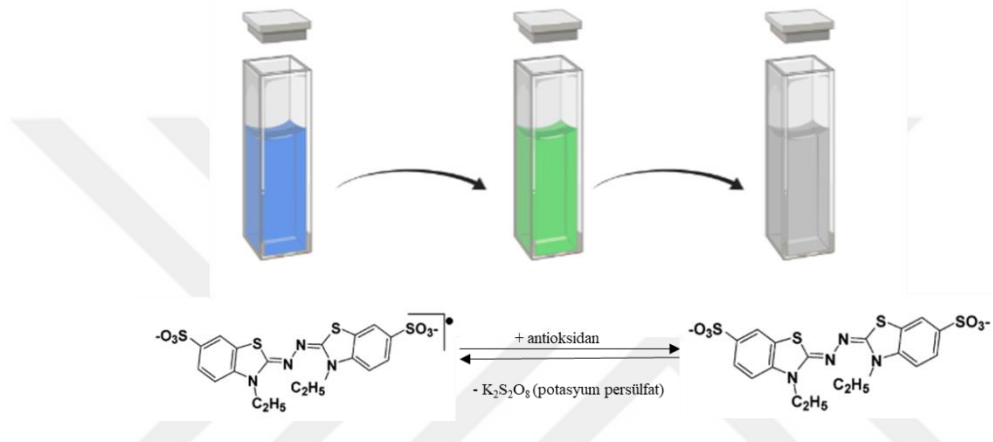
Şekil 2.18: Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla ($\text{Ar}(\text{OH})_n$) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu.

Bu yöntem; Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat (pH=7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (direkt veya asit hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm’de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. CUPRAC reaktifi tiyol tipi antioksidanları oksitleyecek kadar hızlı, gerçek antioksidan olmayan basit şekerler ve sitrik asiti oksitlemeyecek kadar seçicidir. Ek olarak reaktif, diğer kromojenik reaktiflere göre (örn. ABTS, DPPH) daha kararlı ve erişilebilirdir. Yöntem, sofistike ekipman ve kalifiye operatörler gerektirmek yerine standart kolorimetreler kullanan geleneksel laboratuvarlarda kolayca ve çeşitli şekillerde uygulanabilir. Renkli bir Cu (I) -Nc şelatına yol açan redoks reaksiyonu, hava, güneş ışığı, nem ve pH’ı belirli bir dereceye kadar olumsuz etkileyen bir dizi parametreye diğer reaktiflere kıyasla nispeten duyarsızdır (Apak ve diğ., 2008; Özyürek ve diğ., 2011).

2.5.1.5. Antioksidan Kapasitesinin Tayin Yöntemi – ABTS

ABTS [2,2’-azinobis- (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)] radikal katyonunun oluşturulması, saf maddelerin çözeltileri, sulu karışımlar ve içeceklerin toplam antioksidan aktivitesinin ölçülmesi için uygulanan spektrofotometrik yöntemlerden birinin temelini oluşturmaktadır. Bu yöntem ABTS^+ kromojen radikali absorbansının hidrojen verici antioksidanlar tarafından

inhibe edilmesine (veya renkli radikal oluşumunun gecikmesine) dayanmaktadır. Absorbans azalmasından yararlanılarak toplam antioksidan kapasite ölçülmektedir. 743 nm' de absorbe eden (mavimsi yeşil bir renk veren) $ABTS^{\cdot+}$ radikali, ABTS' nin (2,2'-azino-bis (3-etilbenztiazolin-6-sülfonik asit)) nitrojen atomu tarafından bir elektron kaybı ile oluşmaktadır (Şekil 2.19). Trolox'un (veya başka bir hidrojen veren antioksidanın) varlığında, nitrojen atomu hidrojen atomunu söndürerek çözelti renginin giderilmesini sağlar (Pisoschi ve Negulescu, 2012).



Şekil 2.19: $ABTS^{\cdot+}$ radikalinin kimyasal yapısı ve AH ile gerçekleşen bir süpürme reaksiyonu.

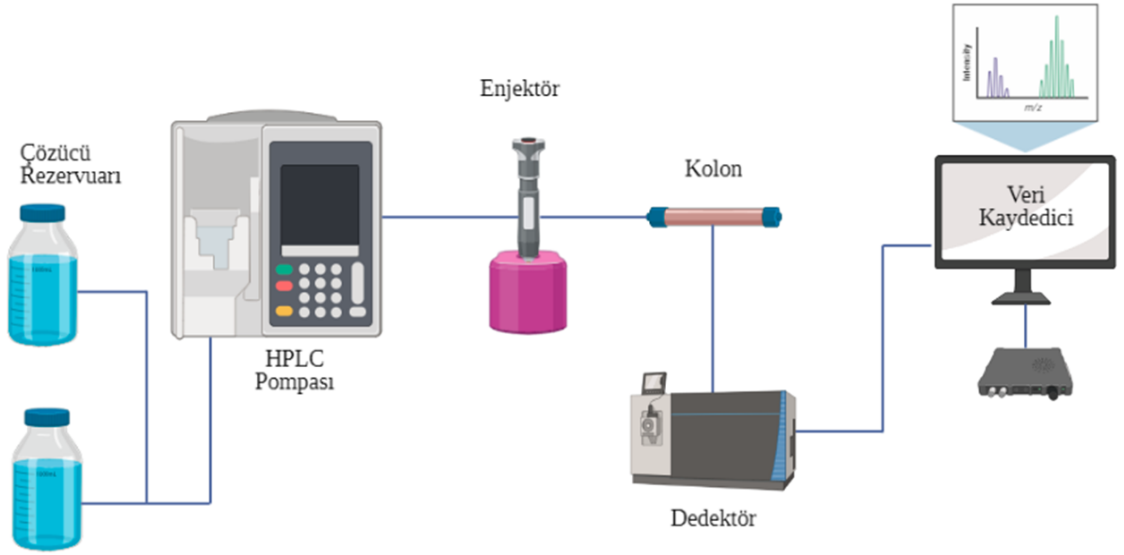
Bu renk giderme testi, hem lipofilik hem de hidrofilik maddelerdeki toplam antioksidan kapasitesini ölçmektedir. Antioksidan konsantrasyonunun etkisi ve radikal katyon absorpsiyonunun inhibisyon süresi, antioksidan aktivite belirlendiğinde dikkate alınır. E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox, pozitif kontrol olarak kullanılır. Aktivite, ekstraktın Trolox eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC / mg) cinsinden ifade edilir (Krishnaiah ve diğ., 2011).

2.5.2. Kromatografik Yöntem

2.5.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – HPLC

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), klasik kolon kromatografisinden türetilmiştir ve günümüzde analitik kimyanın en önemli araçlarından biridir. HPLC, uçucu ve termal olarak kararlı örneklerle sınırlı olmadığı ve mobil ve sabit fazların seçimi daha geniş olduğu için gaz kromatografisinden daha çok yönlüdür (V. Gupta ve diğ., 2012). Gıda bilimcileri için, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), ürün bileşimini test etmek ve ürün kalitesini

sağlamak için güçlü bir araçtır (Nollet ve Toldra, 2013). HPLC, modern farmasötik ve biyomedikal analizlerde üstün bir ayırma tekniğidir çünkü yüksek verimli ayırmalarla sonuçlanır ve çoğu durumda yüksek algılama hassasiyeti sağlar. Temel olarak bir HPLC sistemi yüksek basınçlı çözücü pompası, enjektör, kolon, detektör ve veri kayıt parçalarından oluşmaktadır (Şekil 2.20). Basit bir şekilde HPLC prensibi, numunenin bir gözenekli malzeme kolonuna (sabit faz) enjekte edilmesi ve sıvı fazın (mobil faz) kolondan daha yüksek basınçta pompalanmasıdır. İzlenen ayırma ilkesi, çözünen maddenin sabit faza olan yakınlığına bağlı olarak hareketli fazda adsorpsiyonudur (Bhardwaj ve diğ., 2015). Numunenin ayrılması, numunenin sabit ve hareketli faz arasında farklı bölünmesinden kaynaklanan kolon boyunca göç oranlarındaki farklılıklara dayanmaktadır. Farklı bileşenlerin bölme davranışına bağlı olarak, farklı zamanlarda elüsyon gerçekleşir.



Şekil 2.20: HPLC şeması.

Serbest ve toplam fenolik asitleri (*m*-Hidroksibenzoik asit, *p*-Hidroksibenzoik asit, protokatekuik asit, gallik asit, vanilik asit, siringik) tanımlamak ve ölçmek için diyot dizisi saptama (DAD) ile yüksek performanslı bir sıvı kromatografik (HPLC) yöntemi kullanıldı. bitki besinlerinde asit, kumarik asit, *m*-Kumarik asit, *p*-Kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit, klorojenik asit ve ellagik asit).

2.6. DENEYSEL TASARIM VE YANIT YÜZEY METODU

2.6.1. Deneysel Tasarım

Deney, bir araştırmacının bir veya daha fazla girdinin veya bağımsız değişkenin düzeylerini seçtiği ve çıktı veya bağımlı değişkenlerin değerlerini gözlemlediği bir araştırmadır. Deneysel faaliyetin amacı, girdi ve çıktı değişkenleri arasındaki ilişkinin anlaşılmasına ve genellikle temeldeki süreci daha da optimize etmesine yol açmaktır. Deneysel bir tasarım, bağımsız değişkenlerin, miktarların, büyüklüklerin (seviyeler olarak adlandırılır) ve seçilen bu seviyelerin kombinasyonlarının deneysel amaçlar bir araya getirilmesidir. Yani, deneysel bir tasarımın özü, üç bölümden oluşan soruyu yanıtlamaktır: (1) hangi faktörleri incelemeliyiz, (2) bu faktörlerin seviyeleri nasıl değişmeli ve (3) bu seviyeler ne şekilde olmalıdır?

Deneysel tasarım, artan sayıda uygulamaya yönelik büyüyen bir ilgi alanıdır. Başlangıçta, deneysel tasarım tarım, biyoloji ve diğer bilim dallarında uygulama bulmuştur. Daha sonra mühendislik alanlarından ekonomi ve davranış analizinin sosyal bilimlerine yayılmıştır. Deneysel tasarım süreci altı adımlı bir süreç olarak çerçevelendirilebilir:

1. Deneyin planlanması.
2. Deneyin tasarlanması.
3. Deneyin gerçekleştirilmesi.
4. Deneyden elde edilen verileri analizi.
5. Deney sonuçlarının onaylanması.
6. Deney sonuçlarının değerlendirilmesi.

Planlama süreci, deneyin başarısı için hayati önem taşır. Bu aşamada, incelenen süreç hakkında bilgi sahibi kişiler (süreç uzmanları) ile deney tasarımı metodolojisinde deneyimli kişiler (tasarımcılar) arasında yakın işbirliği gereklidir. Deneyin planlaması tamamlandıktan tasarım aşamasına geçilir. İlk olarak tasarım tipi seçilmelidir. Bazen bir deneyin sonuçları apaçık görünmektedir ancak bu durum aldatici olabilmektedir. Çoğu zaman, bu şekilde görünseler bile sonuçlar net değildir. Gözlemlenen bir farkın gerçek bir farkı mı gösterdiğini yoksa sadece dalgalanan arka plan gürültü seviyelerinden mi kaynaklandığını söylemek önemlidir. Bu ayrımı yapmak için, hipotez testi adı verilen istatistiksel bir analiz sürecinden geçilmelidir. Analiz elde edilen sonuçlara ulaşıldıktan sonra, bu sonuçları doğrulamak gereklidir. Deneysel tasarım

sürecinin altıncı adımı olarak belirli değerlendirme türü, sonuçların ekonomik değerlendirmesidir (Berger ve diğ., 2002).

2.6.2. Yanıt Yüzey Metodu (YYM)

Optimizasyon, ondan maksimum fayda elde etmek için bir sistemin, sürecin veya ürünün performansını iyileştirmeyi ifade eder. Optimizasyon terimi, mümkün olan en iyi yanıtı üreten bir prosedürün uygulanacağı koşulları keşfetmenin bir yolu olarak analitik kimyada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Geleneksel olarak, analitik kimyada optimizasyon, deneysel bir yanıt üzerindeki her seferinde bir faktörün etkisi izlenerek gerçekleştirilmiştir. Yalnızca bir parametre değiştirilirken diğerleri sabit bir seviyede tutulur. Bu optimizasyon tekniğine “one-factor-at-a-time (OFAT)” *her seferinde bir değişken* denir. En büyük dezavantajı, incelenen değişkenler arasında etkileşimli etkileri içermemesidir. Sonuç olarak, bu teknik parametrenin yanıt üzerindeki tam etkilerini göstermez. Tek faktörlü optimizasyonun bir diğer dezavantajı, araştırmayı yürütmek için gerekli olan deney sayısındaki artış, bu da zaman ve masrafların artmasının yanı sıra reaktiflerin ve malzemelerin tüketiminde bir artışa yol açmasıdır (Bezerra ve diğ., 2008).

Yanıt yüzey metodolojisi Box ve Wilson tarafından 50' li yıllarda geliştirilmiştir (Mohamad Said ve Mohamed Amin, 2016). Bu terim, matematiksel modelin uygunluğundan sonra oluşturulan grafiksel perspektiften kaynaklanmıştır ve kullanımı kemometri metinlerinde yaygın olarak benimsenmiştir. YYM, deneysel tasarımıyla ilgili olarak elde edilen deneysel verilere, deneysel modellerin uyumuna dayanan bir grup matematiksel ve istatistiksel teknikten oluşmaktadır. Bu amaca doğru, doğrusal veya kare polinom fonksiyonları, çalışılan sistemi tanımlamak ve sonuç olarak, optimizasyonuna kadar deneysel koşulları keşfetmek (modellemek ve yer değiştirmek) için kullanılmaktadır (Bezerra ve diğ., 2008).

YYM, bir model denklemi kurarak, nicel verileri kullanarak birden çok parametre arasındaki ilişkiyi ve etkileşimleri değerlendirebilir. YYM uygulamasında üç adım vardır;

1. Deney tasarımı, yani Box Behnken ve Merkezi Bileşik Tasarım (CCD).
2. YYM' yi temsil eden model denklemleri geliştirmek için istatistiksel ve regresyon analizi.
3. Model denklemi aracılığıyla gerçekleştirilen parametreler / değişkenler optimizasyonu.

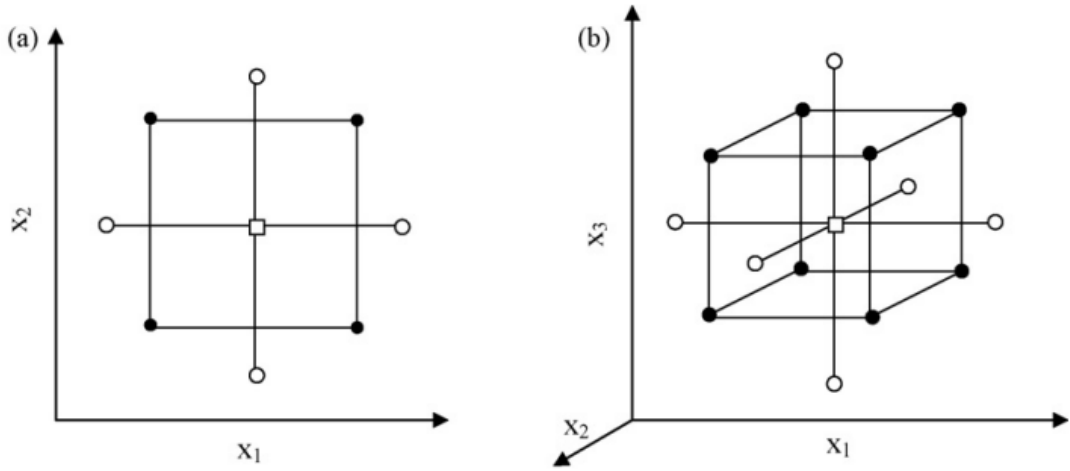
Günümüzde uygulayıcının hem tarama hem de optimizasyon için yanıt yüzeyi deneyleri oluşturmaya izin veren birçok tasarım aracı bulunmaktadır. Düzenli faktöryel ve kesirli faktöryel planlar, Plackett-Burman, merkezi bileşik, küçük bileşik, Box-Behnken ve hibrit tasarımlar dahil olmak üzere birçok yazılım paketi standart tasarımları oluşturmaktadır (Mohamad Said ve Mohamed Amin, 2016; Myers ve diğ., 2004).

2.6.2.1. Merkezi Bileşik Tasarım

Merkezi bileşik tasarım (CCD) Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş olan ve literatürde en sık rastlanan deneysel tasarım yöntemidir. Bu tasarım aşağıdaki bölümlerden oluşur:

1. Tam bir faktöryel veya kesirli faktöryel tasarım.
2. Deney noktalarının merkezinden α uzaklıkta olduğu bir yıldız tasarımı olan ek bir tasarım.
3. Bir merkezi nokta.

Şekil 2.21 (a ve b), iki ve üç değişkenli optimizasyon için tam merkezi bileşik tasarımı göstermektedir.



Şekil 2.21: (a) iki değişken ($\alpha = 1.41$) ve (b) üç değişken ($\alpha = 1.68$) optimizasyonu için merkezi bileşik tasarımı (●) Faktöryel tasarım noktaları, (○) eksenel noktalar ve (□) merkez nokta.

Tam tekdüze yönlendirilebilir merkezi kompozit tasarımlar aşağıdaki özellikleri sunar:

- $N = k^2 + 2k + c_p'$ ye göre bir deney numarası gerektirir, burada “k” faktör numarasıdır ve “ c_p ” merkezi noktanın kopya numarasıdır,
- α -değerleri değişken sayısına bağlıdır ve $\alpha = 2^{(k-p)/4}$ ile hesaplanabilir. 1, 1.68 veya 2.00 olarak alınabilir.
- Tüm faktörler beş seviyede ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) incelenir (Bezerra ve diğerleri, 2008).

CDD ile gerçekleştirilen optimizasyon, geniş bir parametre yelpazesinin yanı sıra her faktörün rolünün taranmasına izin vermektedir. Ek olarak, CCD ayrıca tek bir değişkeni veya değişkenlerin yanıtta kümülatif etkisini değerlendirebilmektedir. Bu özellikler, tam faktöryel ve kısmi faktöryel yöntem gibi diğer deneysel tasarım türleriyle paylaşılsa da, deneysel çalışmaların azaltılmasıyla farklılık göstermektedir. Örneğin, sadece dört bağımsız değişkenle, tam faktöryel yöntem en az 81 deneysel çalıştırma artı çoğaltma önerecektir. Bunun yanı sıra, CCD yöntemini kullanırken, sadece 31 deneysel noktaya (16 faktöryel nokta, 8 aksel nokta ve 7 merkez nokta) ihtiyaç vardır (Mohamad Said ve Mohamed Amin, 2016).

Birkaç deneysel prosedürden sonra alınan tüm yanıtlar, yanıtın polinom modeline uydurulmasını içeren regresyon yöntemi kullanılarak analiz edilir, örneğin, ikinci dereceden polinom modeli genel olarak Denklem 2.5’ deki gibidir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.5)$$

Denklemden β_0 sabit bir katsayıyı, β_i lineer, β_{ii} ikinci derece, β_{ij} ikili etkileşim katsayılarını, Y yanıtı, ε ise hatayı ifade etmektedir.

Güvenilirlik testi için, modelin uygunluğunu yanıt yoluyla R^2 katsayısına göre ve ayrıca uyum eksikliği için F testi ile değerlendirildiği varyans analizi (ANOVA) testi yapılmalıdır.

Veri ile uyumlu fonksiyon belirlendikten sonra tanımlanan matematiksel model bazen incelenen deneysel alanı tatmin edici bir şekilde tanımlayamayabilir. Belirlenen modelin kalitesini değerlendirmenin daha güvenilir yolu, varyans analizi (ANOVA) uygulamasıdır. ANOVA, açıklayıcı ve doğrulayıcı veri analizinde son derece önemli bir yöntemdir. ANOVA'nın ana fikri, deney uygulamalarından kaynaklanan varyasyonu (değişken seviyelerin

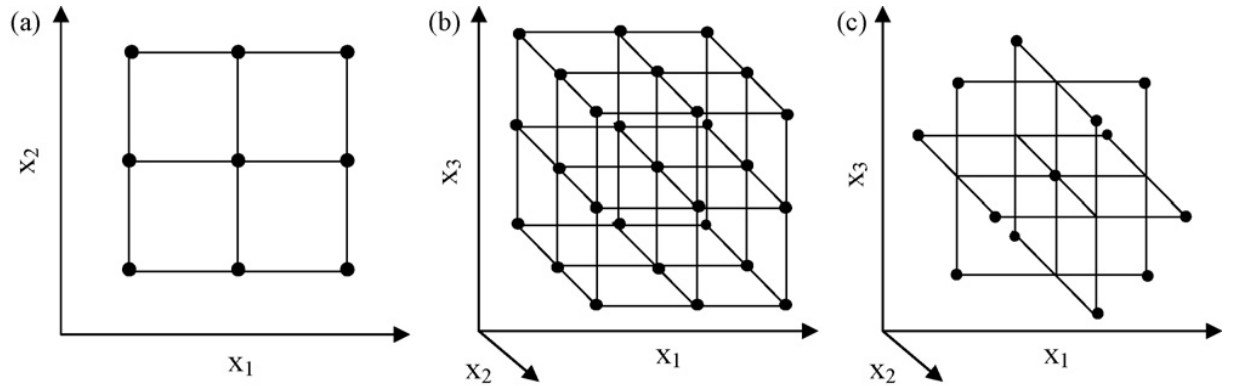
kombinasyonundaki değişiklik), üretilen yanıtların ölçümlerine özgü rastgele hatalardan kaynaklanan varyasyonla karşılaştırmaktır (Bezerra ve diğ., 2008).

Dengeli veriler için klasik ANOVA aynı anda üç şey yapmaktadır. Veri analizi olarak, bir ANOVA, ek bir veri ayrıştırmasının bir organizasyonudur ve karelerinin toplamı, ayrıştırmanın her bir bileşeninin varyansını gösterir. Ortalama karelerin karşılaştırılması, F testleri ile birlikte, iç içe geçmiş bir model dizisinin test edilmesine izin verir. Katsayı tahminleri ve standart hatalarla uyumlu doğrusal bir model önerir (Gelman ve diğ., 2005).

Standart tahmin hatasının gözlemlenen yanıtın ortalama değerine oranı olarak varyans katsayısı (CV), modelin tekrarlanabilirliğini tanımlar. CV değeri % 10' dan küçük olan bir model normal olarak yeniden üretilebilir olarak kabul edilmektedir (Ghafari ve diğ., 2009).

2.6.2.2. Box - Behnken Tasarımı (BBD)

Box ve Behnken, matematiksel modelin birinci ve ikinci derece katsayılarının verimli bir şekilde tahmin edilmesini sağlayan üç seviyeli faktör düzenlemesinde noktaların nasıl seçileceğini önermiştir. Bu tasarım, esas olarak çok sayıda değişken için kullanılan 3k tasarımlarından daha verimli ve ekonomiktir. Şekil 2.19 (c), 13 deney noktasıyla üç değişkenli optimizasyon için Box-Behnken tasarımını göstermektedir. 27 deney içeren orijinal 33 tasarıma kıyasla (Şekil 2.22 (b)), bu tasarımın daha ekonomik ve verimli olduğu belirtilmektedir.



Şekil 2.22: Tüm değişkenlerin üç seviyede incelenmesine dayanan deneysel tasarımlar: (a) iki değişken ve (b) üç değişkenin optimizasyonu için üç seviyeli faktör tasarımı ve (c) üç değişkenin optimizasyonu için Box – Behnken tasarımı.

Bu deneysel tasarım, çeşitli kimyasal ve fiziksel işlemlerin optimizasyonu için uygulanmıştır; ancak analitik kimyadaki uygulaması, merkezi kompozit tasarıma kıyasla hala çok daha küçüktür. BBD ve diğer yanıt yüzeyi tasarımları (merkezi bileşik, Doehlert matrisi ve üç seviyeli tam faktörlü tasarım) arasındaki bir karşılaştırma, BBD ve Doehlert matrisinin merkezi bileşik tasarımdan biraz daha verimli olduğunu ancak üç seviyeli tasarımdan çok daha verimli olduğunu göstermiştir. İkinci dereceden model için BBD ve diğer yanıt yüzeyi tasarımlarının verimlilikleri arasında bir karşılaştırma yapıldığında, faktör sayısı 2'den büyük olan üç seviyeli tam faktör tasarımlarının daha maliyetli olduğunu görülmüştür.

BBD'nin diğer bir avantajı, tüm faktörlerin aynı anda en yüksek veya en düşük seviyelerinde olduğu kombinasyonları içermemesidir. Dolayısıyla, bu tasarımlar, tatmin edici olmayan sonuçların ortaya çıkabileceği aşırı koşullar altında gerçekleştirilen deneylerden kaçınmada yararlıdır. Tersine, aşırı uçlardaki, yani küpün köşelerindeki yanıtları bilmek istediğimiz durumlar için belirtilmezler (Ferreira ve diğ., 2007).

2.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bilimsel çalışmalar sonucunda ortaya çıkan verilerin güvenilirliği oldukça önemlidir. Bu nedenle bazı istatistiksel göstergeler kullanılarak belirsizliğin ortadan kaldırılması gereklidir. Belirsizliklerin giderilmesi ve sonuçların kullanılabilir olması için varyans, standart sapma, korelasyon katsayısı değerlerinden yararlanılmaktadır.

Varyans, değişkenliğin bir ölçüsüdür. Ortalamadan sapmaların karesi ortalaması alınarak hesaplanır. Varyans, veri kümesindeki yayılma derecesini belirtir.

Standart sapma (σ), bir dizi değerlerin varyasyon veya dağılım miktarının bir ölçüsüdür. Düşük bir standart sapma, değerlerin kümenin ortalamasına (aynı zamanda beklenen değer olarak da adlandırılır) yakın olma eğiliminde olduğunu gösterirken, yüksek bir standart sapma, değerlerin daha geniş bir aralığa yayıldığını göstermektedir. Denklem 2.6 ile hesaplanabilmektedir.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2 + \varepsilon_3^2}{n-1}} \quad (2.6)$$

Denklemdaki “n” deney tekrar sayısını ifade etmektedir.

Korelasyon katsayısı, iki değişken arasındaki bir ilişkinin ne kadar güçlü olduğunu ölçmek için kullanılan katsayıdır. Genellikle doğrusal regresyonda kullanılan bir korelasyon katsayısıdır.

Ayrıca, istatistikte olasılık anlamına gelen “ p ” değeri, İngilizce karşılığı “probability” olan terim, verilerin güven aralığını belirtir. Eğer veriler %5 hatayı kabul ederek hesaplanmışsa “ $p < 0,05$ ” ifadesiyle, veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu anlaşılır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİSEL MATERYAL

2019 Mayıs ayında Aroma Bursa Meyve Suları ve Gıda San. A.Ş.' den alınan vişne ve şeftali suyu yan ürünleri posa, yaprak, kabuk ve sap olarak sınıflandırılarak plastik torbalara yerleştirilip kullanıma kadar -25° C' de saklanmıştır. Şekil 3.1' de vişne ve şeftali numunelerinden ayrılan kabuk örnekleri gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Vişne ve şeftali meyvesi kabukları.

3.2. KİMYASAL MALZEMELER

Tablo 3.1' de tez kapsamında kullanılan kimyasal malzemelerin döküm kayıt numaraları, tedarikçileri ve saflık özellikleri özetlenmektedir. Çalışmada kullanılan etanol ($\geq$ %99.9) (EtOH), metanol ($\geq$ %99.9) (MeOH), hidroklorik asit (HCl), sodyum karbonat (Na_2CO_3) ve Folin-Ciocalteu reaktifi Merck' ten temin edilmiştir (Darmstadt, Almanya). 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH $\cdot$), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS), bakır (II) klorür (CuCl_2), 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuprin), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-

karboksilik asit (Troloks), gallik asit, siyanidin-3-glukozit, klorojenik asit, potasyum klorür, sodyum asetat, hidroksisinnamik asit, formik asit ve asetonitril ise Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir (St. , MO, ABD). Millipore, Milli-Q saf su sistemleri kullanılarak, deiyonize su ve ultra saf su (18 Ω ohm) temin edilmiştir.

Tablo 3.1: Kimyasal malzemelerin CAS numaraları, tedarikçileri ve saflık özellikleri (101.33 kPa).

Materyal	Kimyasal Formül	Molar Kütlesi (g mol ⁻¹)	CAS No	Tedarikçi	Saflık Yüzdesi
Etanol	C ₂ H ₅ OH	46,07	64-17-5	Merck (Darmstadt, Germany)	≥99,9
Metanol	CH ₃ OH	32,04	67-56-1	Merck (Darmstadt, Germany)	≥99,9
Hidroklorik asit	HCl	36,46	7647-01-0	Merck (Darmstadt, Germany)	0,37
Sodyum hidroksit	NaOH	40,00	1310-73-2	Merck (Darmstadt, Germany)	≥98,0
Sodyum karbonat	Na ₂ CO ₃	105,99	497-19-8	Merck (Darmstadt, Germany)	≥99,9
Folin-Ciocalteu	C ₁₀ H ₅ NaO ₅ S	260,20		Merck (Darmstadt, Germany)	
DPPH	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	394,32	1898-66-4	Sigma-Aldrich	100
ABTS	C ₁₈ H ₂₄ N ₆ O ₆ S ₄	548,68	30931-67-0	Sigma-Aldrich	≥98,0
Bakır (II) klorür	CuCl ₂	134,45	7447-39-4	Sigma-Aldrich	>99,0
Neokuprin	C ₁₄ H ₁₂ N ₂	208,26	484-11-7	Sigma-Aldrich	≥98,0
Troloks	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	250,29	53188-07-1	Sigma-Aldrich	97,0
Potasyum klorür	KCl	74,55	7447-40-7	Sigma-Aldrich	≥99,0
Sodyum asetat	CH ₃ COONa	82,03	127-09-3	Sigma-Aldrich	≥99,0
Siyanidin-3-glukozit	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₆	322,70	528-58-5	Sigma-Aldrich	≥95,0

Tablo 3.1 (devam):

p-Kumarik asit	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CH=CHCO}_2\text{H}$	164,16	501-98-4	Sigma-Aldrich	$\geq 98,0$
p-Hidroksibenzoik Asit	$\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$	138,12	99-96-7	Sigma-Aldrich	$\geq 99,0$

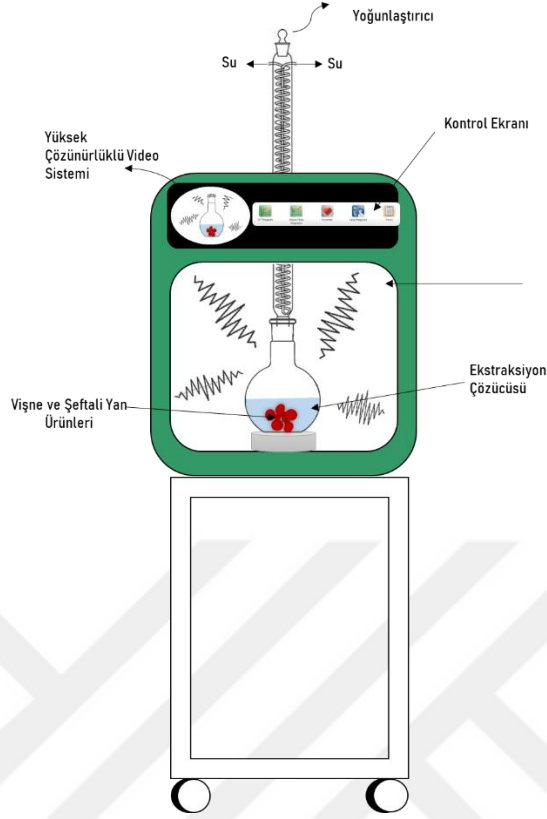
3.3. EKSTRAKSİYON

3.3.1. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Denemeleri

Çalışmalarda Şekil 3.2' de görülen, 2,45 GHz'de (900 W maksimum güç) çalışan mikrodalga ekipmanından yararlanılmıştır (NEOS-GR, Milestone Srl, İtalya). Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazının özel yazılımı ve kamerası sayesinde ekstraksiyon süreci güvenli bir şekilde takip edilmiştir. 0,1 g taze vişne ve şeftali yan ürünleri, tübüler yarım küre tabanlı şişeye aktarılmıştır. Daha sonra 30 mL ekstraksiyon çözücüsü (farklı oranda EtOH: H₂O; % 0,01 HCl) eklenmiştir. MDE, ön deneme sonuçlarına göre 350 - 500 W mikrodalga gücü, 30 - 90 sn ışınlama süresi ve % 20 - 80 EtOH çözücü konsantrasyonu arasında, atmosferik basınçta gerçekleştirilmiştir. TPM, TA ve antioksidan aktivite değerleri yanıt olarak seçilmiştir (Tablo 3.2.) Deneysel hata oranını belirlemek amacıyla orta noktalar 6 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar 0.45 µm enjeksiyon filtresinden geçirilmiştir. Örnekler 10 mL' lik cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.2: MDE yoluyla vişne ve şeftali kabuklarına uygulanan yanıt-yüzey metodunda optimizasyon için kullanılan parametreler ve seviyeleri.

Bağımsız Değişken	Birim	Seviyelerin Kodu		
		-1	0	1
Mikrodalga Gücü	Watt	350	425	500
Ekstraksiyon Süresi	s	30	60	90
Çözücü Konsantrasyonu	%, v/v	20	50	80



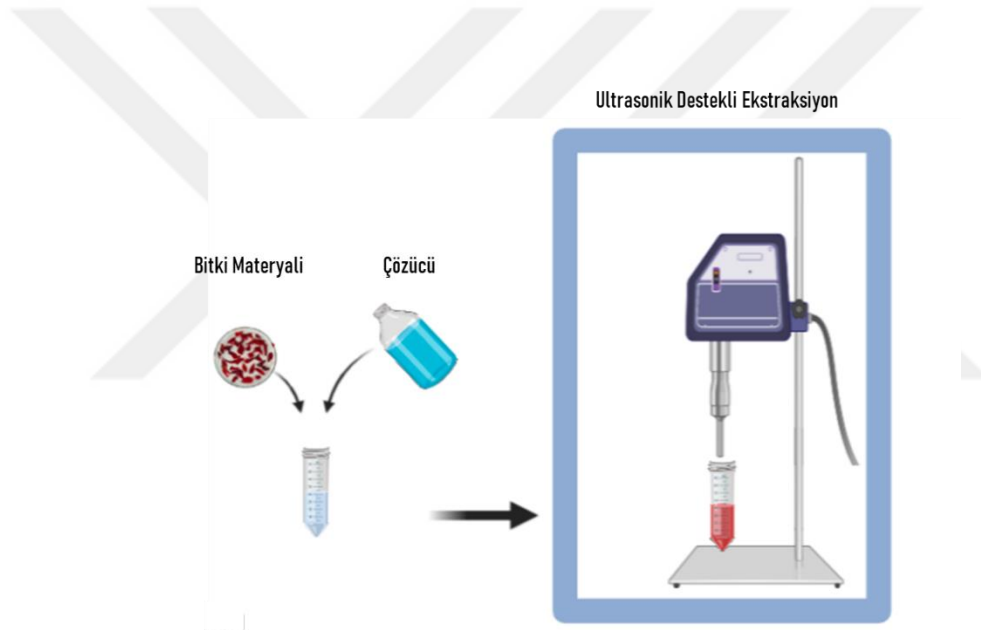
Şekil 3.2: Vişne ve şeftali yan ürünlerinin ekstraksiyonu için MDE sistemi.

3.3.2. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Denemeleri

Ultrasonik destekli ekstraksiyon çalışmalarını gerçekleştirmek için bir ultrasonikatör (Vibra Cell, model VCX 750, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, ABD) kullanılmıştır. Ultrason etkisine aşırı maruz kalmadan kaynaklanan yüksek ısınma sorunlarını önlemek için puls mod (3/7, açık / kapalı) uygulanmıştır. Örnekler 20 kHz frekansta, 3 sn ultrasonik dalgalar ile muamele edilirken, ultrason etkisi ekstraksiyon sırasında 7 sn durdurulmuştur. Ön denemelere göre 0,1-0,5 g taze vişne ve şeftali yan ürünleri, 50 mL' lik plastik santrifüj tüplerine alınmıştır. Daha sonra 35 mL ekstraksiyon çözücüsü (farklı oranda EtOH: H₂O; % 0,01 HCl) eklenmiştir. Ekstraksiyon süresi kinetik çalışmalarla 15 dakika olarak belirlenmiştir. %10-50 genlik seviyeleri arasında denemeler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar 0,45 µm enjeksiyon filtresinden geçirilmiştir. Örnekler 10 mL' lik cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3: UDE yoluyla vişne ve şeftali kabuklarına uygulanan yanıt-yüzey metodunda optimizasyon için kullanılan parametreler ve seviyeleri.

Bağımsız Değişken	Birim	Seviyelerin Kodu		
		-1	0	1
Genlik	%	0,1	0,3	0,5
Katı Madde Miktarı	g	10	30	50
Çözücü Konsantrasyonu	%, v/v	20	50	80



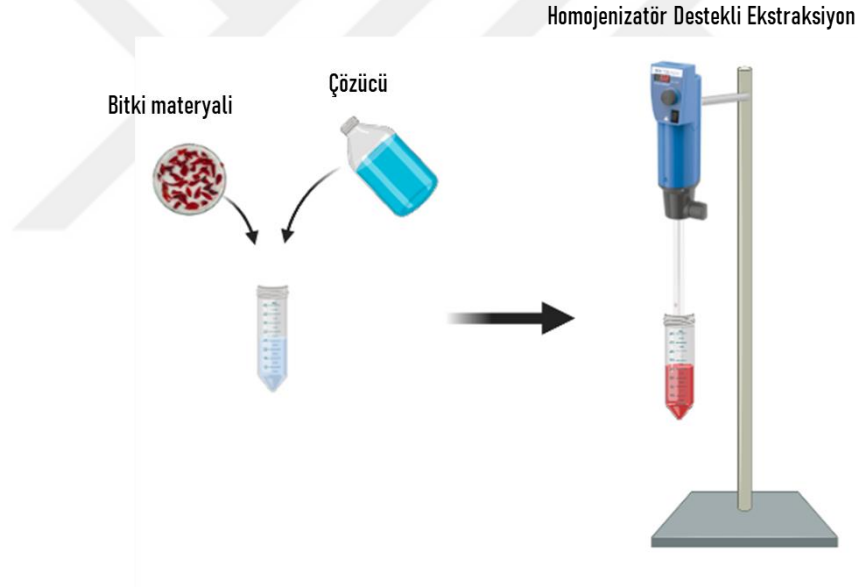
Şekil 3.3: Vişne ve şeftali yan ürünlerinin ekstraksiyonu için UDE sistemi.

3.3.3. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon Denemeleri

Homojenizatör destekli ekstraksiyon denemelerini gerçekleştirmek için dijital homojenizatörden yararlanılmıştır (IKA T25 Ultra Turrax, Stauffer, Almanya). 35 mL ekstraksiyon çözücüsü (farklı oranda EtOH: H₂O; % 0,01 HCl) kullanılarak ön denemelerde belirlenen parametrelere göre 0,1- 0,5 g katı madde, 6000-10000 rpm karıştırma hızı, 60-90 sn süre şartlarında çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Elde edilen ekstraktlar 0,45 µm enjeksiyon filtresinden geçirilmiştir. Örnekler 10 mL' lik cam şişelerde muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.4: HDE yoluyla vişne ve şeftali kabuklarına uygulanan yanıt-yüzey metodunda optimizasyon için kullanılan parametreler ve seviyeleri.

Bağımsız Değişken	Birim	Seviyelerin Kodu		
		-1	0	1
Katı madde miktarı	g	0,1	0,3	0,5
Karıştırma hızı	rpm	6000	8000	10000
Ekstraksiyon Süresi	s	60	75	90
Çözücü Konsantrasyonu	%, v/v	20	50	80



Şekil 3.4: Vişne ve şeftali yan ürünlerinin ekstraksiyonu için HDE sistemi.

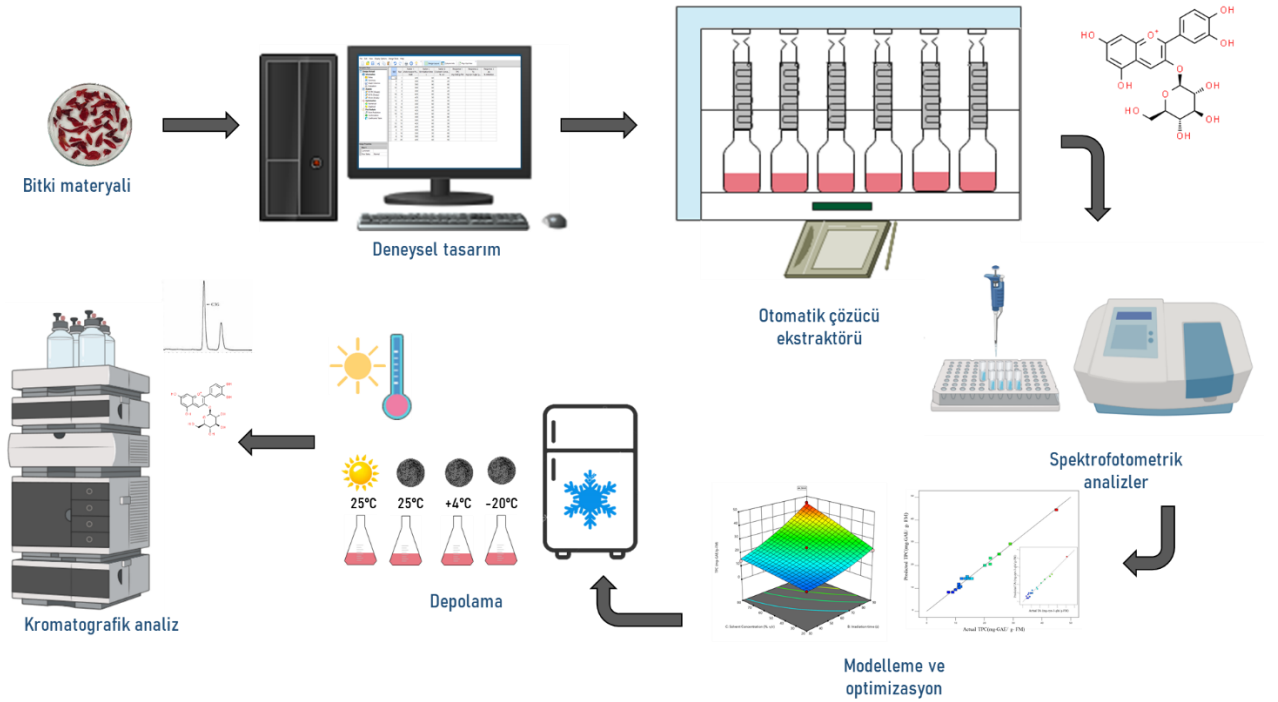
3.3.4. Otomatik Çözücü Ekstraksiyonu Denemeleri

Ekstraksiyon, Velp SER 158 otomatik çözücü ekstraktör (Velp Scientifica, Usmate, İtalya) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Farklı miktarlarda vişne ve şeftali yan ürünleri selüloz ekstraksiyon kartuşlarına (Whatman, Maidstone, UK, tek kalınlık, 33 mm x 80 mm, Ürün Kodu 2.800.338) aktarılmış ve ekstraksiyon kaplarına yerleştirilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon kaplarına 80 mL ekstraksiyon çözücüsü (farklı oranda EtOH: H₂O; % 0,01 HCl) ilave edilmiştir.

Tam otomatik çözücü ekstraktör, daldırma için 10-30 dakika, yıkama için 40-60 dakika, geri kazanım için 30 dakika, soğutma için 2 dakika etanol çözücü tipine göre uygun ısıtma seviyesine ayarlanmıştır. Toplam ekstraksiyon prosesi 1 saat 22 dakika ile 2 saat 2 dk arasında sürmüştür. Yükseltme operatörü ile ekstraksiyon kapları arasında butil contalar kullanılmıştır. Bitki materyaline uygulanan tüm deneysel aşamalar Şekil 3.5’ te gösterilmiştir.

Tablo 3.5: OÇE yoluyla vişne ve şeftali kabuklarına uygulanan yanıt-yüzey metodunda optimizasyon için kullanılan parametreler ve seviyeleri.

Bağımsız Değişken	Birim	Seviyelerin Kodu		
		-1	0	1
Daldırma Süresi	dk	10	20	30
Yıkama Süresi	dk	40	50	60
Katı Madde Miktarı	g	10	30	50
Çözücü Konsantrasyonu	%, v/v	20	50	80



Şekil 3.5: Vişne ve şeftali yan ürünlerinin ekstraksiyonu için OÇE sistemi.

3.4. ANALİZLER

3.4.1. Spektrofotometrik Analizler

3.4.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik içeriğin belirlenmesinde Folin-Ciocalteu yönteminden yararlanılmıştır (Malik ve Bradford, 2006). Bu yöntem sodyum karbonat varlığında üretilen fenolatlar tarafından Folin-Ciocalteu reaktifinin indirgenmesiyle neden olduğu renk değişikliğine dayanmaktadır. Bu amaçla hazırlanan ekstraktlardan 20 µL alınarak üzerine 380 µL saf su eklenmiştir. Daha sonra 2000 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (%10, v/v) ve 1600 µL sodyum karbonat (%7,5, w/v) çözeltisi eklenerek ultrasonik su banyosunda karışması sağlanmıştır. Örnekler 30 dakika karanlıkta bekletildikten sonra UV spektrofotometresinde (PG Instruments, T60 / Leicestershire ve İngiltere) 765 nm’ de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Kalibrasyon eğrisi hazırlanırken uygun çözücülerle hazırlanan saf gallik asit kullanılmıştır. Sonuçlar yaş madde başına miligram gallik asit ekivalenti olarak ifade edilmiştir (mg-GAE / g-YM). Farklı çözücüler için standart eğri denklemleri aşağıda verilmiştir:

$$\%20 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{765} = 0,006(\text{gallik asit}) - 0,0003 \quad r = 0,9798 \quad (3.1)$$

$$\%50 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{765} = 0,006(\text{gallik asit}) - 0,0001 \quad r = 0,9999 \quad (3.2)$$

$$\%80 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{765} = 0,007(\text{gallik asit}) + 0,0013 \quad r = 0,9899 \quad (3.3)$$

A: 765 nm’ deki absorbans değeri,

Gallik asit: mg/L cinsinden TFM değeridir.

3.4.1.2. Toplam Antosiyanin Tayini

Ekstraktların toplam antosiyanin (TA) analizi, Lee ve diğ. tarafından belirlenen pH diferansiyel yöntemi ile hesaplanmıştır (Lee ve diğ., 2005). Uygun seyreltme faktörü potasyum klorür tamponu, pH 1.0 (0.025 M) ve sodyum asetat tamponu, pH 4.5 (0.4 M) seyreltilerek

belirlenmiş ve seyreltme faktörü başlangıç hacmine göre hesaplanmıştır. Absorbans değerleri 520 ve 700 nm dalgaboyunda ölçülmüştür (Mónica Giusti ve Wrolstad, 2005). Sonuçlar, gram yaş madde başına mg siyanidin-3-glukozit madde (mg-cyn-3-glu / g-YM) eşdeğeri olarak açıklanmıştır. Seyreltilen örneklerin absorbans değeri denklem 3.4' e göre, toplam antosiyanin değeri ise denklem 3.5'e göre hesaplanmıştır. Moleküler kütlesi 449,2 g/mol olan siyanidin-3-glukozit için molar absorptivite 26,900 L/ molcm olarak kabul edilmiştir.

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \quad (3.4)$$

$$TA = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (3.5)$$

A: 520 ve 700 nm' deki absorbans değerleridir.

3.4.1.3. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi – DPPH

Ekstraktların 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali (DPPH) üzerindeki serbest radikal temizleme aktivitesi, Yu ve diğ. yöntemine göre bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir (Yu ve diğ., 2005). Analizler sırasında DPPH radikalinin 500 µM metanolik çözeltisi 100 µM' a seyreltilerek kullanılmıştır. 100 µL ekstrakt üzerine 600 µL metanol (%80, v/v) ve 3000 µL seyreltik DPPH çözeltisi ilave edilerek 25 ° C' de karanlıkta 30 dakika beklemeye bırakılmıştır. Absorbans, DPPH içermeyen metanol (%80, v/v) çözeltisine karşı 517 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar, gram yaş madde başına mg troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (mg-TEAC / g-YM) olarak ifade edilmiştir. Ekstraktların DPPH radikali üzerindeki süpürme etkisi Denklem 3.9 vasıtasıyla hesaplanmıştır. Farklı çözücüler için standart eğri denklemleri aşağıda verilmiştir:

$$\%20\ EtOH: H_2O\ için \quad A_{517} = 0,315(troloks) - 0,2830 \quad r = 0,9799 \quad (3.6)$$

$$\%50\ EtOH: H_2O\ için \quad A_{517} = 0,0320(troloks) - 0,2829 \quad r = 0,9893 \quad (3.7)$$

$$\%80 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{517} = 0,320(\text{troloks}) - 0,2935 \quad r = 0,9952 \quad (3.8)$$

A: 517 nm' deki absorbans değeri,

Troloks: mg/L cinsinden antioksidan kapasite değeridir.

$$\text{AA}(\% \text{inhibisyon}) = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (3.9)$$

3.4.1.4. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi – CUPRAC

Apak ve diğ.'nın bakır iyon indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi vişne ve şeftali yan ürünlerine tam olarak bildirildiği gibi uygulanmıştır (Apak ve diğ., 2008). Sırasıyla 4 mL' lik küvetlere 1000 μL (0,02 M) Cu^{+2} çözeltisi, 1000 μL (0,0075 M) neokuprin, 1000 μL (1M) NH_4Ac , 25 μL ekstrakt ve 1075 μL saf su eklenmiştir. 25°C' de karanlıkta 30 dakika bekletildikten sonra 450 nm' de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Sonuçlar, gram yaş madde başına mg troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (mg-TEAC / g-YM) olarak ifade edilmiştir. Farklı çözücüler için standart eğri denklemleri aşağıda verilmiştir:

$$\%20 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{450} = 0,0004(\text{troloks}) - 0,003 \quad r = 0,9963 \quad (3.10)$$

$$\%50 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{450} = 0,0004(\text{troloks}) - 0,0015 \quad r = 0,9675 \quad (3.11)$$

$$\%80 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{450} = 0,0004(\text{troloks}) - 0,002 \quad r = 0,9296 \quad (3.12)$$

A: 450 nm' deki absorbans değeri,

Troloks: mg/L cinsinden antioksidan kapasite değeridir.

3.4.1.5. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi – ABTS

Ekstraktların ABTS yöntemine göre serbest radikal temizleme aktivitesi, Re ve diğ.'nin modifiye edilmiş yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (Re ve diğ., 1999) 2850 µL seyreltilmiş ABTS çözeltisine 150 µL örnek eklendikten sonra, ABTS içermeyen boş bir örneğe karşı 734 nm'de 10. dakikada absorbans değeri ölçülmüştür. Sonuçlar, gram yaş madde başına mg troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (mg-TEAC / g-YM) olarak ifade edilmiştir. Farklı çözücüler için standart eğri denklemleri aşağıda verilmiştir:

$$\%20 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{734} = 0,0003(\text{troloks}) - 0,006 \quad r = 0,9745 \quad (3.13)$$

$$\%50 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{734} = 0,0004(\text{troloks}) - 0,0011 \quad r = 0,9541 \quad (3.14)$$

$$\%80 \text{ EtOH: H}_2\text{O için } A_{734} = 0,0003(\text{troloks}) - 0,002 \quad r = 0,9932 \quad (3.15)$$

A: 734 nm' deki absorbans değeri,

Troloks: mg/L cinsinden antioksidan kapasite değeridir.

3.4.2. Kromatografik Analiz

3.4.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi – HPLC

Elde edilen ekstraktlardaki bireysel komponentlerin tayini yüksek performanslı sıvı kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örtlü bir pompa, bir gaz giderici, bir manuel enjektör ve bir diyot dizisi detektöründen (DAD) oluşan Agilent 1260 kromatografik ekipmanından (Agilent, Waldbronn, Almanya) yararlanılmıştır. Fenolik asitlerin analizi için bir Eclipse Plus C18 RRHD 18 marka kolon (3.0 mm × 5.0 mm id, 1.8 µm partikül boyutu) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C, akış hızı 20 µL/dk ve enjeksiyon hacmi 20µL olarak belirlenmiştir. HPLC koşulları Tablo 3.6 'da verilmiştir.

Tablo 3.6: Spesifik polifenollerin analiz koşulları için HPLC gradient programı.

HPLC Koşulları	Program		
	Zaman (min)	A (%)	B (%)
Model: Agilent 1260 (Agilent, Waldbronn, Germany)			
Kolon: Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 18 (3,0 × 5,0 mm; 1,8 µm)	0.0	100	0
Mobil faz: A = Su + % 0,1 formik asit (v/v)	0.5	100	0
B = Asetonitril+ % 0,1 formik asit (v/v)	7.0	60	40
Tanımlama dalgaboyu: 276 nm	7.1	0	100
Akış hızı: 2 mL/min	8.6	0	100
Kolon sıcaklığı: 40 °C	8.7	100	0
Enjeksiyon hacmi: 20 µL	10	100	0

Siyanidin-3-glukozit, *p*-Hidroksibenzoik asit, *p*-Kumarik asit tayini için, farklı çözücülerle hazırlanan standart eğri denklemleri aşağıda verilmiştir:

$$\text{Siyanidin-3-glukozit} \quad \%20 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 13,69(\text{Konsantrasyon}) + 45,86 \quad r = 0,9896 \quad (3.16)$$

$$\%50 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 14,51(\text{Konsantrasyon}) + 44,27 \quad r = 0,9943 \quad (3.17)$$

$$\%80 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 15,21(\text{Konsantrasyon}) + 42,18 \quad r = 0,9921 \quad (3.18)$$

$$\text{p-Hidroksibenzoik Asit} \quad \%20 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 25,56(\text{Konsantrasyon}) + 14,32 \quad r = 0,9899 \quad (3.19)$$

$$\%50 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 25,21(\text{Konsantrasyon}) + 15,63 \quad r = 0,9935 \quad (3.20)$$

$$\%80 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 26,90(\text{Konsantrasyon}) + 13,95 \quad r = 0,9964 \quad (3.21)$$

$$\text{p-Kumarik Asit} \quad \%20 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 53,24(\text{Konsantrasyon}) + 321,54 \quad r = 0,9955 \quad (3.22)$$

$$\%50 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 56,32(\text{Konsantrasyon}) + 350,17 \quad r = 0,9864 \quad (3.23)$$

$$\%80 \text{ EtOH: H}_2\text{O için} \quad \text{Alan} = 59,65(\text{Konsantrasyon}) + 354,08 \quad r = 0,9972 \quad (3.24)$$

3.4.3. Morfolojik Analiz

3.4.3.1. Taramalı Elektron Mikroskobu – SEM

Vişne ve şeftali kabuklarının MDE, UDE, HDE ve OÇE yöntemleriyle ekstraksiyonundan sonra ve önceki yapısını incelemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. SEM analizleri sırasında Zeiss EVO® LS 10 cihazından yararlanılmıştır. Görüntüleme gerçekleştirilirken meydana gelebilecek elektrostatik yüklenmeyi önlemek adına numuneler altın film ile kaplanmıştır. Analizler 7 kV voltajda, numune için 0,5 cm kalınlık, 1,0 cm genişlik, 1 cm² yüzey alanında gerçekleştirilmiştir.

3.5. DENEYSEL TASARIM VE YANIT-YÜZEY YÖNTEMİ

Yanıt yüzey yöntemi (YYY) fiziksel deneylere veya bilgisayar deneylerine (simülasyonlar) ve deneysel gözlemlere dayanan deneysel bir optimizasyon prosedürüdür. İlk olarak 1951'de G.E.P. Box ve K.B. Wilson tarafından geliştirilmiştir. Optimizasyon yöntemlerin çoğunda, parametrelerin birbirlerine olan etkileri göz ardı edilir ve sadece farklı parametrenin sonuçlara olan etkileri hesaplanır. Ancak parametreler, özellikle fiziksel deneylerde genellikle birbirini etkilemektedir. Örneğin, parametreler yoğunluk ve sıcaklık ise, sıcaklık da yoğunluğu etkileyebileceğinden, yalnızca farklı iki etkiyi ele almak yeterli olmayacaktır. YYY, bu dezavantajı ortadan kaldırmayı amaçlayan bir yöntemdir.

Bu tezde, değişkenlerin yanıt değişkenleri üzerindeki etkisini keşfetmek için YYY aracılığıyla *Merkezi Bileşik Tasarım (CCD)* tasarımı seçilen bağımsız değişkenlerle uygulanmıştır. Bu amaçla Design-Expert (Statease, Minneapolis, MN, USA) yazılımından (versiyon 12.0) yararlanılmıştır. Yanıt yüzey yönteminde sonuçların tahmini için bir fonksiyon elde edilmiştir. Bu fonksiyonların aşağıdaki formül ile ifade edilmiştir:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3.25)$$

Denklemden Y; YYY için yanıt (response) değişkenini ifade etmektedir. β_0 ; sabit, β_i , lineer etki katsayısı, β_{ii} , ikinci dereceden kuvvetin etki katsayısı, β_{ij} (i ve $j = 4$); etkileşim katsayısı ve X_i ($i = 1-4$); kodlanmamış faktörü ifade etmektedir.

3.6. İSTATİSTİKSEL TASARIM

Deneyisel tasarım programı ile belirlenen modelin verifikasyonu ve değişkenlerin kendi aralarındaki etkileşimlerini incelemek amacıyla aynı yazılım ile varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, güvenilir veri elde etmek adına tüm denemeler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve bu ortalamalar ile standart sapma verileri kullanılarak InStat® yazılımı (GraphPad, San Diego, CA, ABD) ile istatistiksel açıdan incelenmiştir. Tukey testi vasıtasıyla parametreler arasındaki değişimlerin önem derecesi belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. VIŞNE YAN ÜRÜNLERİNE UYGULANAN EKSTRAKSİYON ÇALIŞMALARI

4.1.1. Yan Ürünlerin Karşılaştırmalı Sonuçları

Vişne suyu endüstrisinde vişne mahsulünden sadece vişne suyu elde edilmez. Vişne suyu üretilirken değerlendirilmediği takdirde atık olarak nitelendirilecek kabuk, posa, yaprak ve sap gibi yan ürünler de açığa çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında ilk olarak en yüksek miktarda biyoaktif özelliğe sahip olan yan ürün belirlenmiştir. Vişne suyu, kabuk, posa, yaprak ve sap gibi yan ürünlerinden elde edilen ekstraktlar Şekil 4.1’ de gösterilmiştir. Tablo 4.1, mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen toplam fenolik (TFM), antosiyanin (TA) ve antioksidan aktivite (DPPH radikalini süpürme etkisi) sonuçlarını karşılaştırmalı olarak göstermektedir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon prosesi Mikrodalga fırını (Milestone srl, NEOS-GR Bergamo, Italy) kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle etanol-su oranını belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda çözeltiler denenmiş ve % 80 etanol-su çözücü (85:15 0,1 N HCl) oranında karar kılınmıştır. Katı/sıvı oranı 0,5 g/ 30 mL alınarak 500 W ve 90 s şartlarında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.1: Vişne yan ürünlerine uygulanan MDE sonucundaki biyoaktif özellikler*.

	TFM (mg/ L)	DPPH (% indirgeme)	TA (mg/L)
Vişne Kabuğu	687,66±0,001 ^{a**}	66,34±0,001 ^a	193,62±0,001 ^a
Vişne Posası	228,50±0,002 ^b	70,28±0,002 ^b	7,51±0,002 ^b
Vişne Yaprığı	909,33±0,003 ^c	90,72±0,001 ^c	3,95±0,001 ^c
Vişne Sapı	722,67±0,001 ^d	91,30±0,003 ^d	0,00 ^d
Vişne Suyu	256,00±0,001 ^e	65,19±0,002 ^e	28,87±0,003 ^e

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

**Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p <0.05'te önemli bir fark gösterir.



Şekil 4.1: Vişne suyu, kabuk, posa, yaprak ve sap gibi yan ürünlerinden elde edilen ekstraktlar.

Vişne suyu, yan ürünlerine kıyasla daha düşük oranda TFM ve TA değerleri göstermiştir. En yüksek TFM içeriğine vişne yaprakları sahipken, en yüksek antosiyanin değerini ise vişne kabukları göstermiştir (yaprağa kıyasla 49 kat daha fazla TA). DPPH serbest radikalini süpürme etkisi açısından bakılacak olursa beş ürünün de hemen hemen yakın sonuçlar verdiğini görmekteyiz. Antosiyanin açısından en yüksek ekstraktı vişne kabuğu verdiği için ilerleyen çalışmalarda bu yan ürün ham madde olarak kullanılmıştır.

4.1.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

4.1.2.1.Ön Denemeler

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile vişne kabuklarından biyolojik olarak aktif maddelerce zengin ekstrakt elde etmek için istatistiksel deneysel tasarım yöntemi olan Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) kullanılmış ve Yüzey Merkezli Kompozit (YMK) tasarımı uygulanmıştır. Deneysel tasarım uygulanmadan önce MDE prosesini etkileyen en önemli parametreler olan mikrodalga güç seviyesi, çözücü konsantrasyonu (sulu etanol) ve ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Söz konusu bağımsız değişkenler belirlendikten sonra bu değişkenlerin seviyeleri belirlenmiştir. Tablo 4.2 vişne kabuklarından MDE yöntemi ile farklı güç, süre ve etanol konsantrasyonu değerlerinde elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarını göstermektedir. Her bir deneme için 0,15 g vişne kabuğu alınarak gerçekleştirilen MDE ön denemelerinde, mikrodalga gücü, süresi ve etanol konsantrasyonu için sabit değerler sırasıyla 60 s, 350 W ve % 50 olarak alınmıştır.

Tablo 4.2: Vişne kabuklarına uygulanan MDE ön denemeleri*.

Mikrodalga Gücü		Ekstraksiyon Süresi		Çözücü Konsantrasyonu	
Watt	TFM (mg-GAE/ g-YM)	s	TFM (mg-GAE/ g-YM)	%, v/v	TFM (mg-GAE/ g-YM)
150	15,0±0,001 ^{a**}	10	13,9±0,003 ^a	10	11,4±0,002 ^a
250	23,2±0,002 ^b	30	22,4±0,001 ^b	20	14,2±0,005 ^b
350	26,4±0,003 ^c	50	26,4±0,003 ^c	50	23,2±0,003 ^c
400	44,0±0,001 ^d	70	46,5±0,002 ^d	80	62,5±0,001 ^d
500	67,7±0,005 ^e	90	44,0±0,001 ^e	90	53,6±0,002 ^e
600	55,3±0,002 ^f	120	43,9±0,001 ^f	100	49,1±0,001 ^f

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

Farklı miktarlarda (150, 250, 350, 400, 500 ve 600 W) %50 etanol çözeltisi kullanılarak 60 saniye boyunca ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve elde edilen ekstraktların içerikleri başlangıçta 15 ile 67,7 mg-GAE/g-YM arasında değişmiştir. Gücü 600 W'a yükseldiğinde ise yaklaşık

olarak % 18'lik bir düşüş gözlenmiştir. 350 W'a kadar da çok iyi bir geri kazanım sağlanmamıştır. Dolayısıyla, mikrodalga güç seviyesi 350-500 W olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon süresi için ise 10, 30, 50, 70, 90 ve 120. saniyelerde örnekler analiz edilmiş, 90 saniye sonra ekstrakt veriminin TFM açısından düşüşe geçtiği gözlenmiştir. Sonuç olarak mikrodalga süresi 30-90 s olarak belirlenmiştir.

Son olarak 350 W değerinde 60 s MDE uygulanarak çözücü konsantrasyonu için seviye belirlenmiştir. Saf etanol kullanıldığında sulu etanole oranla daha düşük bir TFM verimi görülmüştür. Bu durum polarite ile açıklanabilir. Şöyle ki, etanole su ilave edildiğinde çözücünün polaritesi etkilenmekte ve polar fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu etkilemektedir (Wijngaard ve Brunton, 2009). Alkol-su karışımlarının kullanılması, özütleme oranlarını tek bileşenli çözücü sisteminden daha fazla geliştirdiği için bu etki beklenen bir durumdur. Yani ikili sistemde etanol, çözünen maddenin çözünürlüğünü iyileştirirken, su matristen hedef bileşenin desorpsiyonuna katkıda bulunur (Rajha ve diğ., 2014). Etanol konsantrasyon seviyesi ise % 20 ile 80 değerleri olarak belirlenmiştir.

4.1.2.2. Proses Parametrelerinin Etkisi

Tablo 4.3, Yüzey Merkezli Kompozit ile tasarlanan mevcut çalışmanın deneysel planını göstermektedir. Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, yazılım (Design-Expert) ilgili sistem için 5 merkez noktası (425 W, 60 s ekstraksiyon süresi ve % 50 etanol çözeltisi) ile 20 deneysel çalışma üretmiştir. Tablo 4.4 ise verilen şartlardaki deneysel sonuçları göstermektedir. Ayrıca, ilgili yazılım ile çizilen üç boyutlu (3 D) grafikler (Şekil 4.2-4.4), proses parametrelerinin etkisini görsel olarak sunmaktadır.

Tablo 4.3: Vişne kabuklarına uygulanan MDE metodunun deneysel tasarımı.

Deney No	Mikrodalga Gücü (W)	Ekstraksiyon Süresi (s)	Çözücü Konsantrasyonu (% v/v)
1	425	60	80
2	350	90	20
3	500	90	80
4	500	60	50
5	350	30	20
6	425	60	50
7	425	30	50
8	425	90	50
9	350	60	50
10	425	60	50
11	425	60	20
12	425	60	50
13	350	90	80
14	500	30	20
15	425	60	50
16	425	60	50
17	500	90	20
18	350	30	80
19	500	30	80
20	425	60	50

Toplam fenolik madde miktarı gram yaş malzeme başına 7,58 ile 45 mg-GAE arasında değişmektedir (Tablo 4.4). MDE ile elde edilen vişne kabuğu ekstraktlarının TA içeriği ise 2,85 ile 12,25 mg-cyn-3-glu/ g-YM arasında değerler almıştır.

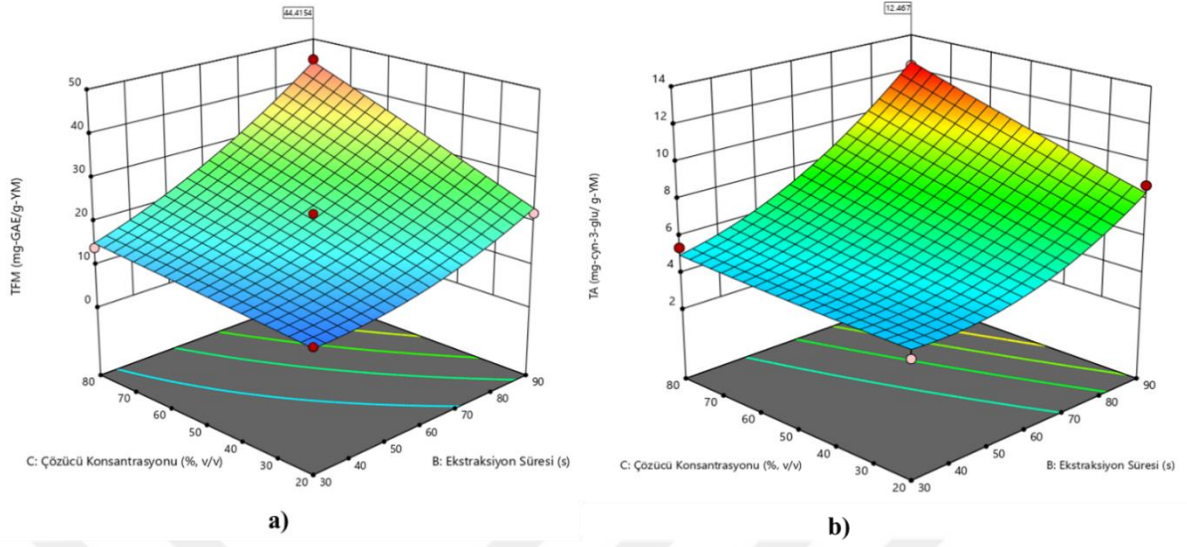
Tablo 4.4: Vişne kabuklarına uygulanan MDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.

Deney No	TFM (mg-GAE/ g-YM)	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)
1	20,14±0,004 ^{a**}	5,23±0,001 ^a
2	11,21±0,001 ^b	2,85±0,001 ^b
3	45,00±0,003 ^c	12,25±0,005 ^c
4	22,03±0,001 ^d	6,26±0,008 ^d
5	7,58±0,001 ^e	3,01±0,002 ^e
6	15,04±0,001 ^f	4,26±0,001 ^f
7	10,00±0,003 ^g	3,65±0,003 ^g
8	25,13±0,004 ^h	7,10±0,006 ^h
9	11,15±0,001 ⁱ	3,60±0,002 ⁱ
10	14,30±0,001 ^j	3,40±0,004 ^j
11	9,00±0,002 ^e	3,30±0,001 ^k
12	15,65±0,001 ^k	4,15±0,002 ^l
13	29,00±0,004 ^l	8,32±0,002 ^m
14	11,15±0,001 ⁱ	4,21±0,001 ⁿ
15	12,10±0,002 ^m	3,90±0,003 ^o
16	13,37±0,001 ⁿ	4,05±0,003 ^p
17	22,1±0,001 ^e	8,79±0,001 ^r
18	11,8±0,004 ^e	3,23±0,002 ^s
19	14,04±0,001 ^o	5,40±0,004 ^t
20	14,01±0,001 ^p	3,78±0,004 ^u

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

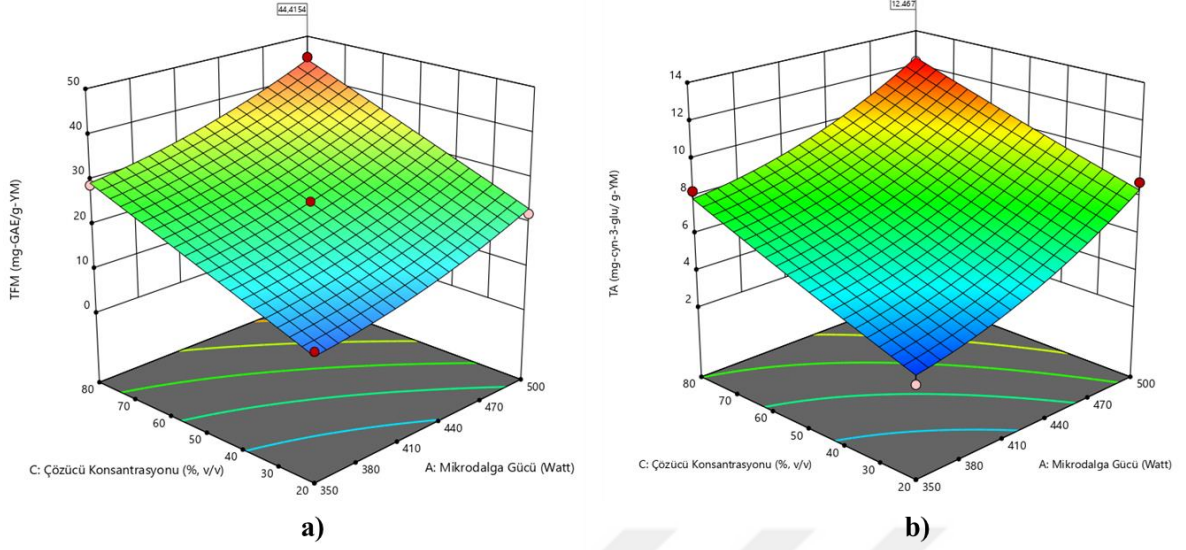
**Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p <0.05'te önemli bir fark gösterir.

Şekil 4.2, sabit mikrodalga gücünde (500 W) çözücü konsantrasyonu (EtOH) ve ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir.



Şekil 4.2: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, EtOH çözücü konsantrasyonunun ekstraksiyon süresine (Mikrodalga gücü= 500W) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

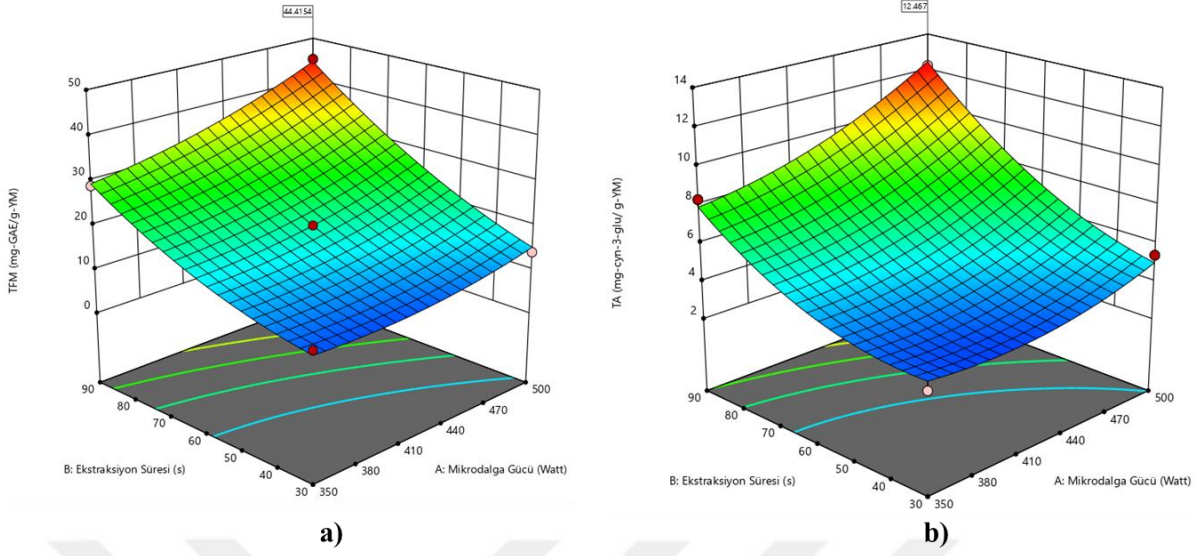
Şekil 4.2’de görüldüğü üzere TFM ve TA aynı eğilimi göstermiştir. Çözücü sistemi içindeki etanol konsantrasyonunun artması her iki bağımlı değişkeni de arttırmıştır. Saf etanolün tek başına çok başarılı bir solvent olmadığı Tablo 4.2’de gösterilmişti. Etanole su eklenmesi, ekstraksiyon oranını iyileştirmiş, ancak çok yüksek su içeriği, fenolikler dışındaki diğer bileşiklerin ekstraksiyonunu arttırmış ve ardından ekstraktlardaki toplam fenol konsantrasyonlarını düşürmüştür (Tomsone ve diğ., 2012). Ekstraksiyon süresinin artması ise her iki verimi de düzenli olarak arttırmıştır. Maserasyon işleminde metanol-su çözeltisi kullanılarak acı kavun yapraklarından toplam polifenol ekstraksiyonu sırasında da benzer zaman etkisi gözlemlenmiştir (Uysal ve diğ., 2019).



Şekil 4.3: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, EtOH çözücü konsantrasyonunun mikrodalga gücüne göre bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği (Ekstraksiyon süresi = 90 s).

Şekil 4.3, sabit ekstraksiyon süresinde (90 s) çözücü konsantrasyonu (EtOH) ve mikrodalga gücünün toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Benzer trend bu görsellerde de mevcut. Mikrodalga gücünün artması TFM ve TA verimlerini düzenli olarak yükseltmiştir. Singh ve diğ. de MDE ile patates kabuklarından fenolik antioksidanları ekstrakte ederken aynı mikrodalga güç etkisini gözlemlemişlerdir (A. Singh ve diğ., 2011).

Şekil 4.4 de sabit EtOH konsantrasyonunda (% 80, v/v) ekstraksiyon süresi ve mikrodalga gücünün toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Yukarıda da açıklandığı gibi her iki bağımsız değişkenle beraber TFM ve TA içerikleri düzenli olarak artış göstermişlerdir.



Şekil 4.4: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin mikrodalga gücüne göre bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği (Çözücü konsantrasyonu = % 80, v/v).

4.1.2.3. Modelleme

Design-Expert (versiyon 12) yazılımı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) testi uygulanmış ve istatistiksel parametreler hesaplanmıştır. Bu parametreler F ve p-değerleri, uyum eksikliği (lack of fit) değeri, belirleme katsayısı (R^2), ayarlanmış (adjusted) belirleme katsayısı (R^2_a), tahmini (predicted) belirleme katsayısı (R^2_t) ve varyasyon katsayısı (CV) şeklindedir. Tablo 4.5 ve 4.6, YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak MDE ile vişne kabukların TFM ve TA ekstraksiyonu için hesaplanmış olan ANOVA test sonuçlarını sergilemektedir.

Tablo 4.5: MDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.

TFM	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	1434,58	9	159,40	90,97	< 0,0001	önemli
A- Mikrodalga Gücü	189,97	1	189,97	108,42	< 0,0001	
B- Ekstraksiyon Süresi	606,30	1	606,30	346,03	< 0,0001	
C- Çözücü Konsantrasyonu	347,33	1	347,33	198,23	< 0,0001	
AB	55,52	1	55,52	31,69	0,0002	
AC	1,78	1	1,78	1,02	0,3371	
BC	140,99	1	140,99	80,47	< 0,0001	
A²	10,33	1	10,33	5,89	0,0356	
B²	23,33	1	23,33	13,32	0,0045	
C²	0,0186	1	0,0186	0,0106	0,9199	
Kalıntı	17,52	10	1,75			
Uyum Eksikliği	9,61	5	1,92	1,21	0,4182	önemsiz
Saf Hata	7,91	5	1,58			

Tablo 4.6: MDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TA için ANOVA analizi.

TA	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	108,26	9	12,03	51,99	< 0,0001	önemli
A- Mikrodalga Gücü	25,28	1	25,28	109,26	< 0,0001	
B- Ekstraksiyon Süresi	39,24	1	39,24	169,60	< 0,0001	
C- Çözücü Konsantrasyonu	15,06	1	15,06	65,07	< 0,0001	

Tablo 4.6 (devam):

AB	5,28	1	5,28	22,82	0,0007	
AC	0,1352	1	0,1352	0,5843	0,4623	
BC	7,07	1	7,07	30,55	0,0003	
A²	1,53	1	1,53	6,62	0,0277	
B²	3,90	1	3,90	16,87	0,0021	
C²	0,0182	1	0,0182	0,0787	0,7848	
Kalıntı	2,31	10	0,2314			
Uyum Eksikliği	1,84	5	0,3676	3,86	0,0821	önemsiz
Saf Hata	0,4757	5	0,0951			

TFM ve TA için türetilen modellerin her ikisi de F (90,97 ve 51,99) ve p (<0,0001) değerleri dikkate alınarak anlamlı bulunmuştur. Diğer taraftan, eşitlik (4.1) ve (4.2), sırasıyla TFM ve TA için kodlanmış faktörler açısından Design-Expert tarafından türetilmiş olan son denklemleri vermektedir:

$$\text{TFM} \quad 14,30 + 4,36 A + 7,79 B + 5,89 C + 2,63 AB + 0,4719 AC + 4,20 BC + 1,94A^2 + 2,91 B^2 - 0,0823 C^2 \quad (4.1)$$

$$\text{TA} \quad 4,03 + 1,59 A + 1,98 B + 1,23 C + 0,8125 AB - 0,1300 AC + 0,9400 BC + 0,7464A^2 + 1,19 B^2 + 0,0814 C^2 \quad (4.2)$$

Kullanılmış olan istatistiksel deneysel tasarım yönteminde parametrelerin önemi p-değerlerine göre belirlenir. $p < 0,05$ ise bu, o terimlerin ilgili sistem üzerinde etkili olduğu anlamına gelir. Buna dayanarak, seçilen tüm bağımsız faktörler, polifenollerin ekstraksiyonu (Tablo 4.5) için önemli bulundu ($p < 0,0001$). Bu parametrelerin içerisinde MDE sistemini etkileyen en önemli parametre ise F-değeri en yüksek olan ekstraksiyon süresi olarak görülmektedir. Benzer sonuç TA açısından da gözlenmiştir (Tablo 4.6). Ayrıca, parametreler arasındaki etkileşiminde

mikrodalga gücü ve EtOH konsantrasyonu arasındaki etkileşim hariç, sistemi istatistiksel açıdan önemli derecede etkilediği gözlenmektedir ($p < 0,05$). EtOH konsantrasyonunun ikinci dereceden kuvveti hariç, diğer parametrelerin ikinci dereceden kuvvetleri de söz konusu MDE sistemi için istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

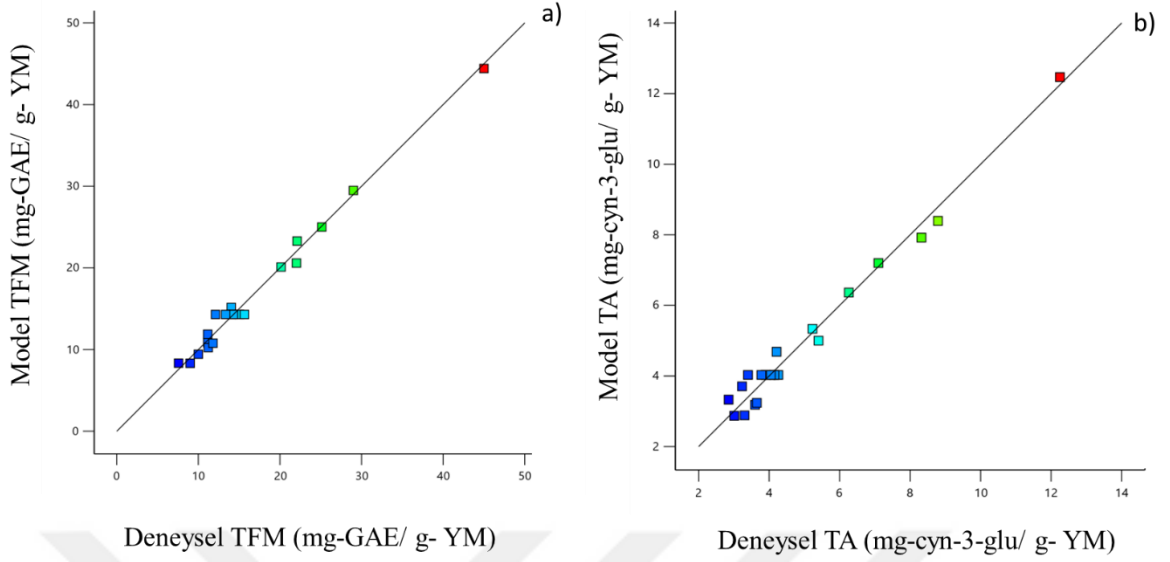
Deneysel verileri kullanarak üretilen bu ikinci dereceden polinom eşitliklerin her birinin verilere ne kadar iyi uyduğunu teşhis eden bir diğer önemli gösterge ise uyum eksikliği (lack of fit) değeridir. Belirgin uyum eksikliği olan modeller ($p < 0,05$), tahminler için kullanılmamalıdır. Dolayısıyla, her iki cevap değeri için üretilen modellerde bu değer 0,05'ten büyük hesaplanmış ve bu durum da kullanılan modellerin veriler için uygun olduğunu desteklemektedir.

Tablo 4.7 ise her iki cevap değeri için standart sapma (SD), R^2 , R^2_a , R^2_t ve CV değerlerini göstermektedir. Yüksek belirleme katsayılarına ($> 0,97$) bağlı olarak, cevap değerlerindeki toplam varyasyonun sadece ~% 3' ünün türetilen denklemler ile açıklanamayacağı sonucuna varabiliriz (Kurtulbaş ve diğ., 2019). Ayrıca, R^2_a , R^2_t ile makul bir uyum içindedir. Ek olarak, CV değeri % 10' dan azdır ve göreceli değişkenliği göstermektedir. CV düştükçe tahminin kesinliği artmaktadır (Şahin ve diğerleri, 2021).

Tablo 4.7: MDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.

Cevap Değişkeni	SD	R^2	R^2_a	R^2_t	CV
TFM(mg-GAE/ g-YM)	1,32	0,9879	0,9771	0,8885	7,93
TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,48	0,9791	0,9602	0,7159	9,55

ANOVA bulgularına dayanarak, her iki sistem (TFM ve TA) için de deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında tatmin edici bir ilişki olduğu söylenebilir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Vişne kabuklarına uygulanan MDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.

4.1.2.4. Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları

Tablo 4.8, YMK tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek TFM (44,15 mg-GAE/ g- YM) ve TA (12,47 mg-cyn-3-glu/ g- YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi MDE proses şartlarını vermektedir. Koşulların doğrulanması da test edilmiştir. Deneysel ve hesaplanan sonuçlar arasındaki kalıntının kabul edilebilir olması da modelin söz konusu sistemler için uygun olduğunu desteklemektedir.

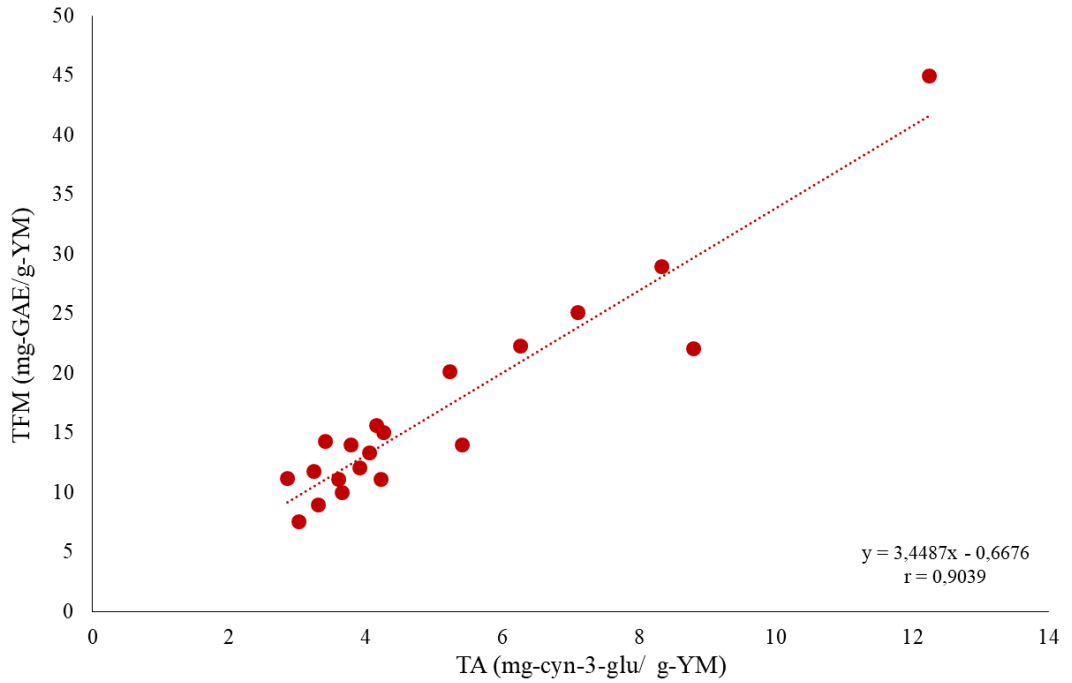
Tablo 4.8: Vişne kabuklarının MDE için optimum koşullar ve validasyon.

Optimum Ekstraksiyon Koşulları			Parametre	Öngörülen Sonuç	Deneysel Sonuç	Hata Oranı (%)
A (W)	B (s)	C (% , v/v)	TFM (mg-GAE/ g- YM)	44,15	42,65±0,001	3,52
500	90	80	TA (mg-cyn-3-glu/ g- YM)	12,47	12,30±0,003	1,38

4.1.2.5. Biyoaktif İçeriğin Değerlendirilmesi

Çalışma materyali olarak seçilmiş olan vişne kabuklarının sahip olduğu biyoaktif özellikler toplam fenolik, antosiyanin ve çeşitli testlerle (DPPH, CUPRAC ve ABTS) ölçülmüş olan antioksidan aktivite değerleri açısından değerlendirilmiştir. İlgili bağımlı değişkenler arasındaki korelasyon katsayıları aracılığıyla ilgili ilişkiyi doğrulamak için matematiksel bir ifade oluşturulabilir (Elhussein ve diğ., 2018).

Şekil 4.6, MDE ile çeşitli koşullarda ekstrakte edilen vişne kabuklarının içeriğindeki TFM ve TA arasındaki ilişkiyi sergilemektedir. Korelasyon katsayısının 0,90' dan büyük bir değer vermesi toplam antosiyaninlerin seçilen atık ürünün biyofenol kapasitesine katkısının ne derece yüksek olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.6: MDE ile hazırlanan vişne kabuğu ekstraktının TFM ile TA değerleri arasındaki ilişki.

Tablo 4.9: Vişne yapraklarına uygulanan MDE ile elde edilen ekstraktların DPPH, CUPRAC ve ABTS testleri ile ölçülen antioksidan aktivite değerlerinin karşılaştırmalı sonuçları*.

Deney No	DPPH (mg-TEAC/ g-YM)	CUPRAC (mg-TEAC/ g-YM)	ABTS (mg-TEAC/ g-YM)
1	46,58±0,007 ^{a**}	17,85±0,006 ^a	12,99±0,005 ^a
2	29,15±0,005 ^b	16,13±0,001 ^b	11,11±0,001 ^b
3	71,27±0,004 ^c	27,38±0,002 ^c	34,65±0,002 ^c
4	42,74±0,004 ^d	16,88±0,003 ^d	19,46±0,005 ^d
5	32,01±0,001 ^e	15,77±0,005 ^e	13,88±0,001 ^e
6	38,88±0,003 ^f	18,38±0,001 ^f	14,62±0,004 ^f
7	37,18±0,005 ^g	21,38±0,007 ^g	12,80±0,003 ^g
8	48,66±0,004 ^h	19,50±0,005 ^h	22,39±0,001 ^h
9	33,96±0,001 ⁱ	12,75±0,006 ⁱ	14,23±0,005 ⁱ
10	38,82±0,003 ^f	20,25±0,004 ^j	14,73±0,001 ^j
11	38,76±0,002 ^j	16,50±0,002 ^k	8,25±0,003 ^k
12	38,95±0,001 ^k	18,38±0,001 ^f	14,72±0,002 ^j
13	57,80±0,002 ^l	21,38±0,002 ^g	25,66±0,001 ^l
14	31,88±0,001 ^m	16,13±0,001 ^b	9,48±0,002 ^m
15	37,56±0,001 ⁿ	19,13±0,003 ^l	14,24±0,001 ⁱ

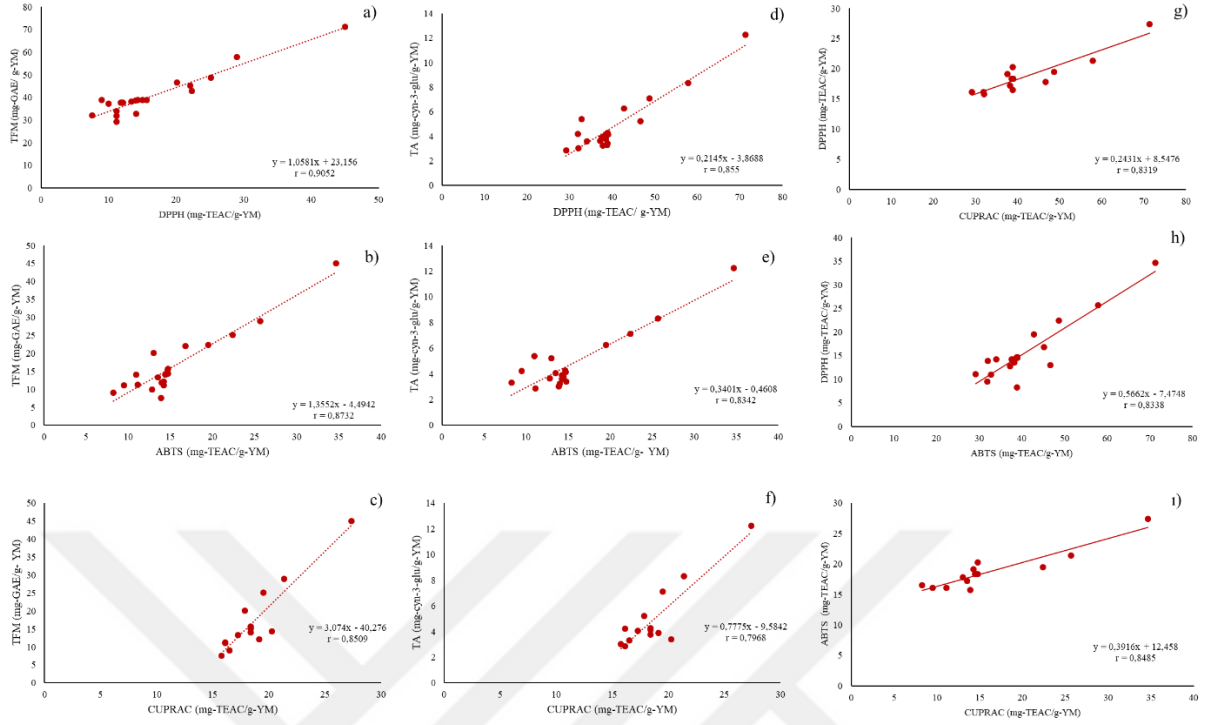
Tablo 4.9 (devam):

16	38,21±0,001 ^o	17,25±0,001 ^m	13,52±0,002 ⁿ
17	45,16±0,002 ^p	16,50±0,002 ^k	16,76±0,003 ^o
18	37,75±0,003 ^r	14,63±0,001 ⁿ	13,98±0,004 ^p
19	32,76±0,002 ^s	18,75±0,001 ^o	10,95±0,002 ^r
20	38,51±0,001 ^t	18,38±0,003 ^f	14,42±0,006 ^s

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

Tablo 4.9 ise Tablo 4.3' te verilen şartlarda elde edilmiş olan ekstraktların antioksidan aktivite değerlerini vermektedir. Şekil 4.7 ise bu testlerin doğruluğunu göstermektedir. Her bir test sonucunun birbiri arasındaki pozitif ve tatmin edici korelasyon (> 0,83) sonuçların doğruluğunu test etmektedir. Diğer taraftan, TFM ve TA ile antioksidan aktivite arasındaki güçlü pozitif korelasyon (> 0,79), toplam biyofenollerin vişne kabuğunun antioksidan kapasitesine katkısını doğrulamaktadır.

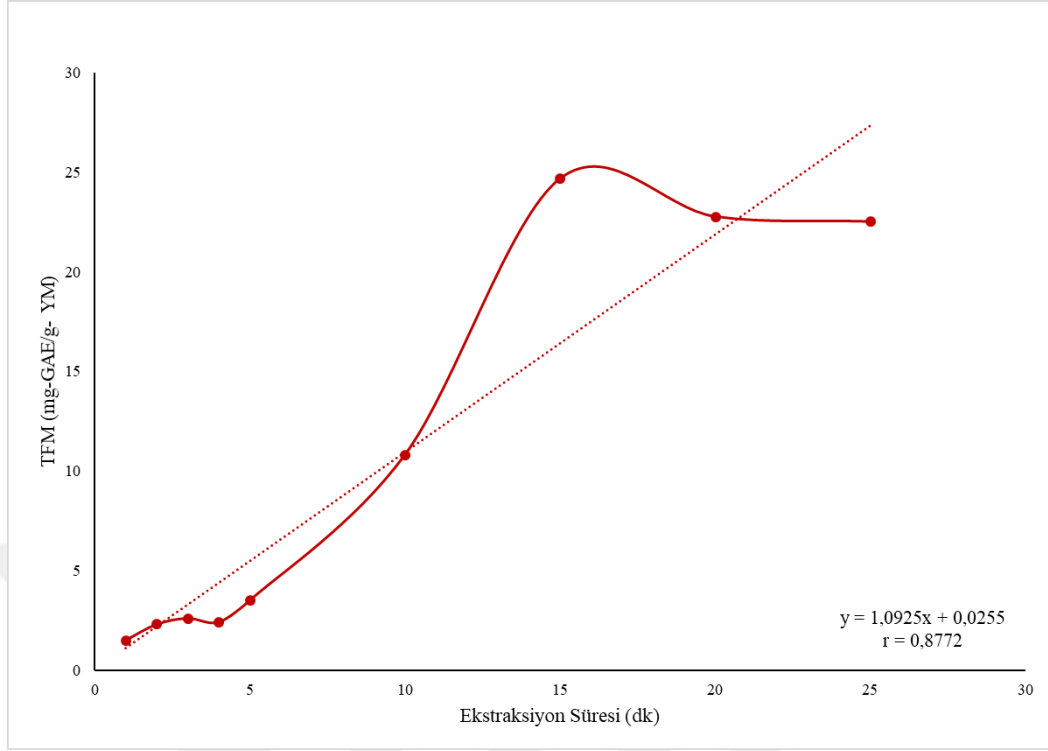


Şekil 4.7: MDE ile hazırlanan vişne kabuğu ekstraktının a) TFM ile DPPH, b) TFM ile ABTS, c) TFM ile CUPRAC, d) TA ile DPPH, e) TA ile ABTS, f) TA ile CUPRAC, g) DPPH ile CUPRAC, h) DPPH ile ABTS, i) CUPRAC ile ABTS değerleri arasındaki ilişkisi.

4.1.3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

4.1.3.1.Ön Denemeler

Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile vişne kabuklarından biyolojik olarak aktif maddelerce zengin ekstrakt elde etmek için rutin çalışmalara geçmeden önce sistemin ekstraksiyon süresi belirlenmiştir (Şekil 4.8). Ekstraksiyon süresinin belirlenmesi için gerçekleştirilen denemelerde 0,5 g vişne yaprağı kullanılmış. Genlik değeri %30' da sabit tutulmuştur.



Şekil 4.8: Vişne kabuklarına uygulanan UDE metodunda ekstraksiyon süresinin belirlenmesi.

Şekil 4.8’ den de görüldüğü gibi ilk 15 dakika verim çok hızlı bir şekilde artmış, 15 dakikadan sonra ise keskin bir düşüşe geçmiştir. UDE sürecinin burada iki ana aşaması vardır. Öncelikle bitki matrisinin yüzeylerinde çözünen bileşenlerin çözünmesi meydana gelir ve buna “yıkama” da denir. İkinci olarak, çözünen maddenin bitki matrisinden çözücüye difüzyon ve osmatik süreçlerle kütle transferi, “yavaş ekstraksiyon” (Bilgin ve Şahin, 2013). Bu iki olay Şekil 4.8’ de açıkça görülmektedir. Ekstraksiyonun başlangıcında hızlı bir artışla yıkama gerçekleşmektedir. 15 dakika sonra, yavaş ekstraksiyon, düşük bir artışla gözlenmektedir. Bu nedenle, ekstrakte edilen vişne kabuklarının denge konsantrasyonunu veren bu işlemde 15 dakika optimum süre olarak kabul edilmiştir.

4.1.3.2. Proses Parametrelerinin Etkisi

Tablo 4.10, Yüzey Merkezli Kompozit ile tasarlanan mevcut çalışmanın deneysel planını göstermektedir. Tablo 4.10’ da görüldüğü gibi, yazılım (Design-Expert) ilgili sistem için 5

merkez noktası (% 30 genlik, 0,3 gram örnek ve % 50 etanol çözeltisi) ile 20 deneysel çalışma üretmiştir. Tablo 4.11 ise verilen şartlardaki deneysel sonuçları göstermektedir. Ayrıca, ilgili yazılım ile çizilen üç boyutlu grafikler (Şekil 4.9-4.11), proses parametrelerinin etkisini görsel olarak sunmaktadır.

Tablo 4.10: Vişne kabuklarına uygulanan UDE metodunun deneysel tasarımı.

Deney No	Genlik (%)	Katı Madde Miktarı (g)	Çözücü Konsantrasyonu (% v/v)
1	50	0,1	80
2	30	0,3	50
3	30	0,3	50
4	10	0,3	50
5	30	0,3	50
6	50	0,3	50
7	50	0,1	20
8	30	0,1	50
9	30	0,3	50
10	50	0,5	80
11	10	0,1	80
12	30	0,3	50
13	10	0,5	20
14	30	0,3	20
15	50	0,5	20
16	10	0,5	80
17	30	0,3	80
18	10	0,1	20
19	30	0,3	50
20	30	0,5	50

Toplam fenolik madde miktarı gram yaş malzeme başına 18,65 ile 47,59 mg-GAE arasında değişmektedir (Tablo 4.11). UDE ile elde edilen vişne kabuğu ekstraktlarının toplam antosiyanin içeriği ise 2,78 ile 7,30 mg-cyn-3-glu/ g-YM arasında değerler almıştır.

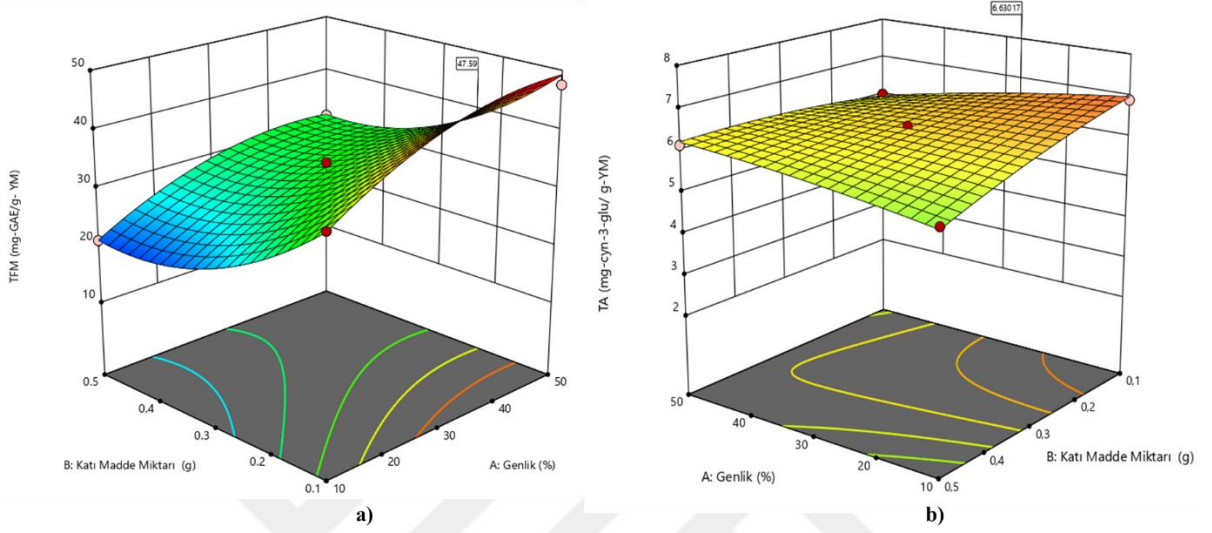
Tablo 4.11: Vişne kabuklarına uygulanan UDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.

Deney No	TFM (mg-GAE/ g-YM)	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)
1	47,59±0,001 ^{a**}	6,00±0,002 ^a
2	30,39±0,008 ^b	6,54±0,001 ^b
3	30,39±0,008 ^b	5,90±0,003 ^c
4	18,65±0,002 ^c	6,37±0,002 ^d
5	25,36±0,003 ^d	5,83±0,001 ^e
6	31,93±0,004 ^e	5,38±0,001 ^f
7	35,73±0,005 ^f	2,78±0,003 ^g
8	41,25±0,001 ^g	5,38±0,001 ^f
9	28,25±0,002 ^h	6,02±0,000 ^h
10	31,55±0,001 ⁱ	6,13±0,001 ⁱ
11	36,46±0,003 ^j	6,90±0,005 ^j
12	28,69±0,006 ^k	6,02±0,002 ^h
13	23,65±0,003 ^l	7,30±0,001 ^k
14	24,77±0,001 ^m	5,56±0,003 ^l
15	27,83±0,005 ⁿ	6,29±0,001 ^m
16	21,00±0,001 ^o	5,61±0,005 ⁿ
17	34,56±0,002 ^p	6,42±0,006 ^o
18	27,61±0,003 ^r	5,73±0,001 ^p
19	29,78±0,001 ^s	5,76±0,001 ^r
20	27,21±0,001 ^t	6,29±0,006 ^m

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

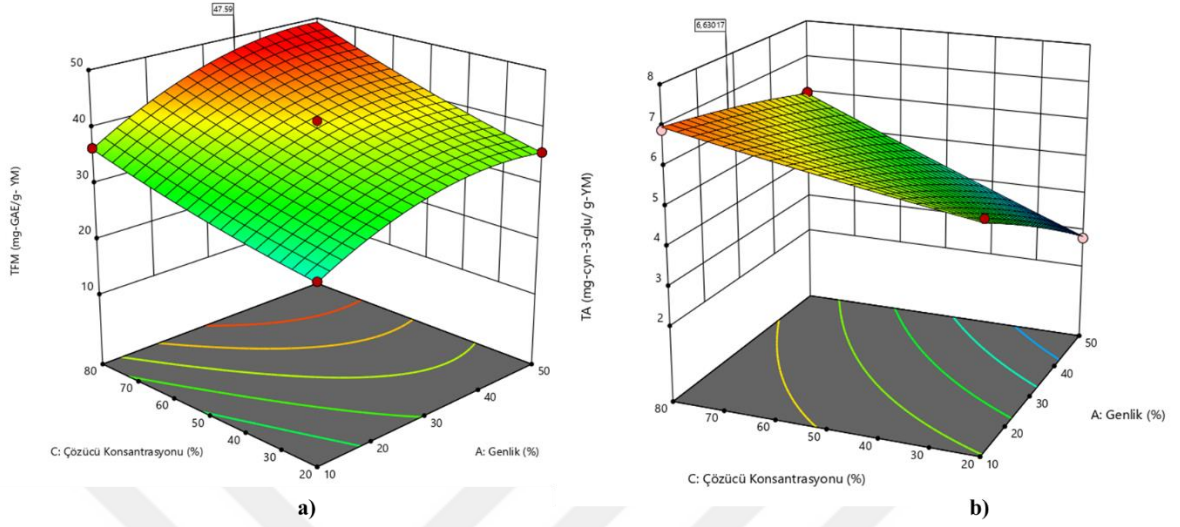
Şekil 4.9, sabit EtOH konsantrasyonunda (% 80, v/v) genlik değeri ve katı madde miktarının toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir.



Şekil 4.9: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, genlik değerinin katı madde miktarına (Çözücü konsantrasyonu= % 80, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

UDE yöntemi ile vişne kabuklarının ekstraksiyonunda genlik artışının özellikle TFM açısından pozitif bir etkisi olduğu görülmektedir (Şekil 4.9). Bu beklenen bir sonuçtur. Zira enerjinin artırılması difüzyonu destekleyen bir durum olduğu için polifenollerin ekstraksiyonunu arttırmaktadır. Benzer bir sonuç hibiskus çiçeğinden fenolik bileşiklerin UDE ile ekstraksiyonunda da gözlenmiştir (Şahin ve diğ., 2020). Katı madde miktarının etkisine bakılacak olursa, TA için çok hafif bir etkisi olduğu söylenebilir. TFM açısından değerlendirilecek olursa, önce bir azalma ardından yükselişe geçme gibi bir etki gözlenmektedir. Bu bulgu, numune kütlesinin artmasının yüzey alanını azaltmasıyla açıklanabilir. Numune kütlesinin artırılması, solventin numune matrisine nüfuz etmesi ve fenolikleri çözündürmesi için mevcut yüzey alanını düşürür, böylece bu hedef bileşenlerin ekstraksiyon veriminde bir azalmaya neden olur (Şahin, 2015).

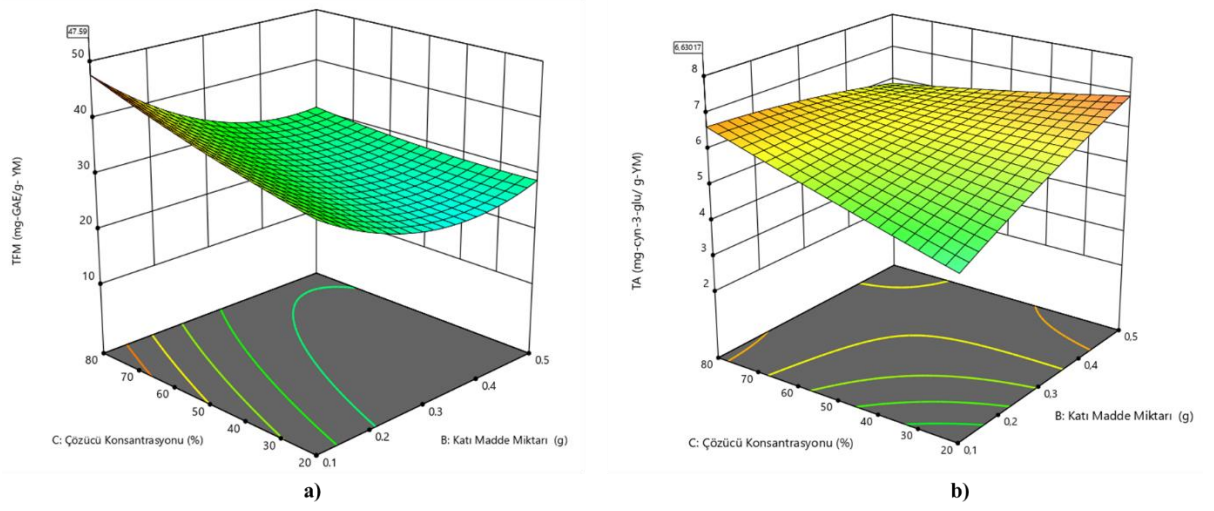
Şekil 4.10, sabit katı madde miktarında (0,1 g) genlik değeri ve EtOH konsantrasyonunun toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir.



Şekil 4.10: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, genlik değerinin çözücü konsantrasyonuna (Katı madde miktarı=0,1) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Çözücü konsantrasyonu her iki sistem üzerinde de benzer bir etki yapmıştır. Sulu alkol sisteminde alkol oranının artması TFM ve TA verimlerini düzenli olarak arttırmıştır. Bu durum MDE sisteminde de gözlenmiştir. Yukarıda yapılmış olan açıklamalara ilave olarak su-EtOH ikilisinin başarısını şu şekilde de açıklayabiliriz: Suyun bitkisel malzemeyi şişirme ajanı olarak hareket etmesi, etanolün çözünen maddeler ve bitki matrisleri arasındaki bağları koparması ekstraksiyon veriminin lehine bir durum olmaktadır (Ilbay ve diğ., 2013).

Şekil 4.11, sabit genlik değerinde (%34,34) katı madde miktarı ve EtOH konsantrasyonunun toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Katı madde miktarı ve çözücü konsantrasyonunun, UDE sistemi üzerine etkileri Şekil 4.11' de sergilenmektedir.



Şekil 4.11: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının çözücü konsantrasyonuna (Genlik= % 34,34) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

4.1.3.3. Modelleme

UDE yöntemi ile vişne kabuklarından TFM ve TA açısından zengin ekstrakt elde ederken de ANOVA tablosu üretilmiştir. Tablo 4.12 ve 4.13, YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak UDE ile vişne kabuklarından TFM ve TA ekstraksiyonu için hesaplanmış olan ANOVA test sonuçlarını göstermektedir. Her iki cevap değeri için üretilmiş olan ikinci dereceden polinom denklemler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$).

Tablo 4.12: UDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.

TFM	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F- değeri	p-değeri	
Model	819,00	9	91,00	22,51	< 0,0001	önemli
A-Genlik	223,32	1	223,32	55,24	< 0,0001	
B-Katı Madde Miktarı	329,49	1	329,49	81,51	< 0,0001	
C-Çözücü Konsantrasyonu	99,68	1	99,68	24,66	0,0006	

Tablo 4.12 (devam):

AB	2,56	1	2,56	0,6323	0,4450	
AC	11,03	1	11,03	2,73	0,1296	
BC	48,16	1	48,16	11,91	0,0062	
A²	35,05	1	35,05	8,67	0,0147	
B²	79,27	1	79,27	19,61	0,0013	
C²	1,78	1	1,78	0,4403	0,5220	
Kalıntı	40,43	10	4,04			
Uyum Eksikliği	22,23	5	4,45	1,22	0,4155	önemsiz
Saf Hata	18,19	5	3,64			

Tablo 4.13: UDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.

TA	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F- değeri	p-değeri	
Model	14,32	9	1,59	34,93	< 0.0001	önemli
A-Genlik	2,83	1	2,83	62,08	< 0.0001	
B-Katı Madde Miktarı	2,34	1	2,34	51,39	< 0.0001	
C-Çözücü Konsantrasyonu	1,15	1	1,15	25,33	0,0005	
AB	1,42	1	1,42	31,06	0,0002	
AC	1,60	1	1,60	35,23	0,0001	
BC	4,86	1	4,86	106,78	< 0.0001	
A²	0,0168	1	0,0168	0,3695	0,5568	
B²	0,0374	1	0,0374	0,8220	0,3859	
C²	0,0042	1	0,0042	0,0925	0,7673	
Kalıntı	0,4555	10	0,0456			
Uyum Eksikliği	0,0718	5	0,0144	0,1872	0,9552	önemsiz
Saf Hata	0,3837	5	0,0767			

Eşitlik (4.3) ve (4.4), sırasıyla TFM ve TA için kodlanmış faktörler açısından Design-Expert tarafından türetilmiş olan son denklemleri vermektedir:

$$\begin{aligned} \text{TFM} \quad & 28,83 + 4,73 A - 5,74 B + 3,16 C - 0,5653 AB + 1,17 AC - \\ & 2,45 BC - 3,57 A^2 + 5,37 B^2 + 0,8045 C^2 \end{aligned} \quad (4.3)$$

$$\begin{aligned} \text{TA} \quad & 5,99 - 0,5318 A + 0,4838 B + 0,3397 C + 0,4206 AB + \\ & 0,4479 AC - 0,7797 BC - 0,0782 A^2 - 0,1167 B^2 + 0,0391 C^2 \end{aligned} \quad (4.4)$$

Vişne kabuklarının UDE ile ekstraksiyon prosesinde seçilmiş olan bağımsız parametreler, sistem için önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Tablo 4.12’ de görüldüğü gibi TFM için çözücü konsantrasyonu ve katı madde miktarı arasındaki etkileşim hariç, etkileşimler istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca, EtOH konsantrasyonunun ikinci dereceden kuvveti hariç diğer parametrelerin ikinci dereceden kuvvetleri etkili bulunmuştur. TA açısından ANOVA sonuçları incelendiğinde (Tablo 4.13), tüm bağımsız değişken etkileşimleri etkili olarak gözlenmektedir ($p < 0,05$). TA sistemi için bağımsız değişkenlerin ikinci dereceden kuvvetleri istatistiksel açıdan etkili bulunmamıştır ($p > 0,05$).

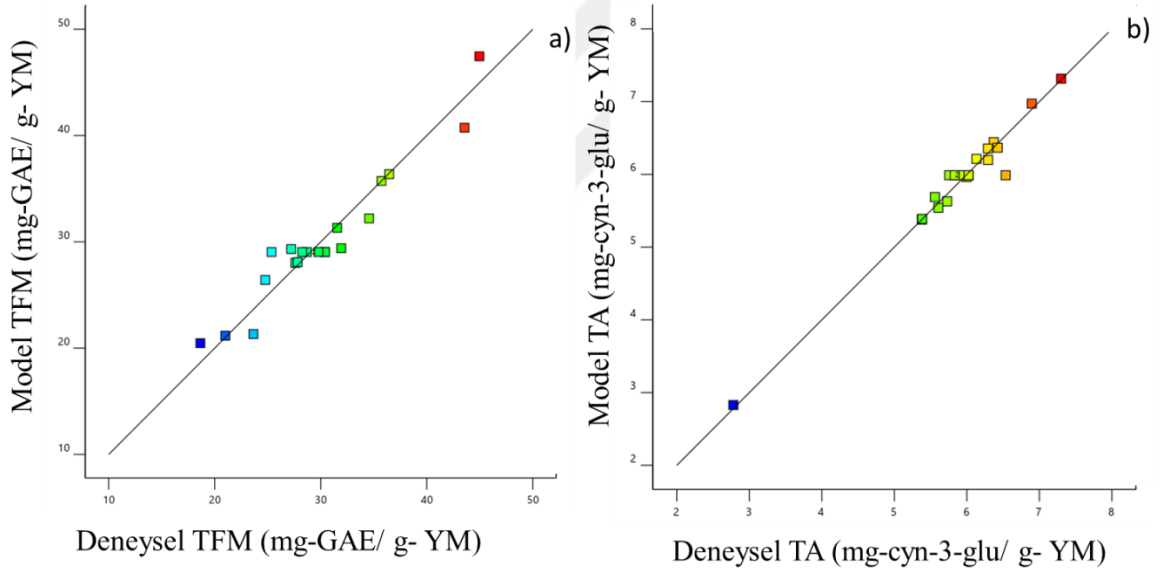
Diğer taraftan, uyum eksikliği değeri her iki cevap değeri için p , 0,05’ten büyük hesaplanmış ve bu durum da kullanılan modellerin veriler için uygun olduğunu desteklemektedir.

Tablo 4.14 ise her iki cevap değeri için SD, R^2 , R^2_a , R^2_t ve CV değerlerini göstermektedir. Yüksek belirleme katsayılarına ($> 0,92$) bağlı olarak, cevap değerlerindeki toplam varyasyonun sadece ~% 8’ inin türetilen denklemler ile açıklanamayacağı sonucuna varabiliriz. CV değeri de oldukça tatmin edici olarak hesaplanmıştır ($< \% 10$).

Tablo 4.14: UDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.

Cevap Değişkeni	SD	R ²	R ² _a	R ² _t	CV
TFM(mg-GAE/ g-YM)	2,01	0,9530	0,9106	0,7464	6,67
TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,21	0,9692	0,9414	0,8965	3,61

ANOVA bulgularına dayanarak, her iki sistem (TFM ve TA) için de deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında tatmin edici bir ilişki olduğu söylenebilir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Vişne kabuklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.

4.1.3.4.Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları

Tablo 4.15, YMK tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek TFM (47,59 mg-GAE/ g-YM) ve TA (6,63 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi UDE proses şartlarını vermektedir. Koşulların doğrulanması da

test edilmiştir. Deneysel ve hesaplanan sonuçlar arasındaki kalıntının kabul edilebilir olması da modelin söz konusu sistemler için uygun olduğunu desteklemektedir.

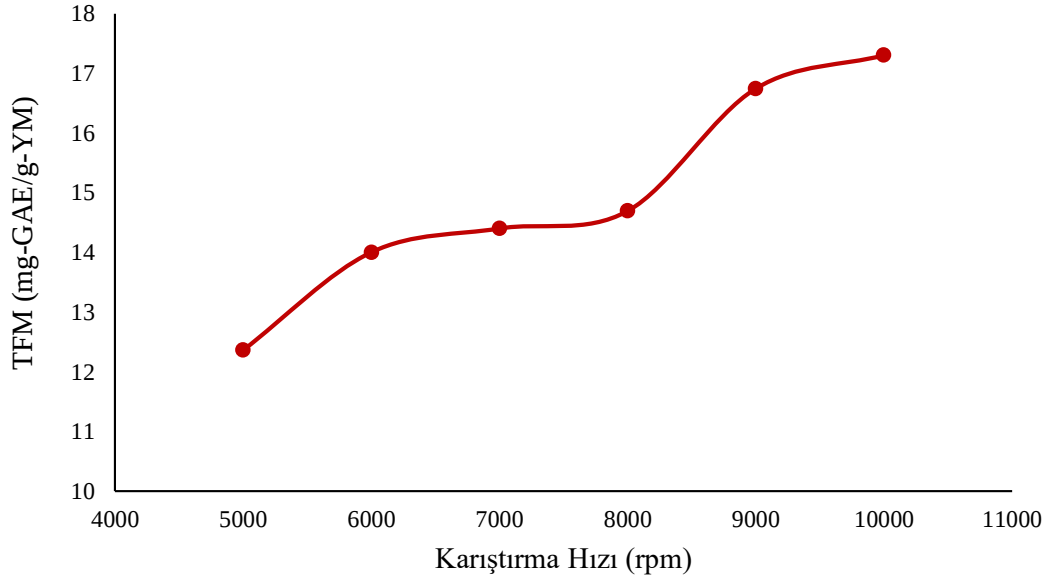
Tablo 4.15: Vişne kabuklarının UDE için optimum koşullar ve validasyon.

Optimum Ekstraksiyon Koşulları			Parametre	Öngörülen Sonuç	Deneysel Sonuç	Hata Oranı (%)
A (%)	B (g)	C (% v/v)	TFM (mg-GAE/ g-YM)	47,59	49,90±0,002	4,62
34,34	0,1	80	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	6,63	6,57±0,001	0,91

4.1.4. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon

4.1.4.1.Ön Denemeler

Homojenizatör destekli ekstraksiyon yöntemi oda sıcaklığında gerçekleştirilen ve prosesi etkileyen çok fazla bağımsız değişkenin söz konusu olmadığı son derece ekonomik ve basit bir sistemdir. Daha önce gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda karıştırma hızının sistemi etkileyen en önemli parametrelerden biri olduğu raporlanmıştır (Yazar ve diğ., 2019). Vişne kabuklarından HDE ile TFM ve TA açısından zengin bir ekstrakt elde etmek için kullanılacak olan Yanıt Yüzey Yöntemi' nin Yüzey Merkezli Kompozit tasarımını uygulanmadan önce prosesi etkileyen en önemli parametrelerden olan karıştırma hızının seviyesi belirlenmiştir. Her bir deneme için 0,5 g vişne kabuğu alınarak gerçekleştirilen HDE ön denemelerinde, süre ve etanol konsantrasyonu için sabit değerler sırasıyla 75 s ve % 50 olarak alınmıştır.



Şekil 4.13: Vişne kabuklarına uygulanan HDE metodunda karıştırma hızının TFM üzerine etkisi.

Şekil 4.13 karıştırma hızına bağlı olarak elde edilen TFM verimini göstermektedir. Dakikada 6000 devir uygulandığında elde edilen verim ile 8000 rpm' de elde edilen verim hemen hemen

yakın olduğundan bu parametrenin alt seviyesi 6000 rpm olarak alınmıştır. 10000 rpm' e kadar da hızlı bir yükseliş gözlenmiştir. Daha yüksek devirlerde ısınmaya bağlı olarak bozunmalar gözlemlendiğinden üst limit olarak da 10000 rpm seçilmiştir.

4.1.4.2. Proses Parametrelerinin Etkisi

Tablo 4.16, Yüzey Merkezli Kompozit ile tasarlanan HDE ile vişne kabuğu ekstraksiyon çalışmasının deneysel planını göstermektedir. Design-Expert YMK tasarımına dayanarak, ilgili sistem için 5 merkez noktası (0,3 g yaş vişne kabuğu, 8000 rpm, 75 s ekstraksiyon süresi ve % 50 etanol çözeltisi) ile 30 deneysel çalışma üretmiştir.

Tablo 4.16: Vişne kabuklarına uygulanan HDE metodunun deneysel tasarımı.

Deney No	Katı Madde Miktarı (g)	Karıştırma Hızı (rpm)	Ekstraksiyon Süresi (s)	Çözücü Konsantrasyonu (% v/v)
1	0,1	10000	60	20
2	0,1	10000	90	80
3	0,3	8000	75	20
4	0,3	8000	90	50
5	0,1	8000	75	50
6	0,1	6000	90	80
7	0,5	6000	90	20
8	0,1	6000	60	20
9	0,3	8000	75	50
10	0,3	10000	75	50
11	0,3	8000	75	50
12	0,3	8000	75	50

Tablo 4. 16 (devam):

13	0,3	8000	75	50
14	0,1	10000	90	20
15	0,3	8000	75	80
16	0,5	8000	75	50
17	0,5	10000	60	80
18	0,5	6000	60	80
19	0,1	6000	60	80
20	0,1	10000	60	80
21	0,1	6000	90	20
22	0,3	8000	60	50
23	0,3	8000	75	50
24	0,5	6000	60	20
25	0,5	10000	60	20
26	0,3	8000	75	50
27	0,5	10000	90	80
28	0,3	6000	75	50
29	0,5	6000	90	80
30	0,5	10000	90	20

Tablo 4.17 ise verilen şartlardaki deneysel sonuçları göstermektedir. Ayrıca, ilgili yazılım ile çizilen 3 D' ler (Şekil 4.13-4.16), proses parametrelerinin etkisini görsel olarak sunmaktadır.

Tablo 4.17: Vişne kabuklarına uygulanan HDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.

Deney No	TFM (mg-GAE/ g-YM)	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)
1	21,93±0,001 ^{a**}	4,00±0,001 ^a
2	21,51±0,002 ^b	3,33±0,002 ^b
3	16,40±0,001 ^c	3,01±0,002 ^c
4	12,05±0,003 ^d	3,35±0,001 ^d
5	23,02±0,001 ^e	4,15±0,001 ^e
6	24,95±0,002 ^f	3,92±0,001 ^f
7	13,28±0,006 ^g	3,21±0,003 ^g
8	18,85±0,004 ^h	3,21±0,001 ^g
9	14,93±0,005 ⁱ	3,41±0,002 ^h
10	17,30±0,002 ^j	3,35±0,001 ^d
11	13,31±0,001 ^k	2,99±0,004 ⁱ
12	11,23±0,001 ^l	3,41±0,002 ^h
13	13,23±0,002 ^m	3,41±0,001 ^h
14	21,90±0,003 ⁿ	4,30±0,005 ^j
15	14,85±0,001 ^o	2,89±0,004 ^k
16	16,88±0,001 ^p	3,21±0,001 ^g
17	15,54±0,002 ^r	3,05±0,002 ^l
18	15,16±0,008 ^s	3,84±0,003 ^m
19	21,44±0,007 ^t	3,69±0,001 ⁿ
20	24,09±0,009 ^u	4,10±0,004 ^o

Tablo 4. 17 (devam):

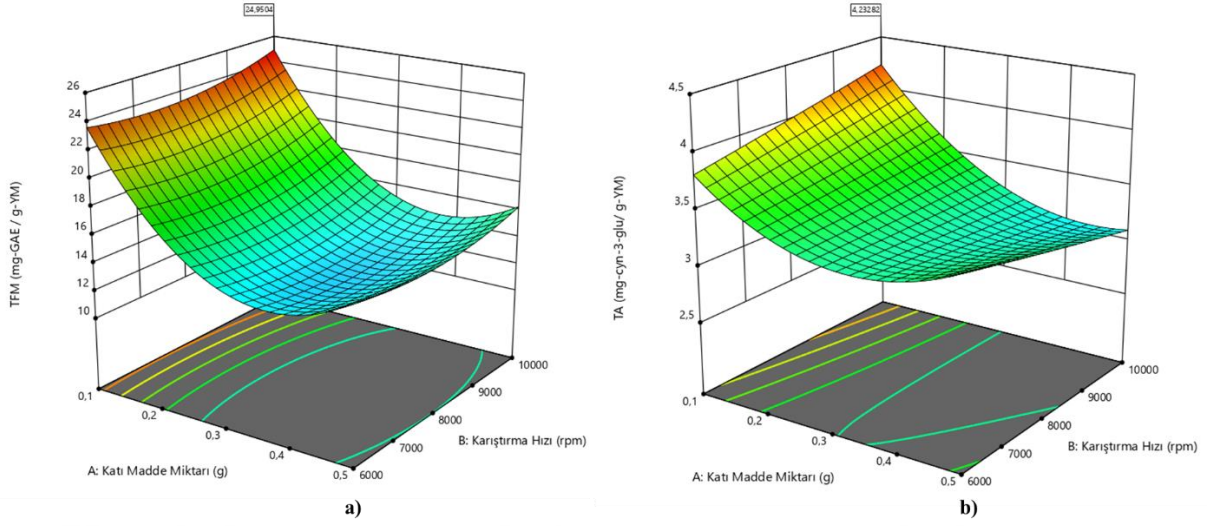
21	20,80±0,004 ^v	3,86±0,005 ^p
22	10,32±0,001 ^y	3,50±0,003 ^r
23	14,93±0,001 ⁱ	3,40±0,002 ^h
24	12,75±0,001 ^z	3,09±0,001 ^s
25	13,98±0,002 ^x	2,93±0,003 ^t
26	13,81±0,001 ^w	3,43±0,001 ^u
27	12,52±0,001 ^ş	2,43±0,002 ^v
28	14,00±0,002 ⁱ	3,26±0,003 ^y
29	12,05±0,006 ^d	3,65±0,006 ^z
30	10,88±0,002 ^ş	2,96±0,001 ^x

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

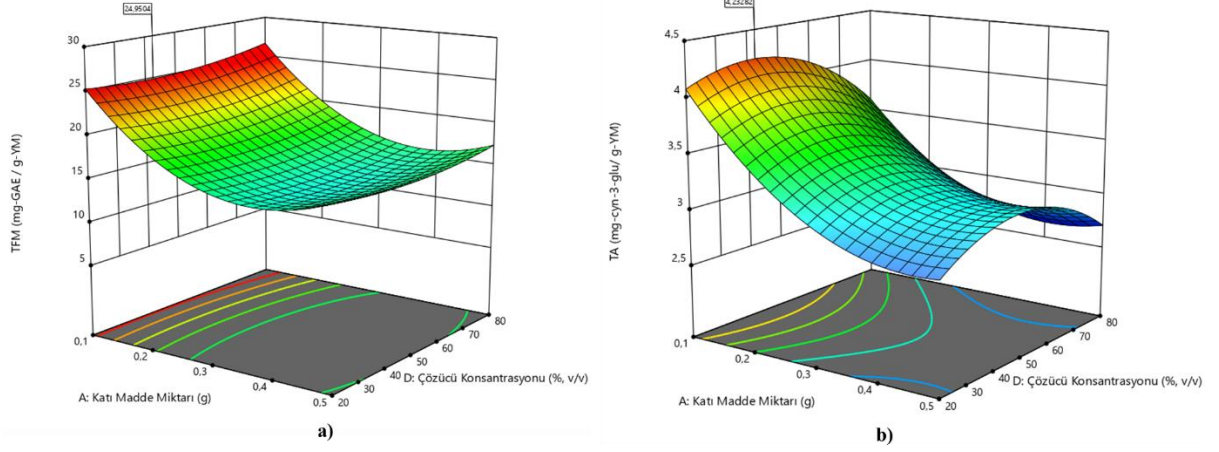
Toplam fenolik madde miktarı gram yaş malzeme başına 10,32 ile 24,95 mg-GAE arasında değişmektedir (Tablo 4.17). HDE ile elde edilen vişne kabuğu ekstraktlarının toplam antosiyanin içeriği ise 2,43 ile 4,30 mg-cyn-3-glu/ g-YM arasında değerler almıştır.

Şekil 4.14, sabit bazı değerlerde (ekstraksiyon süresi= 75 s, çözücü konsantrasyonu= % 40, v/v) katı madde miktarı ve karıştırma hızının toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Ham madde miktarının artması ekstrakt verimini önce azaltmış, belirli bir değerden sonra ise verim artmaya başlamıştır. Benzer bulgu, mandalina yapraklarından MDE ile fenolik antioksidanları ekstrakte ederken de gözlenmiştir (Şahin, 2015). Ballard ve diğ. de benzer bir trendi fıstık kabuklarından polifenollerini MDE ile ekstrakte ettiklerinde raporlamışlardır (Ballard ve diğ., 2010). Bu durum kütle iletim kanunlarına uyan bir durumdur. Zira solvent miktarının sabit kalması ve buna rağmen ekstrakte edilecek madde miktarının artması, ekstraksiyon verimini azaltıcı bir durumdur. Çünkü kütle iletimi konsantrasyon gradientinin tersi yönünde ilerler.



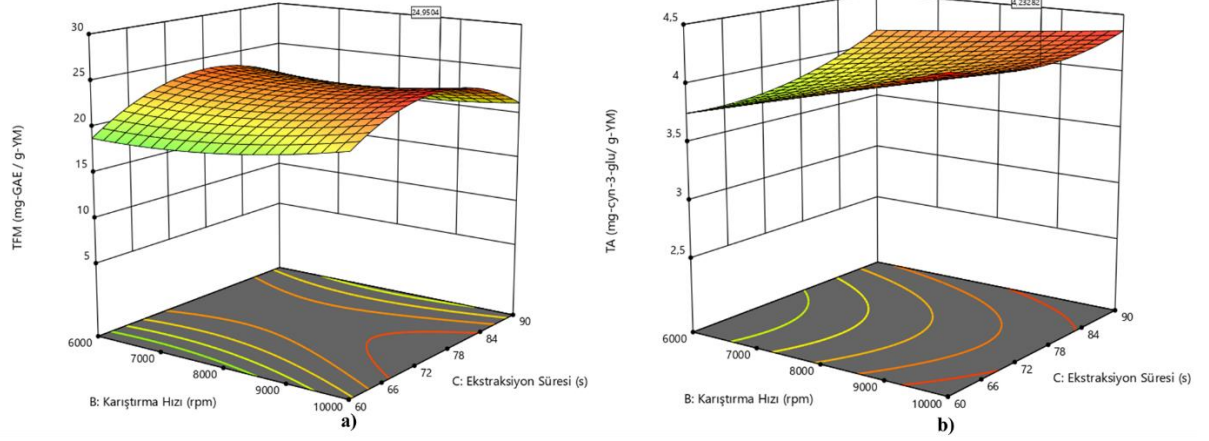
Şekil 4.14: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, karıştırma hızına (Ekstraksiyon süresi= 75 s, çözücü konsantrasyonu= % 40, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Şekil 4.15, sabit bazı değerlerde (ekstraksiyon süresi= 75 s, karıştırma hızı= 10000 rpm) katı madde miktarı ve çözücü konsantrasyonunun toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Ekstrakte edilen madde miktarının artmasıyla beraber verimdeki azalış bu görsellerde de gözlenmiştir. EtOH konsantrasyonunun tfm verimine etkisi çok belirgin olmamakla beraber, TA açısından baktığımızda etanol oranının artması başlangıçta verimi arttırmıştır. Belirli bir değerden (yaklaşık % 50) sonra ise etanol miktarının artması solventin TA' yı ekstrakte etme başarısı azalmaya başlamıştır. Benzer şekilde Yang ve arkadaşları da EtOH konsantrasyonu % 30' dan 70' e yükseldiğinde *Phyllanthus emblica* L. kabuğundan fenolik içerikte bir artış gözlemlemiş ve ardından EtOH çözeltisinin % 70' inden sonra bir azalma görmüşlerdir (Yang ve diğ., 2009). Onlar bu durumu, aşırı EtOH' den kaynaklanan denatürasyon problemi gerçekleşebileceği ve bu durumun fenolik ekstraksiyonunun aleyhine olabileceği şeklinde yorumlamışlardır.



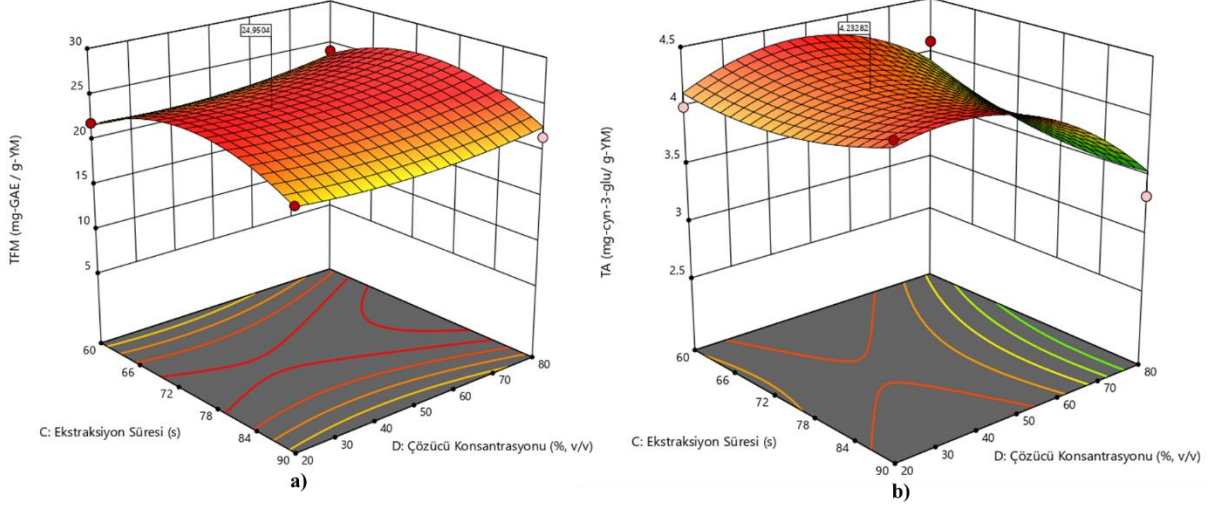
Şekil 4.15: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, çözücü konsantrasyonuna (Ekstraksiyon süresi= 75 s, karıştırma hızı= 10000 rpm) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Şekil 4.16, sabit bazı değerlerde (çözücü konsantrasyonu= %40, v/v, katı madde miktarı=0,1 g) karıştırma hızı ve sürenin toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Ekstrakte etme süresinin TA üzerine çok etkili olmadığı görülmektedir. TFM açısından baktığımızda belirgin bir etki söz konusudur. Beklenildiği gibi, çözücünün çözünen maddeyi özütleme süresinin uzatılması, verimin artmasına neden olmuştur. Zamanın TFM ekstraksiyonu üzerinde ikinci dereceden bir etkisi olmuştur. Ultrason işleminde etanol-su çözeltisi kullanılarak üzüm çekirdeklerinden toplam polifenol ekstraksiyonu sırasında da benzer zaman etkisi gözlenmiştir (Ghafoor ve diğ., 2009).



Şekil 4.16: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, karıştırma hızının, ekstraksiyon süresine (Çözücü konsantrasyonu= %40, v/v, katı madde miktarı=0,1 g) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Şekil 4.17, sabit bazı değerlerde (karıştırma hızı= 10000 rpm, katı madde miktarı=0,1 g) EtOH konsantrasyonu ve sürenin toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Her iki HDE proses parametresinin bu sistemler üzerindeki etkileri yukarıda detaylı olarak açıklanmıştı. Benzer cevap değerlerinin söz konusu bağımsız faktörlere gösterdikleri tepkiler Şekil 4.16' da da görülmektedir.



Şekil 4.17: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin, çözücü konsantrasyonuna (Karıştırma hızı= 10000 rpm, katı madde miktarı=0,1 g) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

4.1.4.3. Modelleme

HDE yöntemi ile vişne kabuklarından TFM ve TA açısından zengin ekstrakt elde ederken türetilen ANOVA tabloları Tablo 4.18 ve 4.19 ile verilmiştir. YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak HDE ile vişne kabuklarından TFM ve TA ekstraksiyonu için hesaplanmış olan ANOVA test sonuçlarını göstermektedir. Her iki cevap değeri için üretilmiş olan ikinci dereceden polinom denklemler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$).

Tablo 4.18: HDE yöntemi kullanılarak vişne yapraklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.

TFM	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	494,77	14	35,34	14,55	< 0,0001	önemli
A- Katı Madde Miktarı	316,22	1	316,22	130,15	< 0,0001	
B- Karıştırma Hızı	2,26	1	2,26	0,9291	0,3504	

Tablo 4. 17 (devam):

C- Süre	0,9343	1	0,9343	0,3846	0,5445	
D-Çözücü Konsantrasyonu	7,12	1	7,12	2,93	0,1075	
AB	0,8575	1	0,8575	0,3529	0,5613	
AC	8,32	1	8,32	3,43	0,0840	
AD	1,07	1	1,07	0,4386	0,5178	
BC	8,43	1	8,43	3,47	0,0822	
BD	0,5412	1	0,5412	0,2228	0,6437	
CD	1,29	1	1,29	0,5303	0,4777	
A²	70,87	1	70,87	29,17	< 0.0001	
B²	2,23	1	2,23	0,9194	0,3528	
C²	32,34	1	32,34	13,31	0,0024	
D²	2,11	1	2,11	0,8678	0,3663	
Kalıntı	36,44	15	2,43			
Uyum Eksikliği	27,03	10	2,70	1,43	0,3620	önemsiz
Saf Hata	9,42	5	1,88			

Tablo 4.19: HDE yöntemi kullanılarak vişne yapraklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.

TA	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	4,98	14	0,3558	14,42	< 0,0001	önemli
A- Katı Madde Miktarı	2,13	1	2,13	86,43	< 0,0001	
B- Karıştırma Hızı	0,0916	1	0,0916	3,71	0,0732	
C- Süre	0,0080	1	0,0080	0,3258	0,5766	
D-Çözücü Konsantrasyonu	0,0064	1	0,0064	0,2597	0,6178	
AB	0,7515	1	0,7515	30,45	<0,0001	
AC	0,0728	1	0,0728	2,95	0,1064	
AD	0,0770	1	0,0770	3,12	0,0977	
BC	0,2169	1	0,2169	8,79	0,0096	
BD	0,5680	1	0,5680	23,02	0,0002	
CD	0,3783	1	0,3783	15,33	0,0014	
A²	0,3659	1	0,3659	14,83	0,0016	
B²	0,0001	1	0,0001	0,0003	0,9856	
C²	0,0400	1	0,0400	1,62	0,2224	
D²	0,3232	1	0,3232	13,10	0,0025	
Kalıntı	0,3702	15	0,0247			
Uyum Eksikliği	0,2232	10	0,0223	0,7592	0,6685	önemsiz
Saf Hata	0,1470	5	0,0294			

Eşitlik (4.5) ve (4.6), sırasıyla TFM ve TA için kodlanmış faktörler açısından Design-Expert tarafından türetilmiş olan son denklemleri vermektedir:

$$\text{TFM} \quad 14,15 - 4,19 A - 0,3541 B - 0,2278 C + 0,6290 D - 0,2315 AB - 0,7213 AC - 0,2581 AD - 0,7259 BC - 0,1859 BD - 0,2838 CD + 5,23 A^2 + 0,9285 B^2 - 3,53 C^2 + 0,9021 D^2 \quad (4.5)$$

$$\text{TA} \quad 3,32 - 0,3442 A - 0,0713 B - 0,0211 C + 0,0189 D - 0,2167 AB - 0,0675 AC + 0,0694 AD - 0,1164 BC - 0,1884 BD - 0,1538 CD + 0,3578 A^2 + 0,0018 B^2 + 0,1242 C^2 - 0,3532 D^2 \quad (4.6)$$

Vişne kabuklarının HDE ile ekstraksiyon prosesinde seçilmiş olan bağımsız parametreler içerisinde en önemli ve tek önemli parametre ekstrakte edilecek madde miktarıdır ($p < 0,0001$).

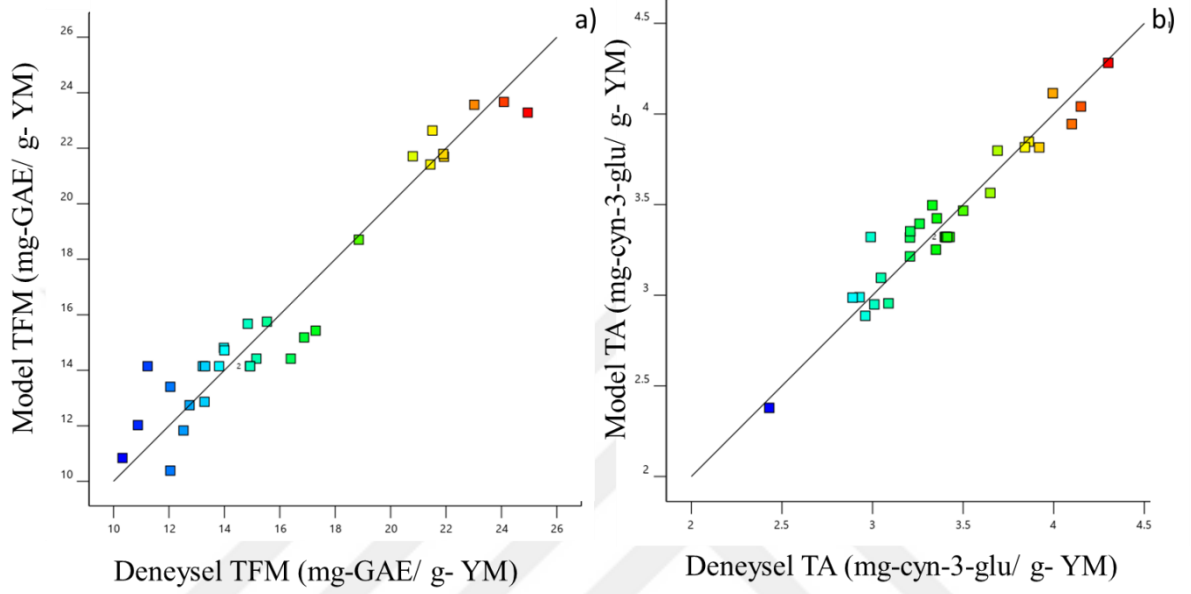
TFM cevap değeri açısından bakıldığında parametreler arasındaki etkileşiminde istatistiksel açıdan ($p > 0,05$) önemli olmadığı görülmektedir (Tablo 4.19). Tablo 4.19 incelendiğinde, A ve B, B ve C, ve C ve D parametreleri arasındaki etkileşimin TA cevap değeri için istatistiksel olarak önemli oldukları söylenebilir ($p < 0,05$). Ayrıca, uyum eksikliği değeri her iki cevap değeri için p , 0,05'ten büyük hesaplanmıştır. Bu durum modelin verilen data'lara uyumsuzluğunun bir ölçüsü olduğunu göstermektedir ki istatistiksel açıdan önemsiz olarak hesaplanması, bu sistem için türetilmiş olan modellerin veriler için uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.20 ise her iki cevap değeri için SD, R^2 , R^2_a , R^2_t ve CV değerlerini göstermektedir. Yüksek belirleme katsayılarına ($> 0,93$) bağlı olarak, cevap değerlerindeki toplam varyasyonun sadece ~% 9' unun türetilen denklemler ile açıklanamayacağı sonucuna varabiliriz. CV değeri de oldukça tatmin edici olarak hesaplanmıştır ($< \% 10$).

Tablo 4.20: HDE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.

Cevap Değişkeni	SD	R^2	R^2_a	R^2_t	CV
TFM(mg-GAE/ g-YM)	1,56	0,9314	0,8674	0,7033	9,58
TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,1571	0,9308	0,8663	0,6826	4,61

ANOVA bulgularına dayanarak, her iki sistem (TFM ve TA) için de deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında tatmin edici bir ilişki olduğu söylenebilir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Vişne kabuklarına uygulanan HDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.

4.1.4.4. Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları

Tablo 4.21, YMK tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek TFM (24,95 mg-GAE/ g-YM) ve TA (4,23 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi HDE proses şartlarını vermektedir. Koşulların doğrulanması da test edilmiştir. Deneysel ve hesaplanan sonuçlar arasındaki kalıntının kabul edilebilir olması da modelin söz konusu sistemler için uygun olduğunu desteklemektedir.

Tablo 4.21: Vişne kabuklarının HDE için optimum koşullar ve validasyon.

Optimum Ekstraksiyon Koşulları				Parametre	Öngörülen Sonuç	Deneysel Sonuç	Hata Oranı (%)
A (g)	B (rpm)	C (s)	D (% v/v)	TFM	24,95	23,65±0,003	5,49
0,1	10000	75	40,00	TA	4,23	4,29±0,002	1,39

4.1.5. Otomatik Çözücü Ekstraksiyonu

4.1.5.1.Ön Denemeler

Tablo 4.22: Vişne kabuklarına uygulanan OÇE ön denemeleri*.

Daldırma Süresi		Yıkama Süresi	
Dakika	TFM (mg-GAE/ g-YM)	Dakika	TFM (mg-GAE/ g-YM)
10	70,26±0,001	20	65,18±0,001
20	104,98±0,003	30	76,24±0,006
30	76,73±0,004	40	90,27±0,001
40	65,32±0,001	50	108,98±0,002
50	63,41±0,002	60	45,13±0,003
60	62,86±0,001	70	36,27±0,001

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

4.1.5.2. Proses Parametrelerinin Etkisi

Tablo 4.24, Yüzey Merkezli Kompozit ile tasarlanan mevcut çalışmanın deneysel planını göstermektedir. Tablo 4.24' te görüldüğü gibi, Design-Expert ilgili OÇE sistemi için 5 merkez noktası (20 dk daldırma süresi, 50 dk yıkama süresi, 0,3 gram örnek ve % 50 etanol çözeltisi) ile 30 deneysel çalışma üretmiştir. Tablo 4.25 ise verilen şartlardaki deneysel sonuçları göstermektedir. Ayrıca, ilgili yazılım ile çizilen üç boyutlu grafikler (Şekil 4.19-4.22), proses parametrelerinin etkisini görsel olarak sunmaktadır.

Tablo 4.23: Vişne kabuklarına uygulanan OÇE metodunun deneysel tasarımı.

Deney No	Daldırma Süresi (dk)	Yıkama Süresi (dk)	Katı Madde Miktarı (g)	Çözücü Konsantrasyonu (%, v/v)
1	20	50	0,3	20
2	20	50	0,3	50
3	10	60	0,5	20
4	20	40	0,3	50
5	20	50	0,3	50
6	20	50	0,3	50
7	30	60	0,5	20
8	10	40	0,1	80
9	30	40	0,1	20
10	10	40	0,5	20
11	20	50	0,3	50
12	10	60	0,1	20
13	30	40	0,1	80
14	10	60	0,5	80
15	20	50	0,3	50
16	10	50	0,3	50
17	20	50	0,1	50
18	20	50	0,5	50
19	30	50	0,3	50
20	30	40	0,5	20
21	30	60	0,5	80
22	20	50	0,3	80
23	10	60	0,1	80
24	10	40	0,1	20
25	30	60	0,1	80

Tablo 4. 23 (devam):

26	20	50	0,3	50
27	20	60	0,3	50
28	30	40	0,5	80
29	10	40	0,5	80
30	30	60	0,1	20

Toplam fenolik madde miktarı gram yaş malzeme başına 28,29 ile 120,15 mg-GAE arasında değişmektedir (Tablo 4.25). OÇE ile elde edilen vişne kabuğu ekstraktlarının TA içeriği ise 1,12 ile 25,65 mg-cyn-3-glu/ g-YM arasında değerler almıştır.

Tablo 4.24: Vişne kabuklarına uygulanan OÇE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.

Deney No	TFM (mg-GAE/ g-YM)	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)
1	75,68±0,003 ^{a**}	19,9±0,003 ^a
2	100,23±0,002 ^b	16,31±0,001 ^b
3	36,04±0,001 ^c	4,61±0,002 ^c
4	85,63±0,002 ^d	6,45±0,001 ^d
5	94,89±0,002 ^e	16,3±0,001 ^b
6	100,65±0,003 ^f	16,46±0,001 ^e
7	68,45±0,001 ^g	7,89±0,001 ^f
8	70,71±0,001 ^h	7,18±0,002 ^g
9	62,31±0,001 ⁱ	2,53±0,002 ^h
10	28,29±0,000 ⁱ	3,26±0,001 ⁱ

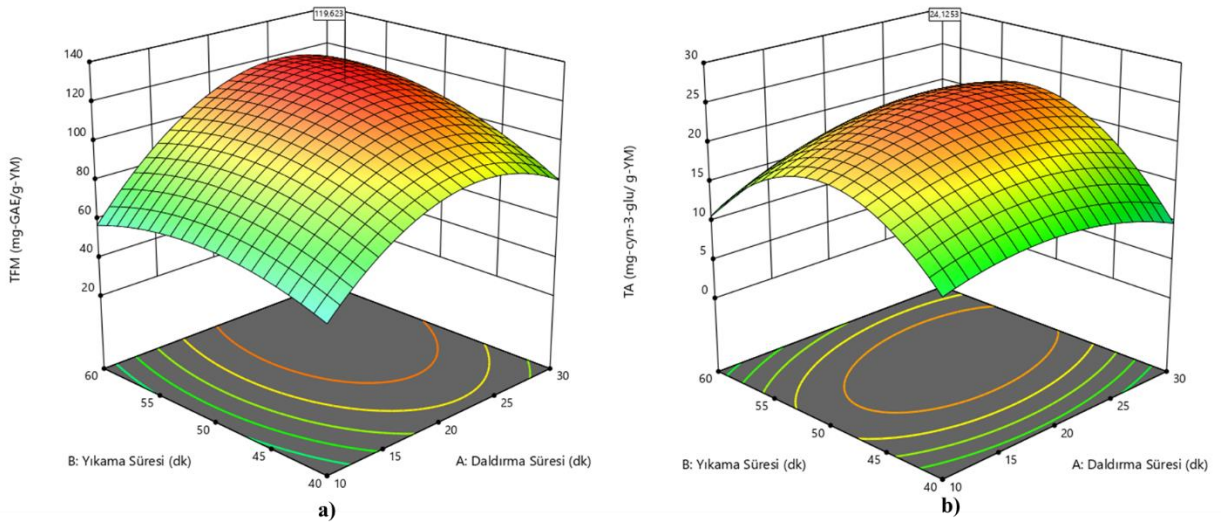
Tablo 4. 24 (devam):

11	100,78±0,002 ^j	16,41±0,002 ^e
12	69,13±0,001 ^k	1,12±0,001 ⁱ
13	61,97±0,001 ^l	3,35±0,002 ^j
14	54,78±0,002 ^m	9,14±0,000 ^k
15	101,02±0,003 ⁿ	15,5±0,001 ^l
16	70,26±0,001 ^o	12,67±0,001 ^m
17	110,57±0,001 ^p	8,45±0,002 ⁿ
18	90,36±0,001 ^r	13,5±0,002 ^o
19	76,73±0,002 ^s	13,27±0,001 ^p
20	40,16±0,002 ^s	1,56±0,001 ^r
21	120,15±0,002 ^t	17,32±0,001 ^s
22	112,23±0,002 ^u	25,65±0,001 ^t
23	55,88±0,001 ^v	2,46±0,002 ^u
24	60,96±0,001 ^y	4,43±0,004 ^v
25	99,14±0,002 ^z	8,48±0,002 ^y
26	103,45±0,003 ^w	14,96±0,006 ^z
27	90,12±0,002 ^x	7,56±0,000 ^w
28	82,23±0,000 ^c	8,96±0,001 ^x
29	50,75±0,001 ^q	10,78±0,002 ^q
30	80,23±0,001 ^ö	7,49±0,003 ^c

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

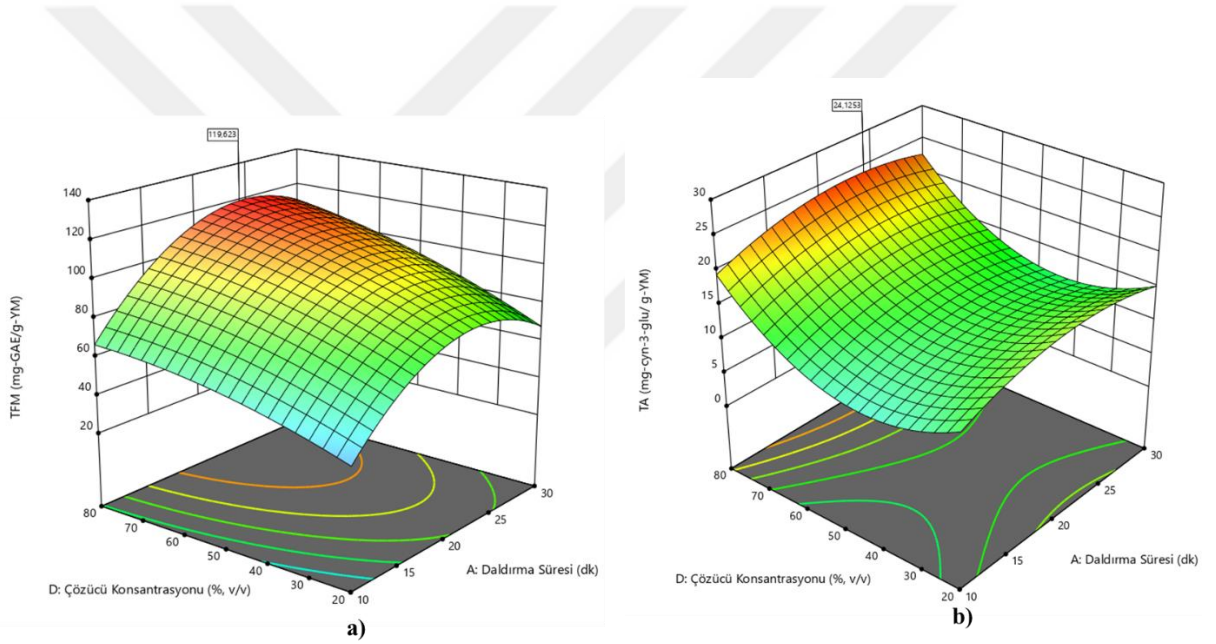
Şekil 4.19, sabit bazı değerlerde (katı madde miktarı= 0,47 g, çözücü konsantrasyonu= %80, v/v) daldırma ve yıkama sürelerinin toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Otomatik solvent ekstraksiyonu, daldırma, uzaklaştırma, yıkama, geri kazanım ve soğutma gibi 5 adımdan oluşur. Daldırma, bu yöntemin ilk adımıdır. Daldırma adımı, numune, etkili bir ekstraksiyon işlemi için kaynayan çözücüye daldırılır. Bu süre OÇE sistemini etkileyen önemli bir proses parametresidir. Yıkama ve daldırma sürelerinin her ikisinin iki cevap değeri için de kuadratik bir etkide bulunduğu görülmektedir. Her iki parametre de belirli bir değere kadar verimleri arttırmış, belirli bir değerden sonra ise süreç ekstaksiyon aleyhine dönmüştür. Bu durum uzun ekstaksiyon sürelerinin ısıya fazla maruz kalma sonucu ısıya duyarlı biyoaktif bileşenler olan antosiyanin ve polifenollerin degradasyona uğraması ve verimin düşmesidir. Yeşil çay yapraklarından fenoliklerin ve kafeinin ekstraksiyonunda (Pan ve diğ., 2003) ve kiraz meyvesinden antioksidanların ekstraksiyonunda (Karabegović ve diğ., 2014) da benzer zaman etkisi gözlenmiştir.



Şekil 4.19: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, yıkama süresinin, daldırma süresine (Katı madde miktarı= 0,47 g, çözücü konsantrasyon = %80, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

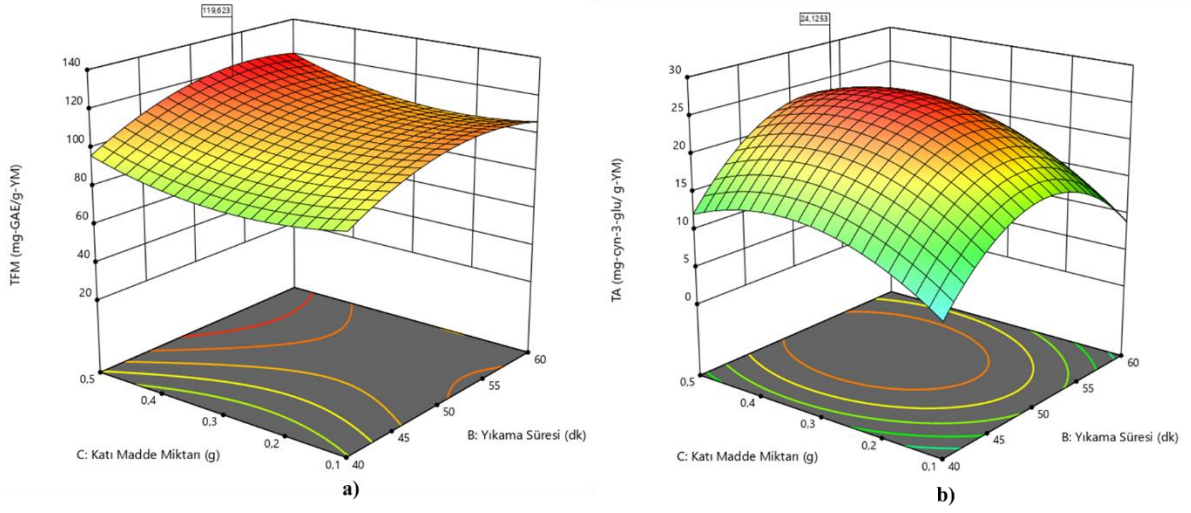
Şekil 4.20, sabit bazı değerlerde (katı madde miktarı=0,47 g, yıkama süresi =52,27 dk) daldırma süresi ve çözücü konsantrasyonunun toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b)

üzerine etkilerini göstermektedir. EtOH konsantrasyonunun TFM üzerinde düzenli olarak artan bir etki gösterdiği gözlenmiştir. TA açısından bakıldığında, solvent içerisindeki alkol oranının artması ile önce keskin bir düşüş, ardından hızlı bir yükselişe geçilmiştir. Yani, suda yaşayan ancak alkolde olmayan mikroorganizmalardan kaynaklanan bozunma nedeniyle suyun fazla oranda solvent sistemi içerisindeki varlığı elverişli görünmemektedir (Lapornik ve diğ. 2005). Başka bir açıklamaya göre bu konu, polifenollerin suda aktif olan ve alkolde etkili olmayan enzimler tarafından oksidasyonu ile açıklanmıştır (Zhang ve diğ. 2001). Bu eğilim, şeker pancarı melasından hem TFM hem de TA ekstrakte ederken etanol konsantrasyonunun aynı etkisinin gözlemlendiği başka bir çalışma ile de uyumludur (M. Chen ve diğ. 2015).



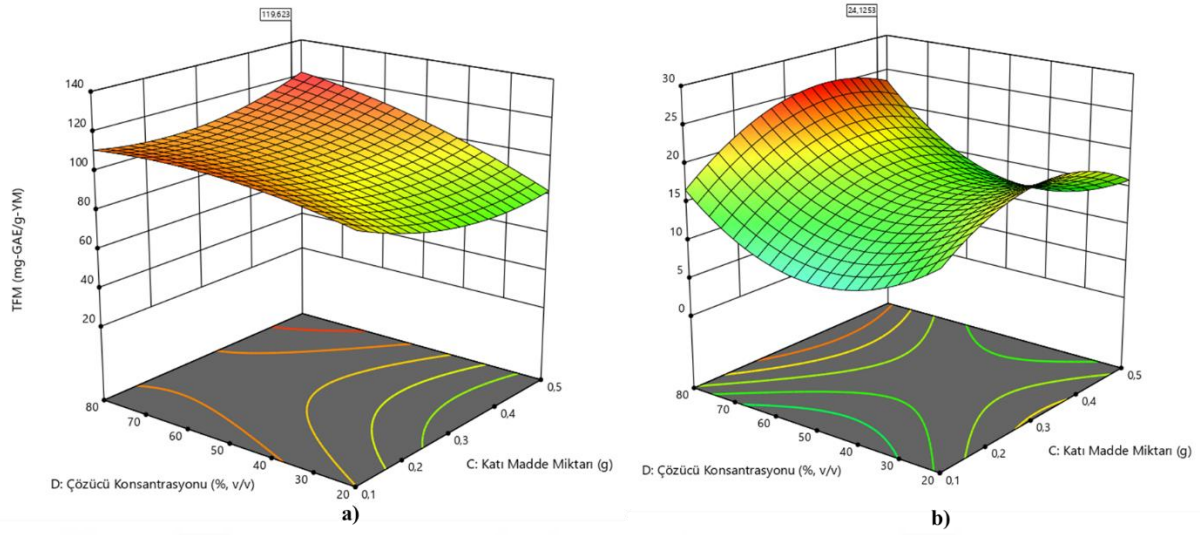
Şekil 4.20: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, çözücü konsantrasyonunun, daldırma süresine (Katı madde miktarı=0,47 g, yıkama süresi =52,27 dk) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Şekil 4.21, sabit bazı değerlerde (daldırma süresi=23,83 dk, çözücü konsantrasyonu=%80, v/v) yıkama süresi ve katı madde miktarının toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Katı madde miktarının vişne kabuklarından OÇE ile TFM ve TA açısından zengin bir ekstrakt elde edilmesinde diğer üç yöntemde (MDE, UDE ve HDE) olduğu gibi bir etki gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.21: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, yıkama süresine (Daldırma süresi=23,83 dk, çözücü konsantrasyonu=%80, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Şekil 4.22, sabit bazı değerlerde (daldırma süresi=23,83 dk, yıkama süresi=52, 27 dk) EtOH konsantrasyonu ve katı madde miktarının toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir.



Şekil 4.22: Vişne kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, çözücü konsantrasyonunun, katı madde miktarına (daldırma süresi=23,83 dk, yıkama süresi=52, 27 dk) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

4.1.5.3. Modelleme

OÇE yöntemi ile vişne kabuklarından TFM ve TA açısından zengin ekstrakt elde ederken türetilen ANOVA tabloları Tablo 4.26 ve 4.27 ile verilmiştir. YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak OÇE ile vişne kabuklarından TFM ve TA ekstraksiyonu için hesaplanmış olan ANOVA test sonuçlarını göstermektedir. Her iki cevap değeri için üretilmiş olan ikinci dereceden polinom denklemler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$).

Tablo 4.25: OÇE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.

TFM	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	15792,75	14	1128,05	21,99	< 0.0001	önemli
A- Daldırma Süresi	2103,19	1	2103,19	41,00	< 0.0001	
B- Yıkama Süresi	952,08	1	952,08	18,56	0,0006	

Tablo 4. 25 (devam):

C- Katı Madde Miktarı	398,47	1	398,47	7,77	0,0138	
D-Çözücü Konsantrasyonu	1934,21	1	1934,21	37,71	< 0.0001	
AB	843,61	1	843,61	16,45	0,0010	
AC	554,13	1	554,13	10,80	0,0050	
AD	348,20	1	348,20	6,79	0,0199	
BC	54,61	1	54,61	1,06	0,3185	
BD	0,2916	1	0,2916	0,0057	0,9409	
CD	898,50	1	898,50	17,52	0,0008	
A²	1718,86	1	1718,86	33,51	< 0.0001	
B²	335,35	1	335,35	6,54	0,0219	
C²	196,70	1	196,70	3,83	0,0691	
D²	72,69	1	72,69	1,42	0,2524	
Kalıntı	769,48	15	51,30			
Uyum Eksikliği	651,74	10	65,17	2,77	0,1363	önemsiz
Saf Hata	117,73	5	23,55			

Tablo 4.26: OÇE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.

TA	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	1087,65	14	77,69	93,53	< 0,0001	önemli
A- Daldırma Süresi	12,84	1	12,84	15,45	0,0013	
B- Yıkama Süresi	17,15	1	17,15	20,65	0,0004	
C- Katı Madde Miktarı	55,23	1	55,23	66,49	< 0,0001	
D-Çözücü Konsantrasyonu	91,26	1	91,26	109,86	< 0,0001	
AB	68,48	1	68,48	82,44	< 0,0001	
AC	0,1024	1	0,1024	0,1233	0,7304	
AD	0,3906	1	0,3906	0,4703	0,5033	
BC	9,52	1	9,52	11,46	0,0041	
BD	0,3025	1	0,3025	0,3642	0,5552	
CD	33,01	1	33,01	39,73	< 0,0001	
A²	21,36	1	21,36	25,71	0,0001	
B²	202,30	1	202,30	243,54	< 0,0001	
C²	61,35	1	61,35	73,86	< 0,0001	
D²	124,56	1	124,56	149,96	< 0,0001	
Kalıntı	12,46	15	0,8307			
Uyum Eksikliği	10,56	10	1,06	2,78	0,1349	önemsiz
Saf Hata	1,90	5	0,3794			

Eşitlik (4.7) ve (4.8), sırasıyla TFM ve TA için kodlanmış faktörler açısından Design-Expert tarafından türetilmiş olan son denklemleri vermektedir:

$$\text{TFM} \quad 98,84 + 10,81 A + 7,27 B - 4,71 C + 10,37 D + 7,26 AB + 5,89 AC + 4,67 AD + 1,85 BC + 0,1350 BD + 7,49 CD - 25,76 A^2 - 11,38 B^2 + 8,71 C^2 - 5,30 D^2 \quad (4.7)$$

$$\text{TA} \quad 15,92 + 0,8444 A + 0,9761 B + 1,75 C + 2,25 D + 2,07 AB + 0,0800 AC + 0,1563 AD + 0,7713 BC - 0,1375 BD + 1,44 CD - 2,87 A^2 - 8,84 B^2 - 4,87 C^2 + 6,93 D^2 \quad (4.8)$$

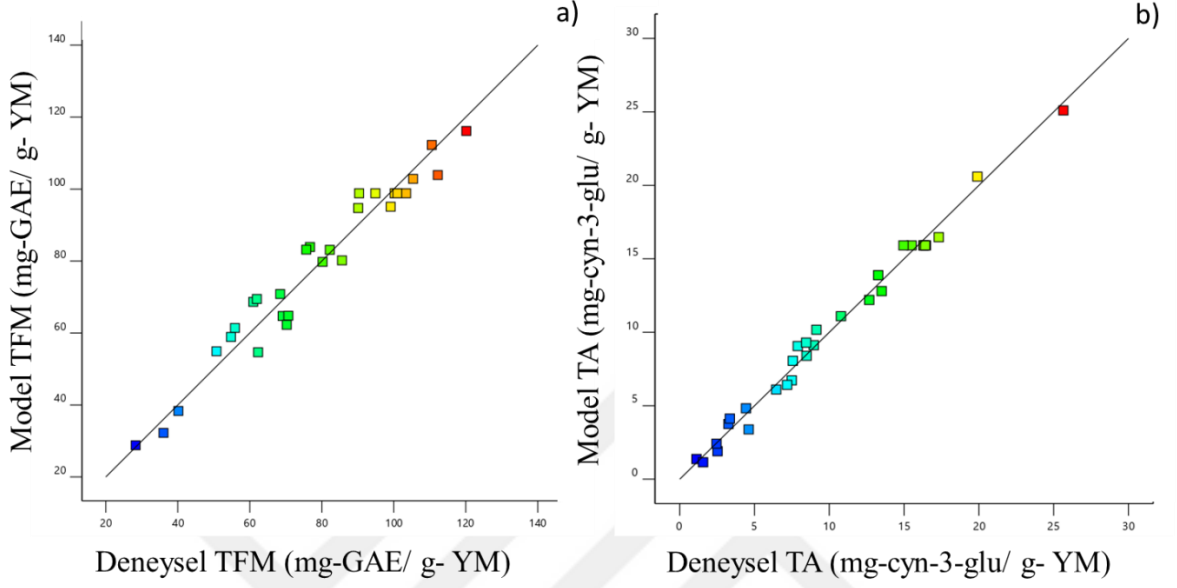
Vişne kabuklarının OÇE ile ekstraksiyon prosesinde seçilmiş olan bağımsız parametrelerin tümü her iki bağımlı değişken için de istatistiksel açıdan etkili bulunmuştur ($p < 0,05$). TFM cevap değeri açısından bakıldığında A ve B, A ve C, A ve D, ve C ve D parametreleri arasındaki etkileşimin ve EtOH konsantrasyonunun ikinci dereceden kuvveti hariç tüm ikinci dereceden kuvvetlerin istatistiksel açıdan ($p < 0,05$) önemli olduğu görülmektedir (Tablo 4.26). Tablo 4.27 incelendiğinde, A ve B, B ve C, ve C ve D parametreleri arasındaki etkileşimin ve tüm parametrelerin ikinci dereceden kuvvetlerinin TA cevap değeri için istatistiksel olarak önemli oldukları söylenebilir ($p < 0,05$). Ayrıca, uyum eksikliği değeri her iki cevap değeri için p , 0,05'ten büyük hesaplanmıştır. Bu durum modelin verilen data'lara uyumsuzluğunun bir ölçüsü olduğunu göstermektedir ki istatistiksel açıdan önemsiz olarak hesaplanması, bu sistem için türetilmiş olan modellerin veriler için uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.28 ise her iki cevap değeri için SD, R^2 , R^2_a , R^2_t ve CV değerlerini göstermektedir. Yüksek belirleme katsayılarına ($> 0,95$) bağlı olarak, cevap değerlerindeki toplam varyasyonun sadece ~% 5' inin türetilen denklemler ile açıklanamayacağı sonucuna varabiliriz. CV değeri de oldukça tatmin edici olarak hesaplanmıştır ($< \% 10$).

Tablo 4.27: OÇE yöntemi kullanılarak vişne kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.

Cevap Değişkeni	SD	R^2	R^2_a	R^2_t	CV
TFM(mg-GAE/ g-YM)	7,16	0,9535	0,9102	0,7413	9,11
TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,9114	0,9887	0,9781	0,9287	9,00

ANOVA bulgularına dayanarak, her iki sistem (TFM ve TA) için de deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında tatmin edici bir ilişki olduğu söylenebilir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Vişne kabuklarına uygulanan OÇE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.

4.1.5.4. Optimizasyon ve Validasyon Çalışmaları

Tablo 4.29, YMK tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek TFM (119,64 mg-GAE/ g-YM) ve TA (24,31 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi OÇE proses şartlarını vermektedir. Koşulların doğrulanması da test edilmiştir. Deneysel ve hesaplanan sonuçlar arasındaki kalıntının kabul edilebilir olması da modelin söz konusu sistemler için uygun olduğunu desteklemektedir.

Tablo 4.28: Vişne kabuklarının OÇE için optimum koşullar ve validasyonu.

Optimum Ekstraksiyon Koşulları				Parametre	Öngörülen Sonuç	Deneyisel Sonuç	Hata Oranı (%)
A (dk)	B (dk)	C (g)	D (%, v/v)	TFM(mg-GAE/ g-YM)	119,64	115,26±0,002	3,80
23,80	52,26	0,47	80,00	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	24,31	25,12±0,001	3,22

4.1.6. Karşılaştırmalı Sonuçlar

Dört farklı ileri ayırma yöntemi (MDE, UDE, HDE ve OÇE) kullanılarak vişne kabukları ekstrakte edilmiştir. Her bir sistemin deneysel tasarımı ve optimizasyon çalışması YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktların içeriğindeki TFM ve TA değerlerinin maksimum olması hedeflenerek optimum koşullar belirlenmiştir. Tablo 4.29, söz konusu optimum koşullarda elde edilen maksimum cevap değerlerini karşılaştırmalı olarak sunmaktadır.

Gerek toplam fenolik gerek toplam antosiyanin gerekse de ekstraktın içeriğindeki en temel bireysel polifenol olan siyanidin-3-glukozit içeriği açısından en yüksek verim, otomatik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Bu performansı MDE yöntemi izlemiştir. Her ne kadar ultrason yönteminde TFM açısından çok daha yüksek verim (49,90 mg-GAE/g-YM'ye karşı 42,65 mg-GAE/g-YM) elde edilmiş olsa da, mikrodalga desteğinin kullanıldığı örneklerdeki siyanidin-3-glukozit miktarı ~ 6 kat fazla gözlenmiştir. Benzer şekilde TA açısından da karşılaştırma yapılacak olursa MDE ile elde edilen ekstraktın TA miktarı UDE ile elde edilenin neredeyse 2 katıdır. HDE yöntemi, vişne kabuklarının ekstraksiyonunda en düşük performansa sahip bir yöntem olarak gözlenmiştir. En başarılı yöntem ile kıyasladığımızda yaklaşık 19 katlık bir fark olduğunu görebiliriz (bireysel fenolik bileşen açısından).

Sonuç olarak, yeşil bir teknoloji olarak çok yakın bir zamanda geliştirilmiş alternatif bir yöntem olan OÇE, önceki geliştirilen yöntemlere göre neredeyse iki kat (MDE), 11 kat (UDE) ve 19 kat (HDE) daha başarılı performans göstermiştir.

Karşılaştırmayı yaparken her bir yöntemin avantaj ve dezavantajlarını da dikkate almak gereklidir. Zira en yüksek verimi hedeflerken, uygulanan tekniklerin yatırım maliyeti, işletme parametreleri ve işletme giderleri de göz önüne alınmalıdır. En düşük performansı sergileyen HDE yönteminde, gerek işletme gerekse de yatırım maliyeti dikkate alındığında son derece ideal ve basit bir sistem olduğunu söyleyebiliriz. Ön denemeler ve optimizasyon çalışmaları neticesinde belirlenen ekstraksiyon süresi 75 saniyedir ve oda sıcaklığında çalışılmaktadır. Diğer taraftan, MDE'de verim hem makuldü hem de yine enerji tasarrufu açısından değerlendirildiğinde 90 saniye gibi bir sürede ekstraksiyon tamamlanmıştır.

Tablo 4.29: MDE, UDE, HDE ve OÇE yöntemleriyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının TFM, TA ve siyanidin-3-glukozit değerlerinin karşılaştırılması*.

Ekstraksiyon Methodu	Optimum Çalışma Koşulları		Optimum Değer					
			TFM (mg-GAE/g-YM)			TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		
			Öngörülen Sonuç	Deneyisel Sonuç	Hata Oranı (%)	Öngörülen Sonuç	Deneyisel Sonuç	Hata Oranı (%)
MDE	A	500	44,15	42,65 ^a	3,52	12,47	12,30 ^a	1,38
	B	90						
	C	80						
UDE	A	34,34	47,59	49,90 ^b	4,62	6,63	6,57 ^b	0,91
	B	0,1						
	C	80						
HDE	A	0,1	24,95	23,65 ^c	5,49	4,23	4,29 ^c	1,39
	B	10000						
	C	75						
	D	40						
OÇE	A	23,80	119,64	115,26 ^d	3,80	24,31	25,12 ^d	3,22
	B	52,26						
	C	0,47						
	D	80						

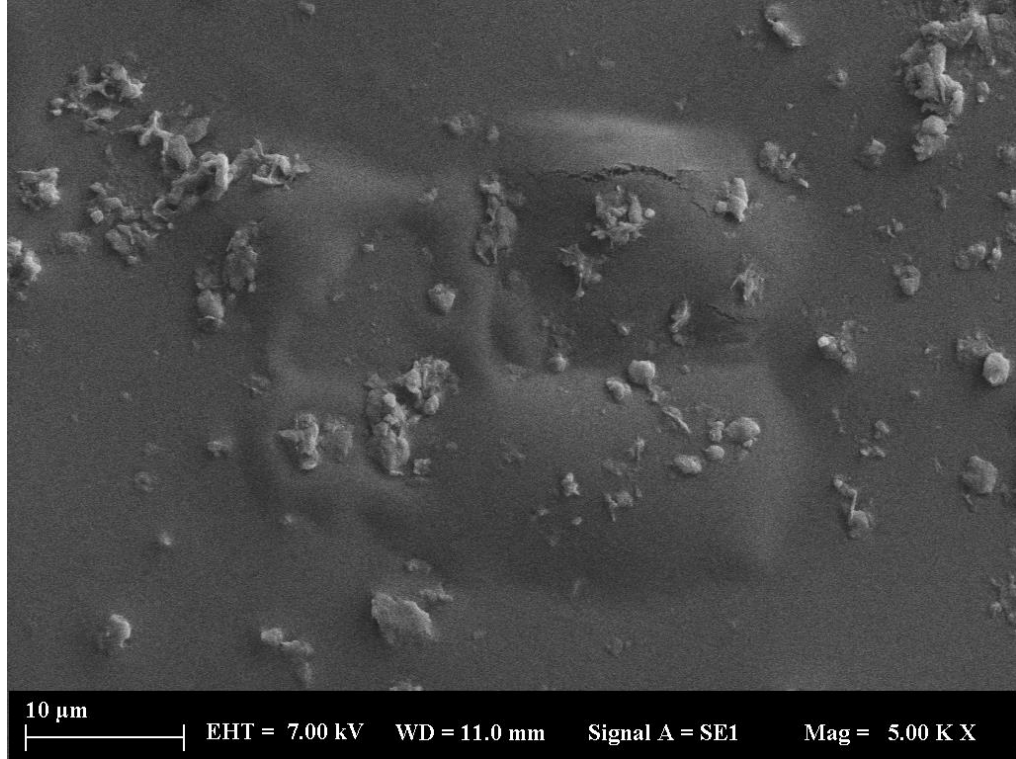
* Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

Şimşek ve diğ. MDE kullanarak (700 W, %50 etanol, 12 dk) vişne kabuğunu ekstrakte ettikleri bir çalışmada gram kuru malzeme başına 14,14 mg-GAE TFM verimi elde edilmişken, konvansiyonel yöntemle aynı ham malzeme kullanılarak 13,78 mg-GAE/g-kuru malzeme şeklinde bir verim elde edilmiştir (Simsek ve diğ., 2012). Başka bir çalışmada da farklı kabuklar kurutulup çalkalama (200 rpm) ile konvansiyonel ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (Yılmaz ve diğ., 2019). Bu çalışmada raporlanan TFM, TA ve siyanidin-3-glukozit seviyeleri sırasıyla gram kuru malzeme başına 14,24 mg-GAE, 0,41 mg-cyn-3-glu ve 1,19 mg'dır. Unutmamak gerekir ki ilgili çalışmalarda verilen sonuçlar kuru malzeme bazındadır. Bu tez çalışmasında ise hesaplamalar yaş malzemeler üzerinden verilmiştir. Sonuç olarak tez kapsamından elde edilen

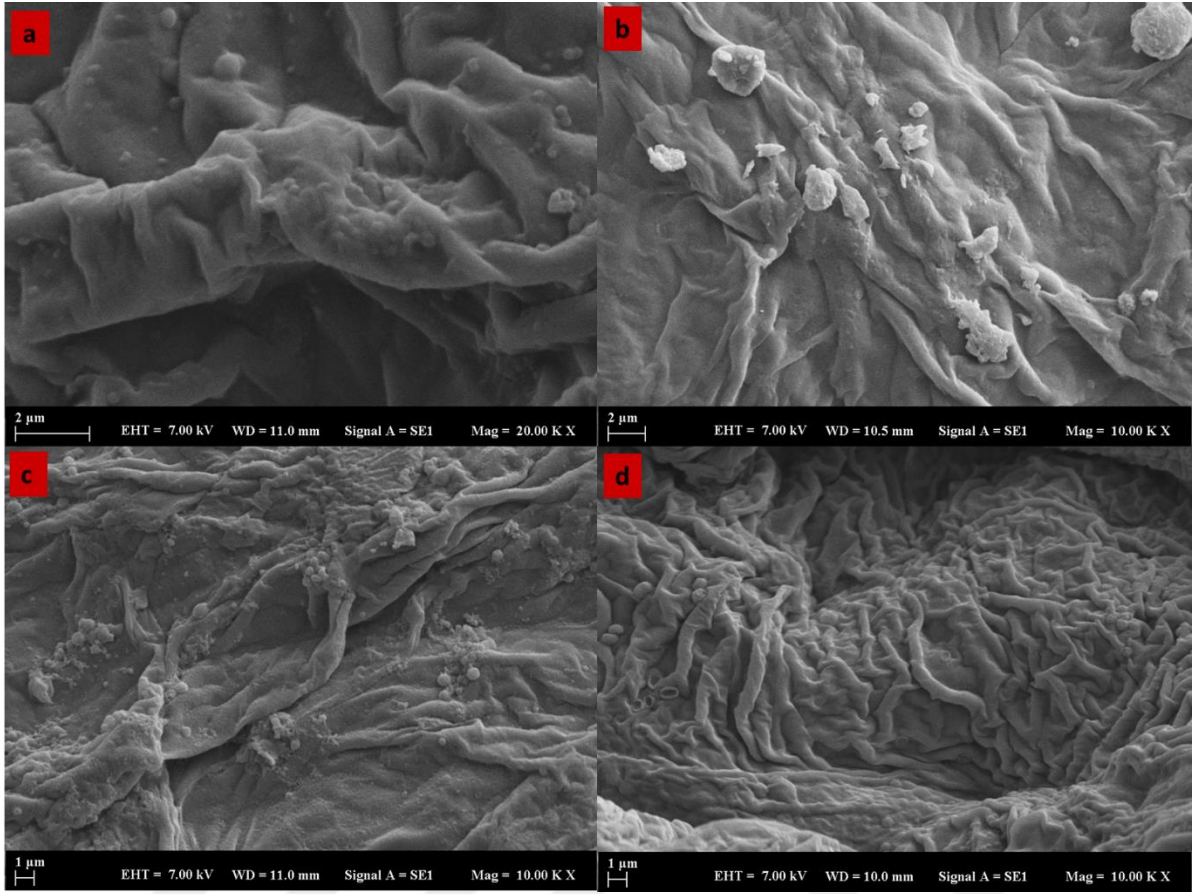
fenolik madde ve antosiyanin verimleri söz konusu çalışmalara kıyasla çok fazladır. Bu kadar farklı sonuçlar elde edilmesinin pek çok nedeni vardır. Bunlardan bazıları örnek hazırlama, kullanılan ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon şartları (sıcaklık, katı madde miktarı, solvent miktarı, ekstraksiyon süresi, solvent türü gibi), kullanılan bitkisel metaryelin türü ve coğrafi koşulları, ve hasat zamanı gibi faktörlerdeki farklılıklar olabilir.

4.1.7. Morfolojik Çalışmalar

Vişne kabuklarının yapılarında meydana gelen değişimler taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Her bir yöntemin malzeme üzerine etkisini karşılaştırmalı olarak gözlemleyebilmek için söz konusu yöntemlerin (MDE, UDE, HDE ve OÇE) uygulanmasının ardından çöküntü olarak kalan kabuklar süzülerek kurutulmuştur. Sonuçlar (SEM görüntüleri) karşılaştırmalı olarak Şekil 4.24 ve Şekil 4.25 ile sunulmuştur.



Şekil 4.24: Ekstraksiyon işlemleri önces vişne kabuğunun morfolojik yapısı.



Şekil 4.25: Ekstraksiyon işlemi sonrası vişne kabuğu morfolojik yapısı (a): MDE, (b): UDE, (c) HDE, (d) OÇE.

Şekil 4.24 incelendiğinde ekstraksiyondan önce vişne kabuğu yüzeyinin yoğun biçimde sıkışmış olduğu net bir şekilde görülmektedir. Ekstraksiyon işleminin tüm numunelerde yapısal değişiklikler yarattığı da görülmektedir (Şekil 4.25). MDE (Şekil 4.25a) ve OÇE (Şekil 4.25d) yöntemlerinde ani ısıl gerilmeler ve yüksek lokalize basınçlar hücre yapısını etkileyerek yoğun kırışıklıklara ve yırtılmalara neden olmuştur. Benzer bir şekilde Dahmoune vd. tıbbi bitkilerden polifenolik bileşiklerin mikrodalga ile ekstraksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada, elektromanyetik dalgaların mikrodalga ışınlama sırasında ani sıcaklık artışına bağlı olarak hücre hasarına ve kopmasına neden olduğunu doğrulamışlardır (Dahmoune ve diğ., 2015). Bu yapısal değişiklik, çözücünün yüksek ekstraksiyon verimliliği ile hücresel kanallara kolay girişine izin vermekte ve daha yüksek fenolik madde verimi sağlanmaktadır.

UDE (Şekil 4.25b) ve HDE (Şekil 4.25c) yöntemlerinin etkisi incelendiğinde ultrasonik dalgaların kavitasyon etkilerinden ve güçlü kesme kuvvetlerinden kaynaklanabilecek bazı

kırıksıklık ve yırtılmalar olduğu görülmüştür. Bu değişiklikler fenolik bileşiklerin çözücüye geçişini arttırsa da MDE ve OÇE kadar etkili olmadığı görülmektedir.

4.1.8. Stabilité Çalışmaları

Optimizasyon çalışması, özütleyici olarak sulu alkol çözeltisinin kullanıldığı en iyi koşulları (Tablo 4.29) belirlemiştir. Bu özütleyiciyi sürdürülebilir bir ortam olarak önermek için, seçilen yöntemler (MDE, UDE, HDE ve OÇE) ile üretilen vişne kabuğu özütü, çeşitli koşullara maruz bırakıldı. Örneklerin sırasıyla dondurucu (-20 °C), buzdolabı (4 °C) ve oda sıcaklığı (25 °C) koşullarında tutulmasıyla ürünlerin saklama stabilitesi değerlendirilmiştir. Bununla beraber güneş ışınlarının oksidasyona etkisi olup, bozunmayı hızlandırıcı bir faktör olup olmadığı da değerlendirilmiştir. Ürünler toplam fenolik ve antosiyanin içerikleri ve siyanidin-3-glukozit açılardan periyodik olarak test edildi (Ek 1 – Ek 4). Bu depolama kararlılığı testi 60 gün sürmüştür.

4.1.8.1. MDE Yöntemiyle Elde Edilen Vişne Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi

Tablo 4.30, MDE ile elde edilen vişne kabuğu ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerine (TFM, TA ve siyanidin-3-glukozit) göre zamanın bir fonksiyonu olarak her bir depolama ortamının karşılaştırmalı sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.26 ise bu süreçte (60 gün) gerçekleşen değişimi gözler önüne sermektedir.

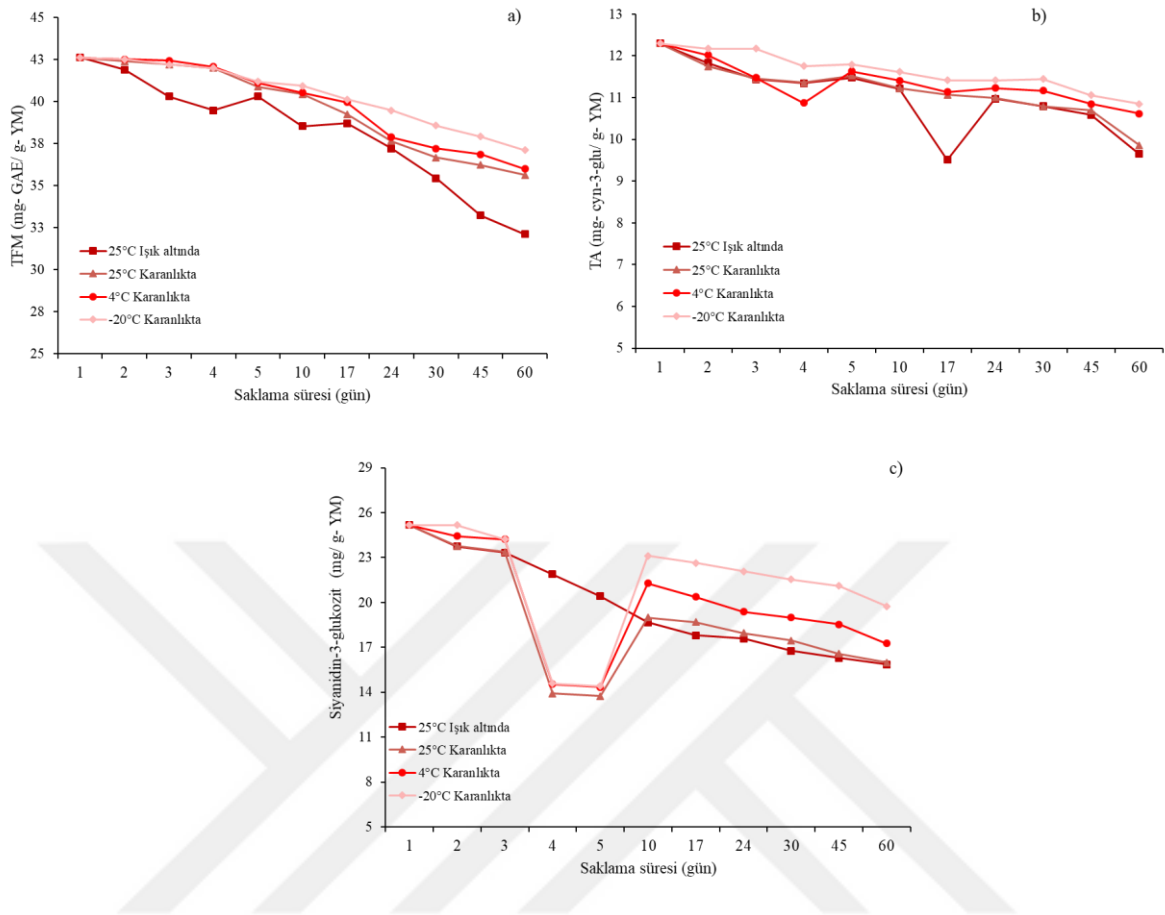
Tabloda ilk dikkat çeken bulgunun her üç ölçülen değer için de oda sıcaklığı ve aydınlık bir ortamda muhafaza edilen örnek içerisindeki biyoaktif içeriğin bozunma oranının en yüksek olmasıdır. Bu durum ilk 4 günden de anlaşılmaktadır (Şekil 4.26). 4 gün boyunca bozunma her üç bağımlı değişken için de çok hızlı bir şekilde ilerlemiştir. Benzer bir durum mikroalgal bir biyokütlede bulunan karotenoidlerin ekstrakte edilip stabilitesinin gözlemlendiği bir çalışmada da gözlenmiştir (Gouveia ve Empis, 2003). Işık altında oda sıcaklığında muhafaza edilen ekstraktlarda 15 ila 30 gün arasında tam (%100) karotenoid kaybı, karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilenlerde ise %50 kayıp gözlenmiştir. Bu çalışmada, vişne kabuğu ekstraktının stabilitesi ağırlıklı olarak ışıktan etkilenmiştir.

Diğer taraftan, sıcaklığında biyoaktif bileşenler üzerinde doğrudan etkili olduğu söylenebilir (Tablo 4.30). Depolama sıcaklığının artması ile beraber bozunma hızının ve oranında arttığı görülmektedir (Şekil 4.26). Soğuk bir ortamda muhafaza ürünün kalitesinde özellikle

antosiyeninler açısından önemli bir iyileşme gözlenmiştir. Toplam antosiyenin degradasyonunda %31 (buzdolabı koşulu) ile %41 (derin dondurucu koşulu) oranlarında bir düşüş gözlenmiştir. En önemli bireysel antosiyenin açısından da %16 ile 31 arasında bir ürün kalitesinde artış gözlenmiştir. Benzer bir sonuç, sıcaklığın *Orthosiphon stamineus* yaprağının major polifenollerinin stabilitesi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada da gözlenmiştir (Akowuah ve Zhari, 2010). Daha düşük sıcaklıktaki özütler, bozunmaları nedeniyle yüksek sıcaklıkta özütlere kıyasla önemli ($p < 0,5$) serbest radikal süpürme etkinliği sergilemişlerdir. *Hibiscus sabdariffa* bitkisinden UDE ile biyoaktif bileşenlerin ekstrakte edilip depolama şartlarının ekstraktın stabilitesine etkilerinin incelendiği bir başka çalışmada da yine %80 etanol çözücü olarak kullanılmıştır (Şahin, Pekel ve Toprakçı, 2020). Bu çalışmada da benzer şekilde daha soğuk ortamda (-20°C) muhafaza edilen ekstraktların TA içeriği, 4°C 'deki örneklerle göre daha iyi bir kararlılık göstermiştir.

Tablo 4.30: MDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış vişne kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA ve Siyanidin-3-glukozit değerleri.

Saklama Koşulları	TFM (mg-GAE/g-YM)		TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		Siyanidin-3-glukozit (mg/ g-YM)	
	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu
1 atm, 25°C Işık altında	42,65±0,001	32,12±0,002 ^a	12,30±0,001	9,65±0,002 ^a	25,17±0,001	15,85±0,003 ^a
1 atm, 25°C Karanlık	42,65±0,001	35,65±0,001 ^b	12,30±0,001	9,86±0,001 ^b	25,17±0,001	17,26±0,002 ^b
1 atm, 4°C Karanlık	42,65±0,001	36,01±0,003 ^c	12,30±0,001	10,62±0,001 ^c	25,17±0,001	18,54±0,001 ^c
1 atm, - 20°C Karanlık	42,65±0,001	37,12±0,001 ^d	12,30±0,001	10,85±0,002 ^d	25,17±0,001	19,74±0,001 ^d



Şekil 4.26: MDE yöntemiyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b) ve siyanidin-3-glukozit (c).

4.1.8.2. UDE Yöntemiyle Elde Edilen Vişne Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi

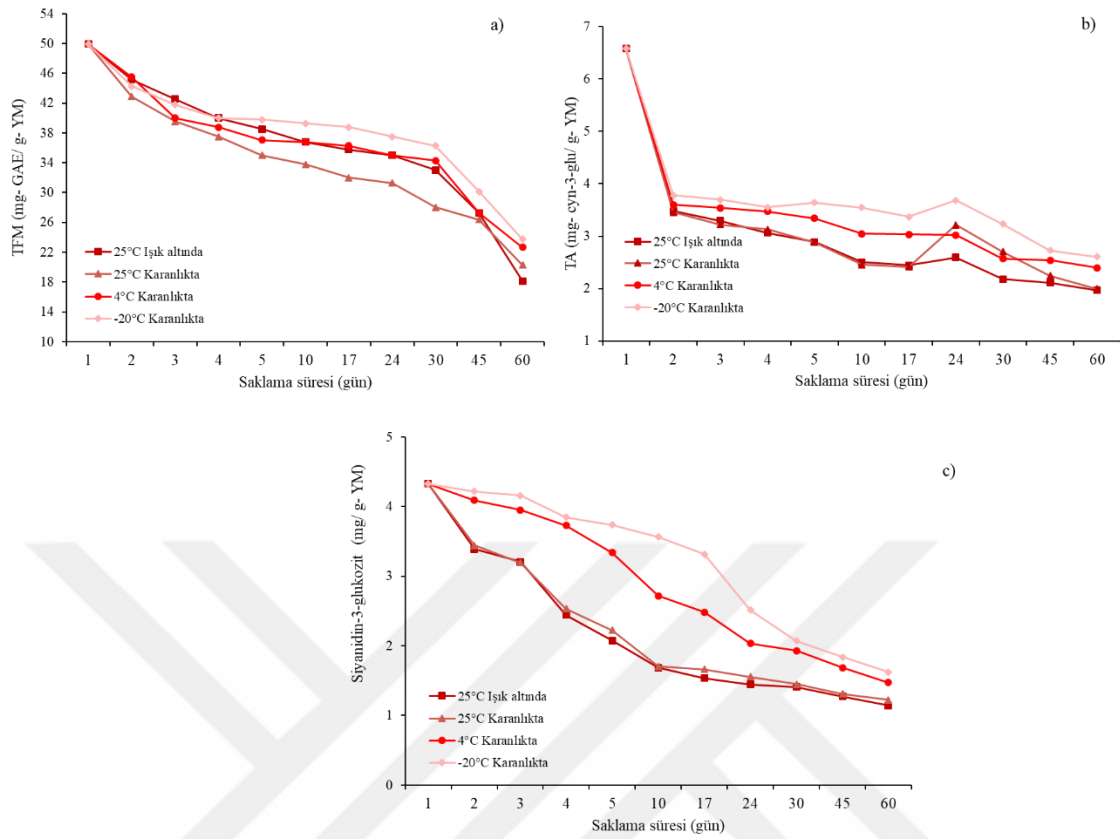
Tablo 4.31, UDE ile elde edilen vişne kabuğu ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerine (TFM, TA ve siyanidin-3-glukozit) göre zamanın bir fonksiyonu olarak her bir depolama ortamının karşılaştırmalı sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.27 ise bu süreçte (60 gün) gerçekleşen değişimi gözler önüne sermektedir.

MDE ile elde edilen ekstraktların stabilite sonuçlarına genel olarak benzer bulgular gözlenmiştir. Şekil 4.27 'den de görüldüğü gibi örneklerin TA içeriğinin ikinci günden itibaren keskin bir düşüşe geçtiği görülmüştür. En yüksek bozunmanın da yine oda koşullarında ve ışık altında depolanan örneklerde olduğu gözlenmiştir. Yine kararlılığın en iyi şekilde muhafaza edildiği örneklerin en soğuk şartlarda muhafaza edilen ekstraktlar olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak bu bulgu, bozunma reaksiyonlarının sıcaklıkla desteklendiğini göstermektedir (Cortés-Rojas ve diğ., 2016). Burada dikkat çeken bir diğer ayrıntı ise bozunma miktarlarının artması olmuştur ($> \%50$). Bu durumda ekstraksiyon yönteminin de yine içeriğindeki biyoaktif bileşenlerin kararlılığına etkili bir parameter olduğu sonucunu çıkarabiliriz.

Tablo 4.31: UDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış vişne kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA ve Siyanidin-3-glukozit değerleri.

Saklama Koşulları	TFM (mg-GAE/g-YM)		TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		Siyanidin-3-glukozit (mg/ g-YM)	
	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu
1 atm, 25°C Işık altında	49,90±0,001	18,15±0,002 ^a	6,57±0,001	1,96±0,001 ^a	4,32±0,001	1,14±0,001 ^a
1 atm, 25°C Karanlık	49,90±0,001	20,28±0,001 ^b	6,57±0,001	1,99±0,001 ^b	4,32±0,001	1,22±0,002 ^b
1 atm, 4°C Karanlık	49,90±0,001	22,65±0,003 ^c	6,57±0,001	2,39±0,002 ^c	4,32±0,001	1,47±0,001 ^c
1 atm, - 20°C Karanlık	49,90±0,001	23,78±0,001 ^d	6,57±0,001	2,60±0,003 ^d	4,32±0,001	1,62±0,003 ^d



Şekil 4.27: UDE yöntemiyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b) ve siyanidin-3-glukozit (c).

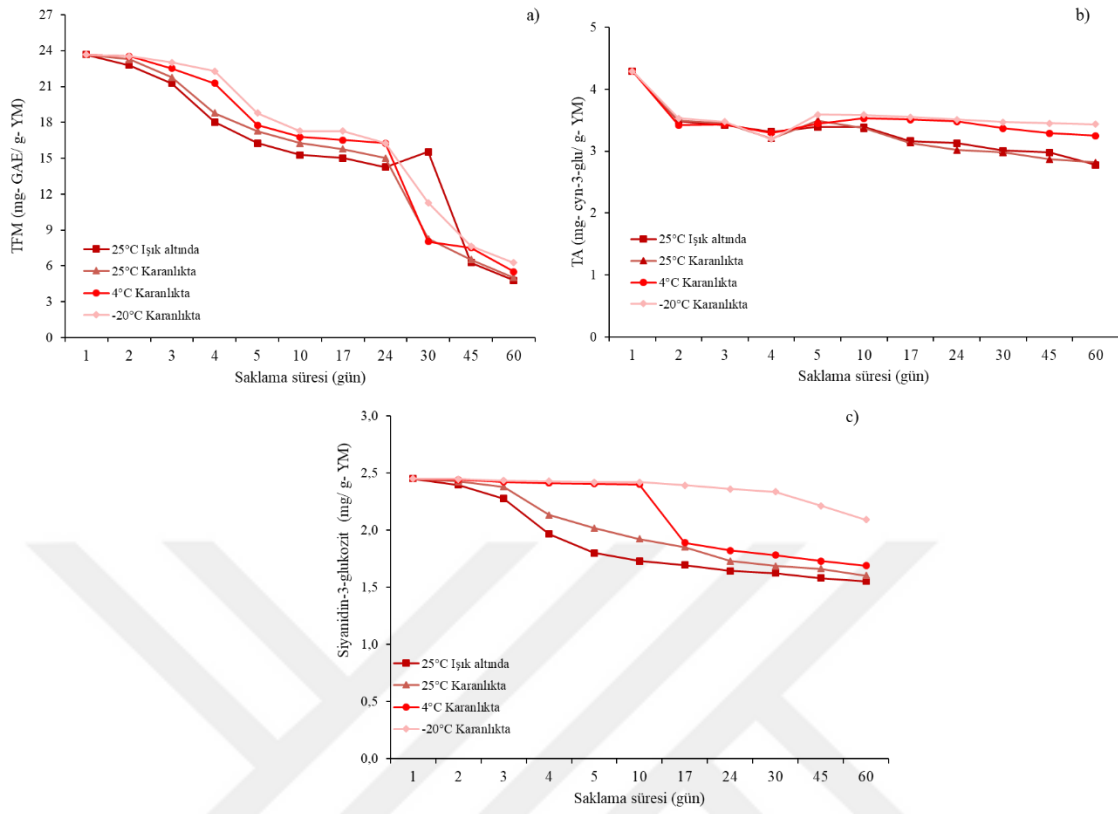
4.1.8.3. HAE Yöntemiyle Elde Edilen Vişne Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi

Tablo 4.32, HDE ile elde edilen vişne kabuğu ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerine (TFM, TA ve siyanidin-3-glukozit) göre zamanın bir fonksiyonu olarak her bir depolama ortamının karşılaştırmalı sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.28 ise bu süreçte (60 gün) gerçekleşen değişimi gözler önüne sermektedir.

Benzer trendleri (MDE ve UDE) bu yöntemle elde edilen örneklerin muhafaza sürecinde de görmek mümkün. Yine aynı şekilde ışık ve oda sıcaklığı HDE ekstraktları üzerinde de benzer etkileri göstermiştir. Söz konusu örneklerde gözlemlenen en dikkat çekici durumun içeriğindeki TFM miktarının %73 ile 80 arasında bir bozunmaya maruz kalmasıdır. Bu durum ekstraksiyonda kullanılan sulu etanolün %40 oranında etanol ihtiva etmesi ile açıklanabilir. Zira diğer ekstraksiyon yöntemlerinde %80 oranında alkol kullanılmış ve bu durumda ekstraktan ortamı olarak daha fazla alkol söz konusu olduğundan fenolik maddelerin daha az degradasyona uğramasına sebebiyet vermiştir.

Tablo 4.32: HDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış vişne kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA ve Siyanidin-3-glukozit değerleri.

Saklama Koşulları	TFM (mg-GAE/g-YM)		TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		Siyanidin-3-glukozit (mg/ g-YM)	
	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu
1 atm, 25°C Işık altında	23,65±0,001	4,78±0,003 ^a	4,29±0,002	2,78±0,005 ^a	2,45±0,001	1,55±0,001 ^a
1 atm, 25°C Karanlık	23,65±0,001	5,03±0,004 ^b	4,29±0,002	2,82±0,002 ^b	2,45±0,001	1,60±0,001 ^b
1 atm, 4°C Karanlık	23,65±0,001	5,53±0,002 ^c	4,29±0,002	3,25±0,001 ^c	2,45±0,001	1,69±0,003 ^c
1 atm, - 20°C Karanlık	23,65±0,001	6,28±0,001 ^d	4,29±0,002	3,44±0,004 ^d	2,45±0,001	2,09±0,002 ^d



Şekil 4.28: HDE yöntemiyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b) ve siyanidin-3-glukozit (c).

4.1.8.4. OÇE Yöntemiyle Elde Edilen Vişne Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi

Tablo 4.33, OÇE ile elde edilen vişne kabuğu ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerine (TFM, TA ve siyanidin-3-glukozit) göre zamanın bir fonksiyonu olarak her bir depolama ortamının karşılaştırmalı sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.29 ise bu süreçte (60 gün) gerçekleşen değişimi gözler önüne sermektedir.

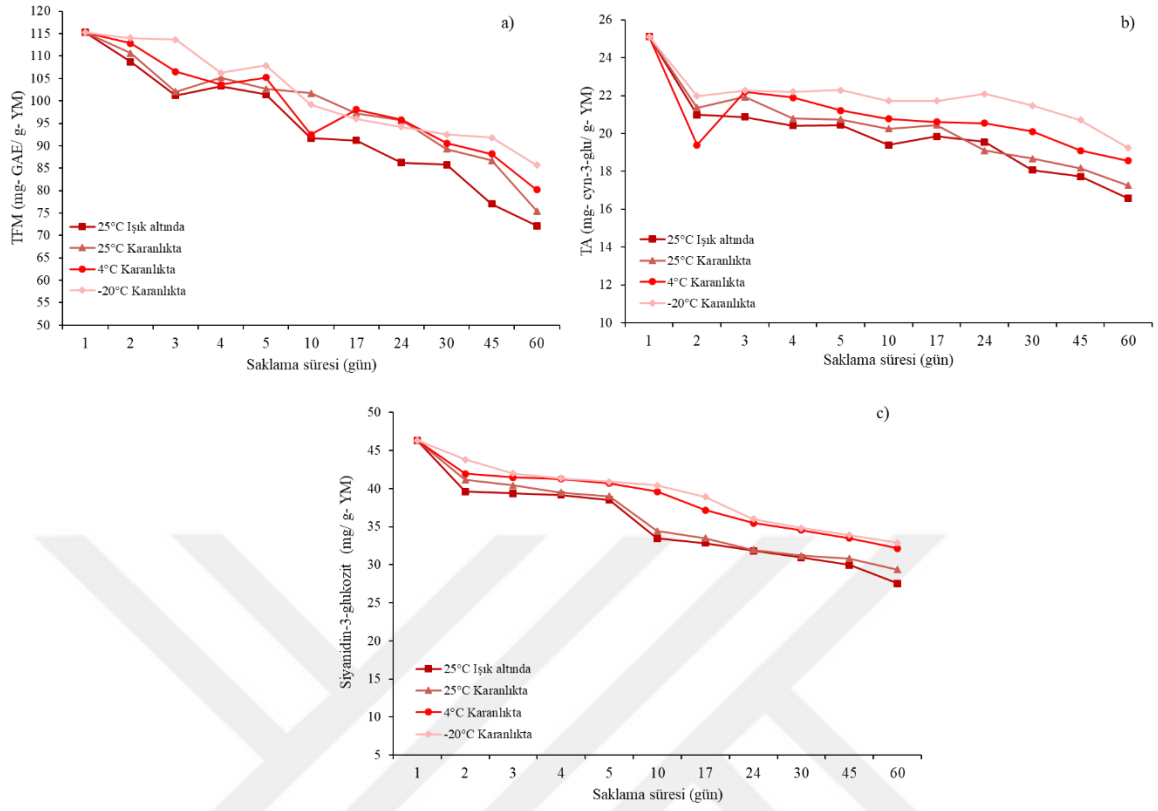
Depolama ortamının sıcaklığının azalması ile beraber örneklerin içeriğindeki TFM, TA ve siyanidin-3-glukozitin düzenli olarak arttığını söyleyebiliriz (Tablo 4.33). Bitki materyallerinin ekstraksiyonu ile elde edilen özütlerin bulunduğu ortamdaki sıcaklık, kimyasal ve enzimatik bozunma nedeniyle polifenolik bileşenlerin stabilitesini etkiler. Bu elementler tarafından bozunma, polifenol içeriğinde azalmaya ve antioksidatif aktivite kaybına neden olur (Akowuah ve Zhari, 2010). Başka bir yoruma göre ise sıcaklığın artmasıyla antosiyaninlerin hızlı bir

şekilde yok edilmesi, kararsız antosiyaninde koruyucu bir etkiye sahip olan antosiyanin yapısının hidrolize olmasından kaynaklanıyor olabilir (Jamei, 2006).

Her üç ölçülen değer için de aydınlık ortama maruz bırakılan örneklerin bozunma oranları 60. günün sonunda %34'ün üzerindedir. Karanlık ortamda ise bu değer %23 ile 29 arasında değişmektedir.

Tablo 4.33: OÇE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış vişne kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA ve Siyanidin-3-glukozit değerleri.

Saklama Koşulları	TFM (mg-GAE/g-YM)		TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		Siyanidin-3-glukozit (mg/ g-YM)	
	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu
1 atm, 25°C Işık altında	115,26±0,001	72,12±0,005 ^a	25,12±0,002	16,57±0,002 ^a	46,31±0,002	27,54±0,001 ^a
1 atm, 25°C Karanlık	115,26±0,001	75,43±0,001 ^b	25,12±0,002	17,25±0,001 ^b	46,31±0,002	29,36±0,002 ^b
1 atm, 4°C Karanlık	115,26±0,001	80,21±0,006 ^c	25,12±0,002	18,56±0,002 ^c	46,31±0,002	32,14±0,005 ^c
1 atm, - 20°C Karanlık	115,26±0,001	85,69±0,003 ^d	25,12±0,002	19,24±0,003 ^d	46,31±0,002	32,87±0,004 ^d



Şekil 4.29: OÇE yöntemiyle hazırlanan vişne kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b) ve siyanidin-3-glukozit (c).

4.2. ŞEFTALİ YAN ÜRÜNLERİNE UYGULANAN EKSTRAKSİYON ÇALIŞMALARI

4.2.1. Yan Ürünlerin Karşılaştırmalı Sonuçları

Dünya çapında meyve sularına işlenmek üzere 15 milyon tondan fazla şeftali tüketilmektedir. Şeftali suyu endüstrisi, esas olarak deri, tohumlar ve bazı meyve parçalarıyla temsil edilen büyük miktarda atık üretmektedir ki bu atık belirgin bir antioksidan aktivite gösteren polifenoller gibi biyoaktif bileşikler açısından zengindir (Plazzotta ve diğ., 2020). Tablo 4.34, mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen TFM, TA ve antioksidan aktivite sonuçlarını karşılaştırmalı olarak göstermektedir. Bu sette de bir önceki bölümde incelenmiş olan vişne ve atıklarına uygulanmış olan MDE şartları kullanılmıştır. Öncelikle etanol-su oranını belirlemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda çözeltiler denenmiş ve % 80 etanol-su çözücü (85:15 0,1 N HCl) oranında karar kılınmıştır. Katı/sıvı oranı 0,5 g/ 30 mL alınarak 500 W ve 90 s şartlarında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.34: Şeftali yan ürünlerine uygulanan MDE sonucundaki biyoaktif özellikler*.

	TFM (mg/L)	DPPH (% indirgeme)	TA (mg/L)
Şeftali Kabuğu	51,3±0,008 ^{a**}	72,34±0,003 ^a	5,76±0,001 ^a
Şeftali Posası	7,6±0,001 ^b	57,16±0,001 ^b	3,52±0,002 ^b
Şeftali Yaprığı	43,07±0,003 ^c	65,23±0,001 ^c	1,00±0,001 ^c
Şeftali Suyu	8,5±0,001 ^d	52,85±0,002 ^d	3,33±0,003 ^d

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

Şeftaliye ait her bir bölümün TFM ve TA içerikleri ve DPPH'i süpürme etkileri incelendiğinde, herbirinin istatistiksel olarak farklılık gösterdiği gözlenmiştir (p < 0.05). Her üç ölçüm için de en yüksek içeriğe şeftali kabuklarının sahip olduğu görülmektedir. Posa ve suyun TFM içerikleri kabuğa göre oldukça düşüktür (6-7 kat daha az). Şeftali kabuklarının biyoaktif madde kapasitesini şeftali yaprakları takip etmektedir. Fakat, antosiyanin açısından bakıldığında kabukların içeriğindeki TA değeri, yaprakların içerdiği TA değerinin yaklaşık 6 katıdır. Yine vişne yan ürünlerinde gözlemlendiği gibi şeftalide de DPPH serbest radikalini süpürme etkisi

açısından bakılacak olursa 4 ürünün de kabuklar hariç hemen hemen yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildikten sonra ilerleyen çalışmalarda şeftali kabuğu potansiyel antioksidan kaynağı olarak farklı ekstraksiyon yöntemleri ile incelenmiştir.

4.2.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

4.2.2.1. Proses Parametrelerinin Etkisi

Şeftali kabuklarından MDE ile biyoaktif içerikçe zengin ekstrakt eldesinde, Yüzey Merkezli Kompozit ile tasarlanan mevcut çalışmanın deneysel planı Tablo 4.35 ile gösterilmektedir. Tablo 4.35'te görüldüğü gibi, yazılım (Design-Expert) ilgili sistem için 5 merkez noktası (425 W, 60 s ekstraksiyon süresi ve % 50 etanol çözeltisi) ile 20 deneysel çalışma üretmiştir. Tablo 4.36 ise verilen şartlardaki deneysel sonuçları göstermektedir. Ayrıca, ilgili yazılım ile çizilen 3D'ler (Şekil 4.29-4.31), proses parametrelerinin etkisini görsel olarak sunmaktadır.

Tablo 4.35: Şeftali kabuklarına uygulanan MDE metodunun deneysel tasarımı.

Deney No	Mikrodalga Gücü (W)	Ekstraksiyon Süresi (s)	Çözücü Konsantrasyonu (% v/v)
1	500	30	80
2	425	60	80
3	350	90	80
4	425	60	50
5	350	60	50
6	425	60	50
7	425	90	50
8	350	90	20
9	500	90	80
10	425	60	50

Tablo 4. 35 (devam):

11	350	30	20
12	500	60	50
13	500	90	20
14	425	30	50
15	425	60	20
16	425	60	50
17	350	30	80
18	425	60	50
19	425	60	50
20	500	30	20

Şeftali kabuklarının farklı MDE şartlarındaki toplam fenolik madde miktarının gram yaş malzeme başına 9,93 ile 19,64 mg-GAE arasında değiştiği gözlenmektedir (Tablo 4.36). Kabukların TA içerikleri ise 0,04 ile 2,11 mg-cyn-3-glu/ g-YM arasında değerler almıştır.

Tablo 4.36: Şeftali kabuklarına uygulanan MDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.

Deney No	TFM (mg-GAE/ g-YM)	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)
1	13,22±0,001 ^{a**}	0,79±0,001 ^a
2	12,50±0,001 ^b	0,79±0,001 ^a
3	14,47±0,001 ^c	0,38±0,006 ^b
4	13,11±0,002 ^d	2,11±0,001 ^c
5	14,28±0,001 ^e	0,84±0,001 ^d
6	11,21±0,001 ^f	0,27±0,004 ^e
7	14,98±0,000 ^g	0,92±0,001 ^f
8	13,73±0,001 ^h	0,51±0,001 ^g

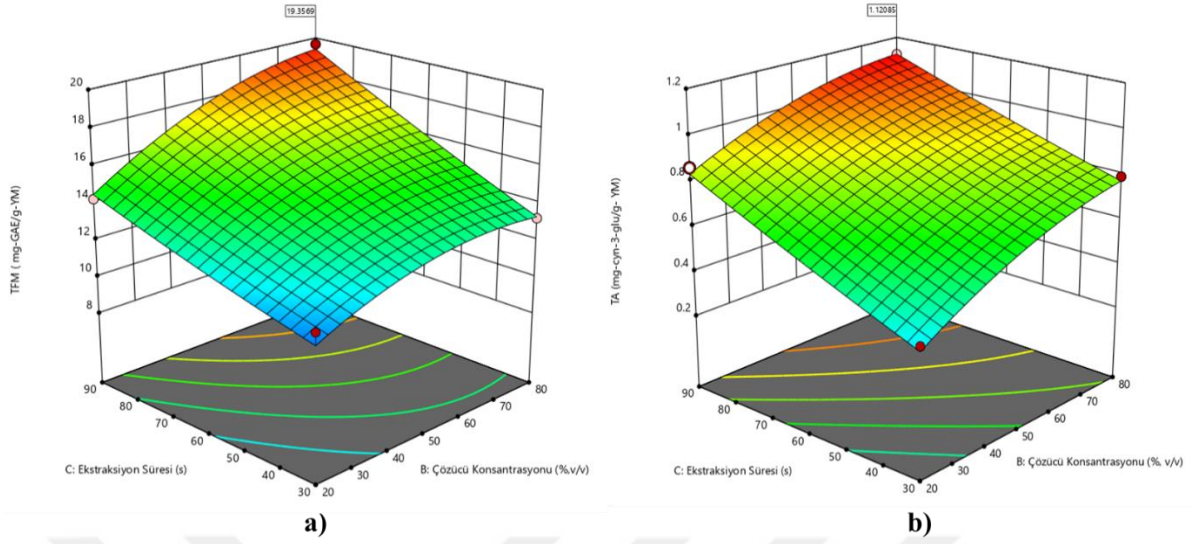
Tablo 4. 36 (devam):

9	19,64±0,003 ⁱ	1,07±0,000 ^h
10	11,59±0,001 ⁱ	1,88±0,001 ⁱ
11	11,47±0,000 ^j	0,28±0,002 ⁱ
12	14,76±0,000 ^k	0,47±0,001 ^j
13	14,24±0,001 ^l	0,98±0,001 ^k
14	9,93±0,000 ^m	0,04±0,000 ^l
15	10,26±0,000 ⁿ	0,14±0,001 ^m
16	12,37±0,001 ^o	1,91±0,001 ⁿ
17	10,82±0,000 ^p	0,20±0,003 ^o
18	13,11±0,002 ^d	1,81±0,004 ^p
19	12,25±0,001 ^r	1,73±0,002 ^r
20	11,71±0,001 ^s	0,43±0,001 ^s

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

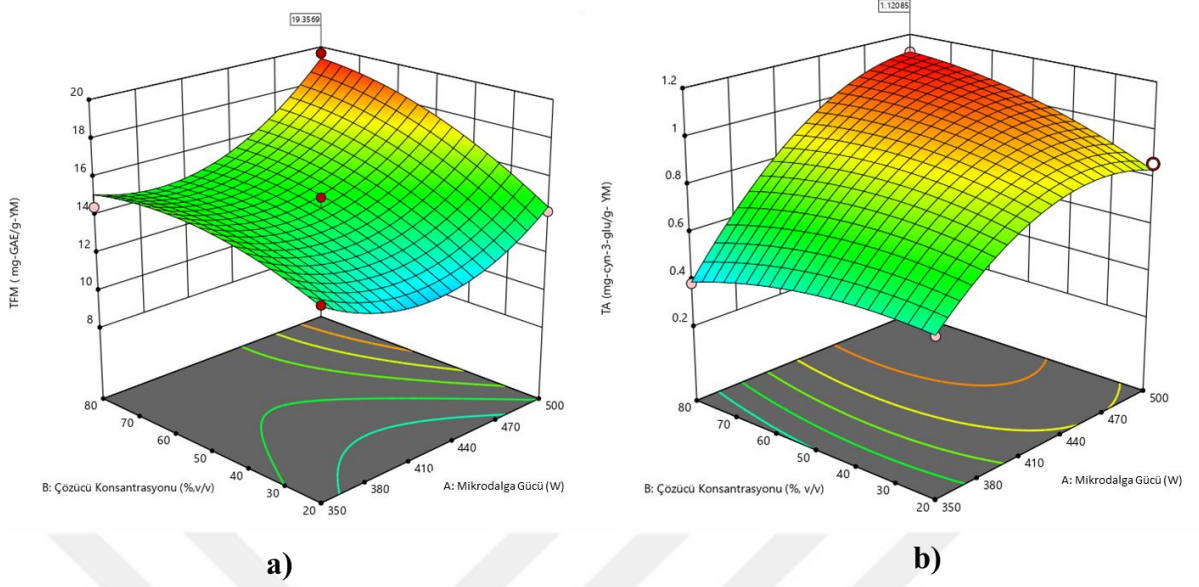
** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

Şekil 4.30, sabit mikrodalga gücünde (500 W) çözücü konsantrasyonu (EtOH) ve ekstraksiyon süresinin toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir.



Şekil 4.30: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin EtOH çözücü konsantrasyonuna (Mikrodalga gücü= 500W) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

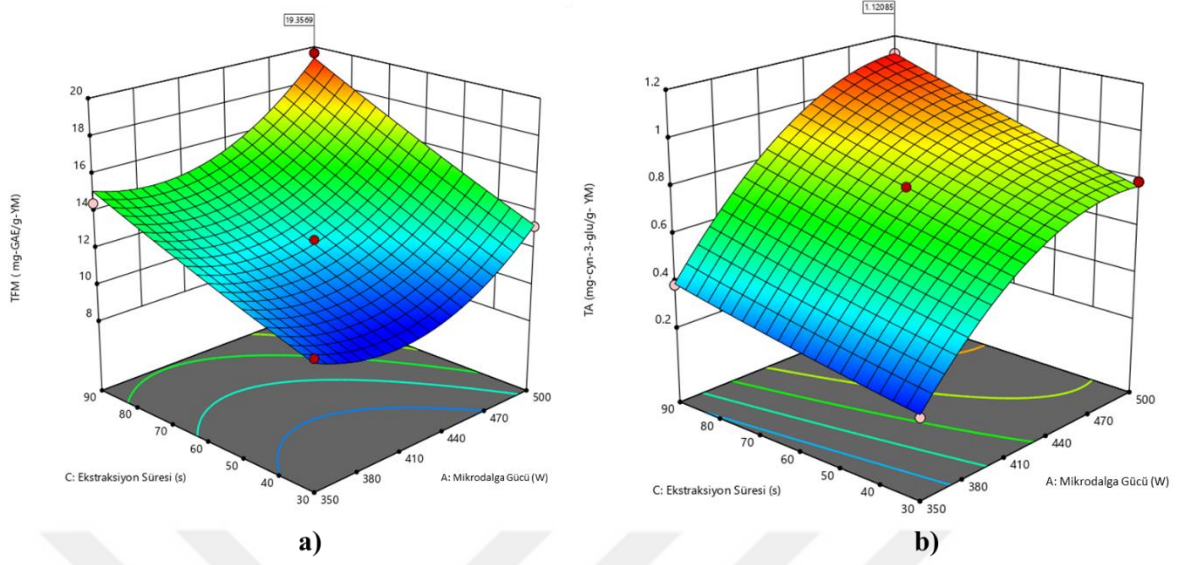
Şekil 4.30'da görüldüğü üzere TFM ve TA aynı eğilimi göstermiştir. Çözücü sistemi içindeki etanol konsantrasyonunun artması her iki bağımlı değişkeni de hafif bir şekilde arttırmıştır. Ekstraksiyon süresinin artması ise her iki verimi de düzenli olarak arttırmıştır. Benzer durum yine aynı yöntemle şeftali atıklarından fenolik ve antosiyaninlerce zengin ekstrakt eldesinde de gözlenmiştir (Plazzotta ve diğ., 2020). Beklendiği gibi, uygulanan işlemler, müdahale süresi ile artan termal etkiye bağlı olarak ekstrakt daha çok ısınmaya maruz kalmış oldu. Yani, bu parametrede bir artışın işlenen numuneye verilen enerji miktarını artırdığı bilindiğinden, verimin artması beklenen bir durumdur.



Şekil 4.31: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, EtOH çözücü konsantrasyonunun mikrodalga gücüne göre bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği (Ekstraksiyon süresi = 90 s).

Şekil 4.31, sabit ekstraksiyon süresinde (90 s) çözücü konsantrasyonu (EtOH) ve mikrodalga gücünün toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Mikrodalga müdahalesinin artması yukarıda açıklandığı gibi her iki verimi de düzenli olarak arttırmıştır. Gücün etkisine bakacak olursak, iki bağımlı değişkende birbirinin ziti yönünde bir tepki vermişlerdir. Şekil 4.31a, TFM veriminin güç ile beraber önce bir azalış gösterdiğini, ardından (~450 W) yükselişe geçtiğini göstermektedir. Bu durum başlangıçta sıcaklığın artmasına yol açarak mevcut fenolik bileşenleri degrada etmiş olabilir. Sonraki artışın sebebi ise o belirli bir sıcaklık değerinden sonra matris içerisindeki fenolik bileşenleri bozan enzimlerin degradasyonu sonucu, verimin tekrardan artması olabilir.

TA verimi açısından bakıldığında (Şekil 4.31b), tam tersi bir trend görülmektedir. Belirli bir seviyeye kadar düzenli bir verim artışı, ardından (>~450 W) bir düşüş yaşanmıştır. Benzer durum, Chen ve arkadaşlarının MDE ile *Armillaria* bitkisinden polisakkaritleri ekstraksiyonunda da gözlenmiştir (C. Chen ve diğ., 2015). Yine aynı şekilde Ameer ve diğ. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) yapraklarından biyoaktif maddeleri MDE yöntemi ile etanol-su karışımını kullanarak ekstrakte ederken benzer trendi gözlemlemişlerdir (Ameer ve diğ., 2017). Gücün belirli bir değerden sonra ısıya hassas ürünlerin fazla ısınmasına yol açarak degradasyonuna yol açmış olması muhtemeldir.



Şekil 4.32: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin mikrodalga gücüne göre bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği (Çözücü konsantrasyonu = % 80, v/v).

Şekil 4.32’ de sabit EtOH konsantrasyonunda (% 80, v/v) ekstraksiyon süresi ve mikrodalga gücünün toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Yukarıda da açıklandığı gibi sürenin artması özellikle TFM verimini düzenli olarak arttırmıştır. Mikrodalga gücünün etkisi de her iki sistem için farklı tepkilere yol açmıştır.

4.2.2.2. Modelleme

Design-Expert (versiyon 12) yazılımı kullanılarak varyans analizi (ANOVA) testi uygulanmış ve istatistiksel parametreler hesaplanmıştır. Bu parametreler F ve p-değerleri, uyum eksikliği (lack of fit) değeri, belirleme katsayısı (R^2), ayarlanmış (adjusted) belirleme katsayısı (R^2_a), tahmini (predicted) belirleme katsayısı (R^2_t) ve varyasyon katsayısı (CV) şeklindedir. Tablo 4.37 ve 4.38, YYY’nin YMK tasarımı kullanılarak MDE ile şeftali kabuklarının TFM ve TA ekstraksiyonu için hesaplanmış olan ANOVA test sonuçlarını sergilemektedir.

Tablo 4.37: MDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.

TFM	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	83,43	9	9,27	16,47	< 0,0001	önemli
A- Mikrodalga Gücü	7,77	1	7,77	13,80	0,0040	
B- Çözücü Konsantrasyonu	8,52	1	8,52	15,14	0,0030	
C- Ekstraksiyon Süresi	39,59	1	39,59	70,35	< 0,0001	
AB	5,79	1	5,79	10,29	0,0094	
AC	1,16	1	1,16	2,07	0,1808	
BC	3,48	1	3,48	6,19	0,0321	
A²	13,22	1	13,22	23,49	0,0007	
B²	2,47	1	2,47	4,39	0,0627	
C²	0,0463	1	0,0463	0,0822	0,7801	
Kalıntı	5,63	10	0,5628			
Uyum Eksikliği	2,63	5	0,5258	0,8769	0,5556	önemsiz
Saf Hata	3,00	5	0,5997			

Tablo 4.38: MDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TA için ANOVA analizi.

TA	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	1,05	9	0,1166	28,82	< 0,0001	önemli
A- Mikrodalga Gücü	0,4776	1	0,4776	118,08	< 0,0001	
B- Çözücü Konsantrasyonu	0,0355	1	0,0355	8,78	0,0142	
C- Ekstraksiyon Süresi	0,2267	1	0,2267	56,06	< 0,0001	
AB	0,0858	1	0,0858	21,20	0,0010	

Tablo 4. 38 (devam):

AC	0,0148	1	0,0148	3,65	0,0852	
BC	0,0030	1	0,0030	0,7465	0,4078	
A ²	0,0789	1	0,0789	19,51	0,0013	
B ²	0,0088	1	0,0088	2,18	0,1707	
C ²	0,0002	1	0,0002	0,0491	0,8291	
Kalıntı	0,0404	10	0,0040			
Uyum Eksikliği	0,0155	5	0,0031	0,6223	0,6923	önemsiz
Saf Hata	0,0249	5	0,0050			

TFM ve TA için türetilen modellerin her ikisi de F (16,47 ve 28,82) ve p (<0,0001) değerleri dikkate alınarak anlamlı bulunmuştur. Diğer taraftan, eşitlik (4.9) ve (4.10), sırasıyla TFM ve TA için kodlanmış faktörler açısından Design-Expert tarafından türetilmiş olan son denklemleri vermektedir:

$$\text{TFM} \quad 12,30 + 0,8814 A + 0,9231 B + 1,99 C + 0,8510 AB + 0,3816 AC + 0,6596 BC + 2,19A^2 - 0,9473 B^2 + 0,1297 C^2 \quad (4.9)$$

$$\text{TA} \quad 0,7826 + 0,2185 A + 0,0596 B + 0,1506 C + 0,1035 AB + 0,0430 AC - 0,0194 BC - 0,1694A^2 - 0,0566 B^2 + 0,0085 C^2 \quad (4.10)$$

Sistem içerisinde herhangi bir terime ait p değerinin 0,05'ten küçük olması söz konusu terimin ilgili sistem üzerinde etkili olduğu anlamına geldiği daha önce bahsedilmişti. Buna dayanarak, seçilen tüm bağımsız faktörler, polifenollerin ekstraksiyonu (Tablo 4.37) için önemli bulunmuştur ki bunlar içerisinde ekstraksiyon süresi en etkili parametre olarak gözlenmiştir (p < 0,0001). Bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimler de (A ve C arasındaki etkileşim hariç) sistemi önemli derecede etkilemiştir (p < 0,05). TA açısından da tüm parametreler istatistiksel olarak etkili gözlenmiş ve bunlar içerisinde en etkilinin mikrodalga gücü (p < 0,0001) olduğu görülmüştür (Tablo 4.38). Ayrıca, parametreler arasındaki etkileşiminde mikrodalga süresi ve EtOH konsantrasyonu arasındaki etkileşim hariç, sistemi istatistiksel açıdan önemli derecede

etkilediği gözlenmektedir ($p < 0,05$). Mikrodalga gücünün ikinci dereceden kuvveti hariç, diğer parametrelerin ikinci dereceden kuvvetleri de söz konusu MDE sistemleri için istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

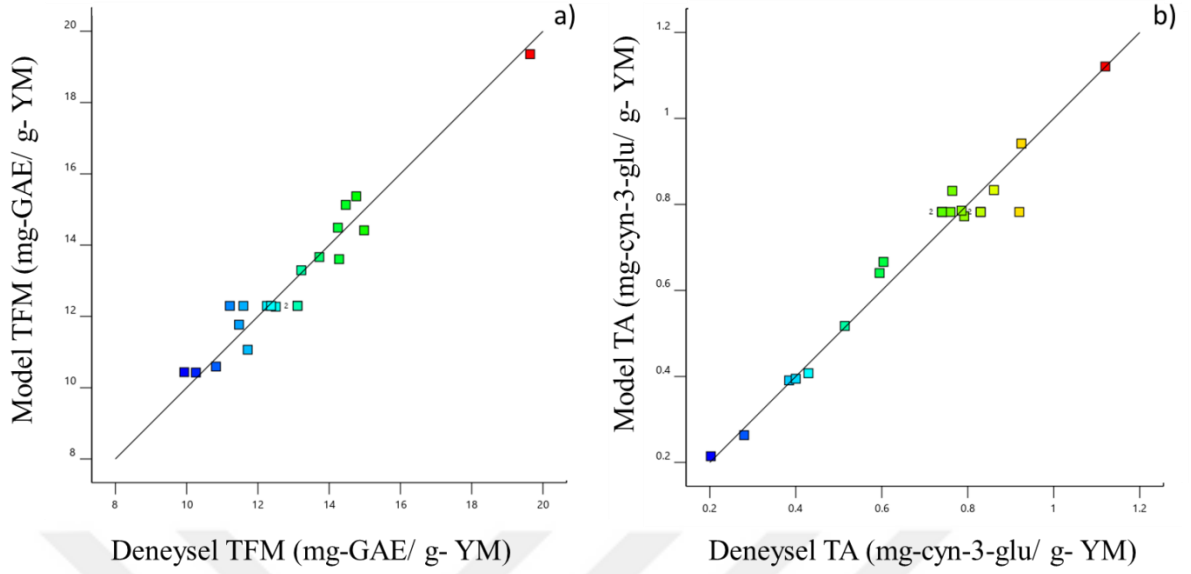
Deneysel verileri kullanarak üretilen bu ikinci dereceden polinom eşitliklerin her birinin verilere ne kadar iyi uyduğunu teşhis eden bir diğer önemli gösterge ise uyum eksikliği (lack of fit) değeridir. Belirgin uyum eksikliği olan modeller ($p < 0,05$), tahminler için kullanılmamalıdır. Dolayısıyla, her iki cevap değeri için üretilen modellerde bu değer 0,05'ten büyük hesaplanmış ve bu durum da kullanılan modellerin veriler için uygun olduğunu desteklemektedir.

Tablo 4.39 ise her iki cevap değeri için standart sapma (SD), R^2 , R^2_a , R^2_t ve CV değerlerini göstermektedir. Yüksek belirleme katsayılarına bağlı olarak da üretilen ikinci dereceden denklemlerin deneysel verileri ne kadar iyi temsil ettiği sonucunu çıkarabiliriz. Ek olarak, CV değeri % 10'dan azdır ve göreceli değişkenliği göstermektedir. CV düştükçe tahminin kesinliği artmaktadır (Şahin ve diğ., 2021).

Tablo 4.39: MDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.

Cevap Değişkeni	SD	R^2	R^2_a	R^2_t	CV
TFM(mg-GAE/ g-YM)	0,7502	0,9368	0,8799	0,5903	5,78
TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,0636	0,9629	0,9295	0,8847	9,44

ANOVA bulgularına dayanarak, her iki sistem (TFM ve TA) için de deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında tatmin edici bir ilişki olduğu söylenebilir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: Şeftali kabuklarına uygulanan MDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.

4.2.2.3. Optimizasyon ve Validasyon

Tablo 4.40, YMK tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, şeftali kabuklarından en yüksek TFM (19,35 mg-GAE/ g-YM) ve TA (1,12 mg-cyn-3-glu/ g-YM) içeriklerine sahip bir ekstrakt elde etmek için gerekli en iyi MDE proses şartlarını vermektedir. Validasyon çalışması da yapılmış, koşulların doğrulanması test edilmiştir. Deneysel ve hesaplanan sonuçlar arasındaki farkın kabul edilebilir olması da modelin söz konusu sistemler için uygun olduğunu desteklemektedir.

Tablo 4.40: Şeftali kabuklarının MDE için optimum koşullar ve validasyon.

Optimum Ekstraksiyon Koşulları			Parametre	Öngörülen Sonuç	Deneysel Sonuç	Hata Oranı (%)
A (W)	B (% v/v)	C (s)	TFM	19,35	20,36±0,001	4,96
500	90	80	TA	1,12	1,19±0,003	5,88

4.2.3. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon

4.2.3.1. Proses Parametrelerinin Etkisi

Şeftali kabuklarının ultrason teknolojisi kullanılarak ekstraksiyonunda, Tablo 4.41 Yüzey Merkezli Kompozit ile tasarlanan mevcut çalışmanın deneysel planını göstermektedir. Tablo 4.41’ de görüldüğü gibi, yazılım (Design-Expert) ilgili sistem için 5 merkez noktası (% 30 genlik, 0,3 gram örnek ve % 50 etanol çözeltisi) ile 20 deneysel çalışma üretmiştir. Tablo 4.42 ise verilen şartlardaki deneysel sonuçları göstermektedir. Ayrıca, ilgili yazılım ile çizilen üç boyutlu grafikler (Şekil 4.34-4.36), proses parametrelerinin etkisini görsel olarak sunmaktadır.

Tablo 4.41: Şeftali kabuklarına uygulanan UDE metodunun deneysel tasarımı.

Deney No	Genlik (%)	Katı Madde Miktarı (g)	Çözücü Konsantrasyonu (% v/v)
1	30	0,3	50
2	50	0,5	80
3	50	0,1	80
4	30	0,3	50
5	10	0,1	20
6	30	0,5	50
7	10	0,1	80
8	30	0,1	50
9	10	0,5	80
10	30	0,3	50
11	50	0,1	20
12	10	0,5	20
13	30	0,3	50
14	30	0,3	50
15	30	0,3	50
16	30	0,3	80
17	50	0,3	50

Tablo 4. 41 (devam):

18	10	0,3	50
19	50	0,5	20
20	30	0,3	20

Şeftali kabuklarının UDE yöntemiyle ekstraksiyonunda, ekstrakt içeriğinin toplam fenolik madde miktarı gram yaş malzeme başına 3,07 ile 15,22 mg-GAE arasında değişmektedir (Tablo 4.42). UDE ile elde edilen şeftali kabuğu ekstraktlarının toplam antosiyanin içeriği ise 0,03 ile 0,16 mg-cyn-3-glu/ g-YM arasında değerler almıştır.

Tablo 4.42: Şeftali kabuklarına uygulanan UDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.

Deney No	TFM (mg-GAE/ g-YM)	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)
1	6,41±0,001 ^{a**}	0,09±0,001 ^a
2	4,19±0,001 ^b	0,16±0,002 ^b
3	13,25±0,002 ^c	0,05±0,001 ^c
4	5,77±0,001 ^d	0,10±0,000 ^d
5	12,36±0,001 ^e	0,11±0,001 ^e
6	4,79±0,000 ^f	0,10±0,003 ^d
7	15,22±0,001 ^g	0,05±0,002 ^c
8	12,69±0,000 ^h	0,07±0,001 ^f
9	3,91±0,001 ⁱ	0,04±0,001 ^g
10	6,41±0,001 ^a	0,08±0,002 ^h
11	11,93±0,001 ^j	0,03±0,001 ⁱ
12	3,07±0,002 ^k	0,05±0,001 ^c

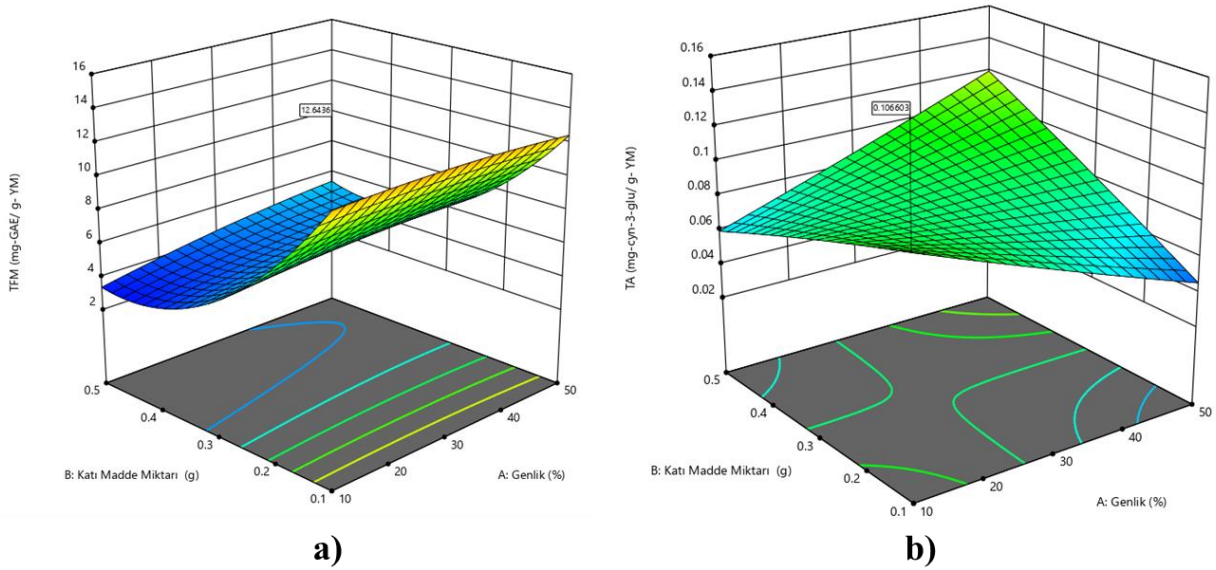
Tablo 4. 42 (devam):

13	6,16±0,000 ^l	0,10±0,002 ^d
14	5,90±0,001 ^m	0,08±0,001 ^h
15	6,08±0,001 ⁿ	0,09±0,002 ^a
16	5,75±0,003 ^o	0,06±0,001 ⁱ
17	7,70±0,001 ^p	0,10±0,003 ^d
18	4,97±0,000 ^f	0,08±0,001 ^h
19	5,33±0,001 ^s	0,10±0,002 ^d
20	6,76±0,001 ^t	0,08±0,001 ^h

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

Şekil 4.34, sabit EtOH konsantrasyonunda (% 80, v/v) genlik değeri ve katı madde miktarının toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir.

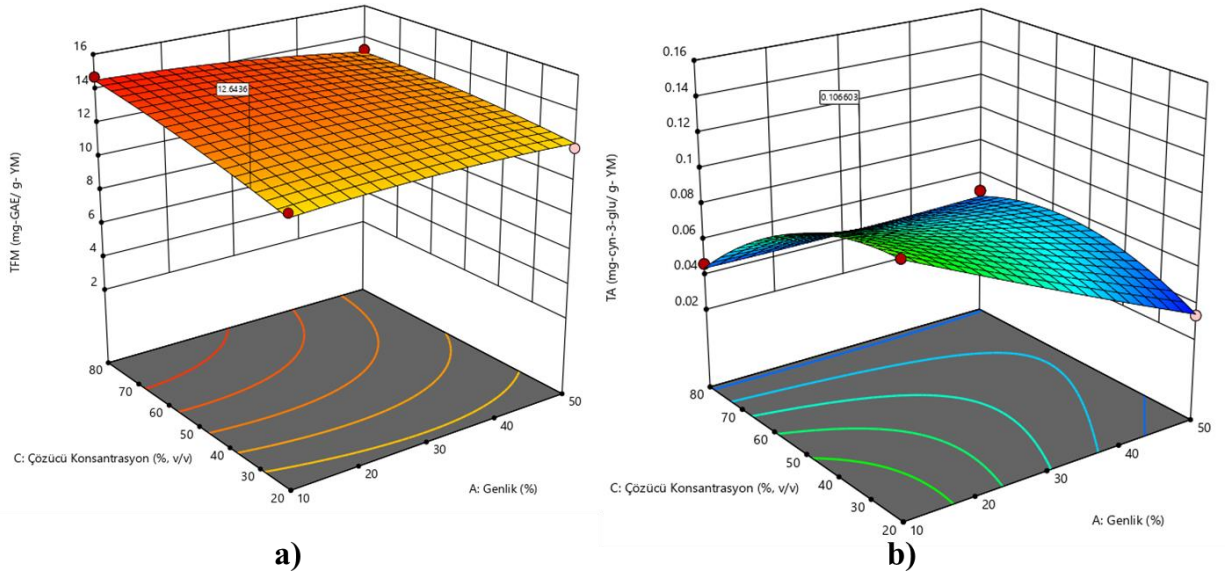


Şekil 4.34: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, genlik değerinin katı madde miktarına (Çözücü konsantrasyonu= % 80, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

UDE yöntemi ile şeftali kabuklarının ekstraksiyonunda genliğin TFM açısından çok etkili olduğu söylenemez (Şekil 4.34a). Antosiyanin açısından bakılacak olursa, genliğin artması ile beraber verimin düzenli olarak azaldığı görülmektedir (Şekil 4.34b). Bu netice, genliğin artmasıyla (yani enerjinin artmasıyla) beraberinde sıcaklığın yükselmesi ve ısıya duyarlı antosiyaninlerin bozunması durumu olabilir. *Laminaria digitata* bitkisinin UDE ile ekstraksiyonunda ekstrakt içeriğinin antioksidan aktivite (DDPH) değeri benzer bir genlik etkisi gözlenmiştir (Garcia-Vaquero ve diğ., 2018).

Katı madde miktarının etkisine bakılacak olursa, her iki cevap değeri içinde madde miktarının artması verimi azaltan bir sonuca yol açmıştır. Numune kütlesinin artırılması, solventin numune matrisine nüfuz etmesi ve fenolikleri çözündürmesi için mevcut yüzey alanını düşürür, böylece bu hedef bileşenlerin ekstraksiyon veriminde bir azalmaya neden olur (Şahin, 2015).

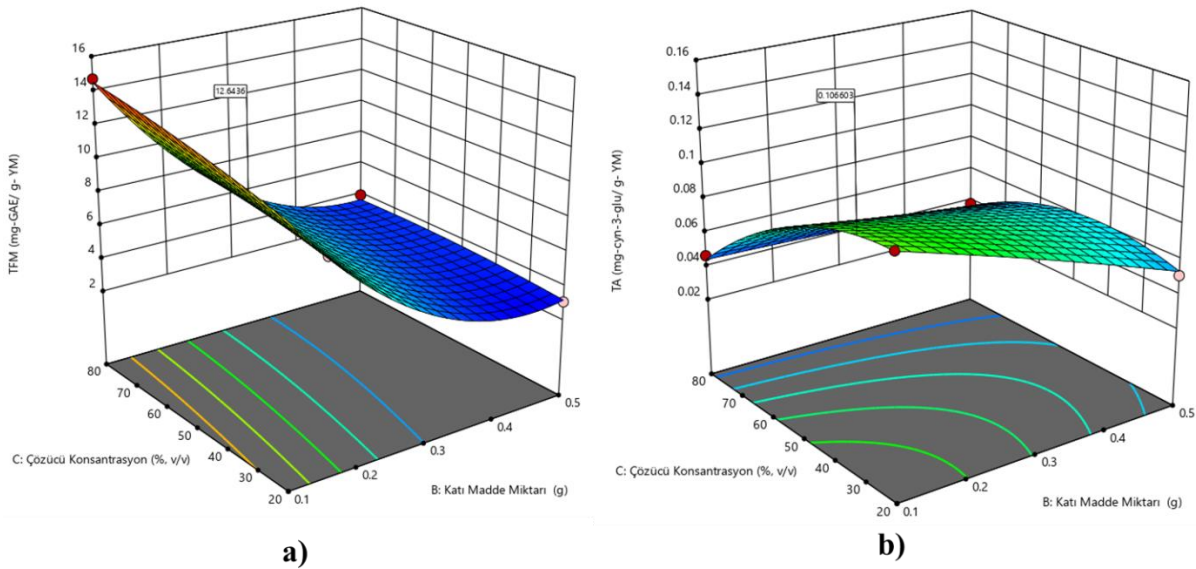
Şekil 4.35, sabit katı madde miktarında (0,1 g) genlik değeri ve EtOH konsantrasyonunun toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir.



Şekil 4.35: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, genlik değerinin çözücü konsantrasyonuna (Katı madde miktarı=0,1) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Çözücü konsantrasyonu TFM verimini hafif bir şekilde arttırmaktadır (Şekil 4.35a). Şekil 4.35b ise alkol-su karışımındaki alkol oranının artmasının başlangıçta pozitif bir tepkiye yol açtığını, alkolü arttırmaya devam ettikçe ise etkinin olumsuz bir duruma yola açtığını göstermektedir. Bu durumun sebebi alkol oranının artmasının alkolün antosiyaninler üzerinde bir denatürasyon etkisi göstermesinin bir sonucu olabilir. Benzer bir durumu Ilaiyaraja ve diğ. de gözlemlemiştir (Ilaiyaraja ve diğ., 2015). *Feronia limonia* olarak bilinen tropik bir meyveden biyolojik olarak aktif bileşenleri sulu etanol ile ekstrakte ederken etanol konsantrasyonunu arttırdıklarında başlangıçta verimde bir artış gözlemlemişlerdir. Alkol oranını %70'in üzerine çıkardıklarında ise ekstrakt veriminin azalmaya başladığını raporlamışlardır.

Şekil 4.36, sabit genlik değerinde (%26,6) katı madde miktarı ve EtOH konsantrasyonunun toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Katı madde miktarı ve çözücü konsantrasyonunun, UDE sistemi üzerine etkilerini Şekil 4.36' da sergilemektedir.



Şekil 4.36: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının çözücü konsantrasyonuna (Genlik= % 26,6) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

4.2.3.2. Modelleme

UDE yöntemi ile şeftali kabuklarından TFM ve TA açısından zengin ekstrakt elde ederken de ANOVA tablosu üretilmiştir. Tablo 4.43 ve 4.44, YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak UDE ile şeftali kabuklarından TFM ve TA ekstraksiyonu için hesaplanmış olan ANOVA test

sonuçlarını göstermektedir. Her iki cevap değeri için üretilmiş olan ikinci dereceden polinom denklemler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$).

Tablo 4.43: UDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.

TFM	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	237,73	9	26,41	147,21	< 0,0001	önemli
A-Genlik	0,5057	1	0,5057	2,82	0,1241	
B-Katı Madde Miktarı	194,19	1	194,19	1082,23	< 0,0001	
C-Çözücü Konsantrasyonu	1,09	1	1,09	6,10	0,0331	
AB	2,46	1	2,46	13,70	0,0041	
AC	1,14	1	1,14	6,35	0,0304	
BC	1,97	1	1,97	11,00	0,0078	
A²	0,1511	1	0,1511	0,8421	0,3804	
B²	23,92	1	23,92	133,28	< 0,0001	
C²	0,1243	1	0,1243	0,6926	0,4247	
Kalıntı	1,79	10	0,1794			
Uyum Eksikliği	1,46	5	0,2918	4,35	0,0662	önemsiz
Saf Hata	0,3353	5	0,0671			

Tablo 4.44: UDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.

TA	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	0,0163	9	0,0018	28,78	< 0,0001	önemli
A-Genlik	0,0015	1	0,0015	24,07	0,0006	

Tablo 4. 44 (devam):

B-Katı Madde Miktarı	0,0021	1	0,0021	33,39	0,0002	
C-Çözücü Konsantrasyonu	0,0000	1	0,0000	0,3743	0,5543	
AB	0,0074	1	0,0074	116,93	< 0,0001	
AC	0,0029	1	0,0029	45,92	< 0,0001	
BC	0,0011	1	0,0011	17,30	0,0020	
A²	2,238E-06	1	2,238E-06	0,0355	0,8543	
B²	4,327E-06	1	4,327E-06	0,0686	0,7987	
C²	0,0007	1	0,0007	11,23	0,0073	
Kalıntı	0,0006	10	0,0001			
Uyum Eksikliği	0,0002	5	0,0000	0,3880	0,8389	önemsiz
Saf Hata	0,0005	5	0,0001			

Eşitlik (4.11) ve (4.12), sırasıyla TFM ve TA için kodlanmış faktörler açısından Design-Expert tarafından türetilmiş olan son denklemleri vermektedir:

$$\text{TFM} \quad 6,07 + 0,2249 A - 4,41 B + 0,3309 C + 0,5543 AB - 0,3774 AC - 0,4966 BC - 0,2344 A^2 + 2,95 B^2 - 0,2126 C^2 \quad (4.11)$$

$$\text{TA} \quad 0,0892 + 0,0123 A + 0,0145 B - 0,0015 C + 0,0304 AB + 0,0190 AC + 0,0117 BC + 0,0009 A^2 - 0,0013 B^2 - 0,0160 C^2 \quad (4.12)$$

F ve p değerleri incelendiğinde, model denklemlerin her iki cevap değeri için de istatistiksel olarak önemli olduğu söylenebilir (Tablo 4.43 ve 4.44). TFM açısından bakıldığında, enerjinin genliği hariç çözücü konsantrasyonu ve ekstrakte edilecek madde miktarı istatistiksel olarak etkili parametreler olarak gözlenmiştir (Tablo 4.43). Kabukların miktarı en etkili bağımsız değişkendir ($p < 0,0001$). Ayrıca, tüm bağımsız değişkenlerin birbiriyle etkileşimleri (AB, AC ve BC) de yine istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Parametrelerin ikinci

dereceden kuvvetlerinin etkisi incelendiğinde ise sadece katı madde miktarının ikinci dereceden kuvveti etkilidir ($p < 0,0001$).

Tablo 4.44' te de görüldüğü üzere EtOH konsantrasyonu hariç seçilmiş olan tüm parametreler istatistiksel açıdan etkili parametreler olarak gözlenmiştir. Ayrıca, tüm etkileşimler ve EtOH konsantrasyonunun ikinci dereceden kuvveti de yine istatistiksel açıdan sistem üzerinde etkili görülmüştür.

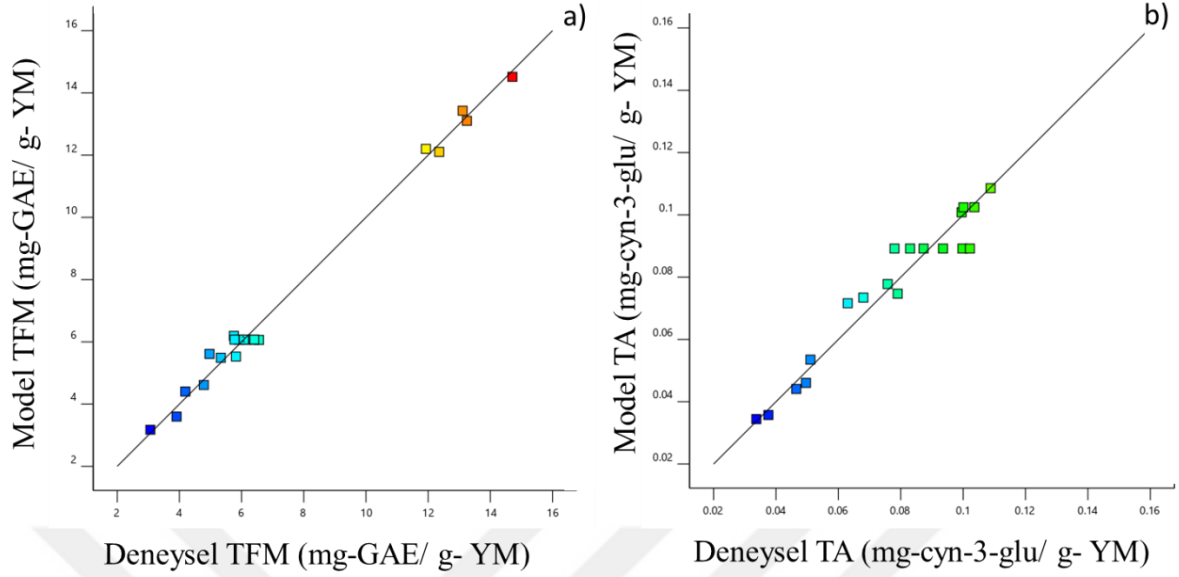
Diğer taraftan, uyum eksikliği değeri her iki cevap değeri için p , 0,05'ten büyük hesaplanmış ve bu durum da kullanılan modellerin veriler için uygun olduğunu desteklemektedir.

Tablo 4.45 ise her iki cevap değeri için SD, R^2 , R^2_a , R^2_t ve CV değerlerini göstermektedir. Yüksek belirleme katsayılarına ($> 0,96$) bağlı olarak, cevap değerlerindeki toplam varyasyonun sadece ~% 4' ünün türetilen denklemler ile açıklanamayacağı sonucuna varabiliriz. Ayrıca, R^2_a , R^2_t ile makul bir uyum içindedir. CV değeri de oldukça tatmin edici olarak hesaplanmıştır ($< \% 10$).

Tablo 4.45: UDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.

Cevap Değişkeni	SD	R^2	R^2_a	R^2_t	CV
TFM(mg-GAE/ g-YM)	0,4236	0,9925	0,9858	0,9443	5,78
TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,0079	0,9628	0,9294	0,8918	9,80

ANOVA bulgularına dayanarak, her iki sistem (TFM ve TA) için de deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında tatmin edici bir ilişki olduğu söylenebilir (Şekil 4.37).



Şekil 4.37: Şeftali kabuklarına uygulanan UDE yöntemi ile elde edilen a) model TFM ile deneyisel TFM b) model TA ile deneyisel TA arasındaki korelasyon.

4.2.3.3. Optimizasyon ve Validasyon

Şeftali kabuklarından UDE yöntemi ile ekstrakt eldesinde YMK tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek TFM (12,64 mg-GAE/ g-YM) ve TA (0,107 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları Tablo 4.46 ile verilmektedir. Yapılan validasyon çalışması ile optimum koşulların doğrulanması da test edilmiştir. Deneyisel ve hesaplanan sonuçlar arasındaki kalıntının kabul edilebilir olması da modelin söz konusu sistemler için uygun olduğunu desteklemektedir (Tablo 4.46).

Tablo 4.46: Şeftali kabuklarının UDE için optimum koşullar ve validasyon.

Optimum Ekstraksiyon Koşulları			Parametre	Öngörülen Sonuç	Deneyisel Sonuç	Hata Oranı (%)
A (%)	B (g)	C (% v/v)	TFM (mg-GAE/ g-YM)	12,64	13,03±0,001	2,99
10	0,1	30,3	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,107	0,112±0,002	4,46

4.2.4. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon

4.2.4.1. Proses Parametrelerinin Etkisi

Şeftali kabuklarından homojenizatör destekli ekstraksiyon yöntemi ile fenolik ve antosiyaninlerce zengin ekstrakt elde ederken Yüzey Merkezli Kompozit ile tasarlanan deneysel plan, Tablo 4.47 ile verilmektedir. Design-Expert YMK tasarımına dayanarak, ilgili sistem için 5 merkez noktası (0,3 g yaş şeftali kabuğu, 8000 rpm, 75 s ekstraksiyon süresi ve % 50 etanol çözeltisi) ile 30 deneysel çalışma üretmiştir.

Tablo 4.47: Şeftali kabuklarına uygulanan HDE metodunun deneysel tasarımı.

Deney No	Katı Madde Miktarı (g)	Karıştırma Hızı (rpm)	Ekstraksiyon Süresi (s)	Çözücü Konsantrasyonu (% v/v)
1	0,1	8000	75	50
2	0,3	8000	60	50
3	0,3	10000	75	50
4	0,5	10000	90	80
5	0,5	6000	90	20
6	0,5	10000	90	20
7	0,3	8000	90	50
8	0,3	8000	75	50
9	0,1	10000	90	80
10	0,5	8000	75	50
11	0,5	6000	60	80
12	0,5	6000	60	20
13	0,3	8000	75	20
14	0,5	6000	90	80
15	0,1	6000	90	20
16	0,3	8000	75	50
17	0,1	6000	60	20

Tablo 4. 47 (devam):

18	0,1	6000	60	80
19	0,3	8000	75	50
20	0,5	10000	60	20
21	0,3	8000	75	50
22	0,1	10000	60	80
23	0,5	10000	60	80
24	0,3	8000	75	50
25	0,3	8000	75	50
26	0,1	6000	90	80
27	0,1	10000	60	20
28	0,1	10000	90	20
29	0,3	8000	75	80
30	0,3	6000	75	50

Tablo 4.48 ise verilen şartlardaki deneysel sonuçları göstermektedir. Ayrıca, ilgili yazılım ile çizilen 3 D' ler (Şekil 4.38-4.41), proses parametrelerinin etkisini görsel olarak sunmaktadır.

Tablo 4.48: Şeftali kabuklarına uygulanan HDE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.

Deney No	TFM (mg-GAE/ g-YM)	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)
1	21,75±0,001 ^{a**}	1,15±0,001 ^a
2	7,32±0,001 ^b	0,62±0,002 ^b
3	10,45±0,002 ^c	1,64±0,003 ^c
4	6,47±0,001 ^d	0,77±0,002 ^d
5	8,19±0,003 ^e	1,40±0,001 ^e

Tablo 4. 48 (devam):

6	5,45±0,001 ^f	0,45±0,001 ^f
7	10,39±0,002 ^g	0,43±0,001 ^g
8	8,26±0,001 ^h	0,95±0,005 ^h
9	17,69±0,002 ⁱ	0,55±0,003 ⁱ
10	5,73±0,003 ⁱ	0,62±0,004 ^b
11	7,04±0,001 ^j	0,69±0,002 ^j
12	7,51±0,002 ^k	1,43±0,002 ^k
13	9,96±0,001 ^l	1,64±0,005 ^c
14	4,41±0,002 ^m	0,14±0,004 ^l
15	23,40±0,004 ⁿ	1,72±0,002 ^m
16	9,58±0,001 ^o	1,11±0,001 ⁿ
17	21,48±0,002 ^p	2,52±0,001 ^o
18	17,55±0,003 ^r	0,94±0,003 ^p
19	9,58±0,002 ^o	1,11±0,001 ⁿ
20	4,56±0,001 ^s	0,33±0,002 ^r
21	9,26±0,001 ^s	1,06±0,001 ^s
22	20,68±0,002 ^t	1,30±0,003 [§]
23	6,83±0,002 ^u	0,87±0,001 ^t
24	9,17±0,002 ^v	1,04±0,001 ^u
25	8,42±0,002 ^y	1,02±0,002 ^v
26	14,86±0,004 ^z	0,05±0,001 ^y
27	23,39±0,003 ^x	1,59±0,002 ^z

Tablo 4. 48 (devam):

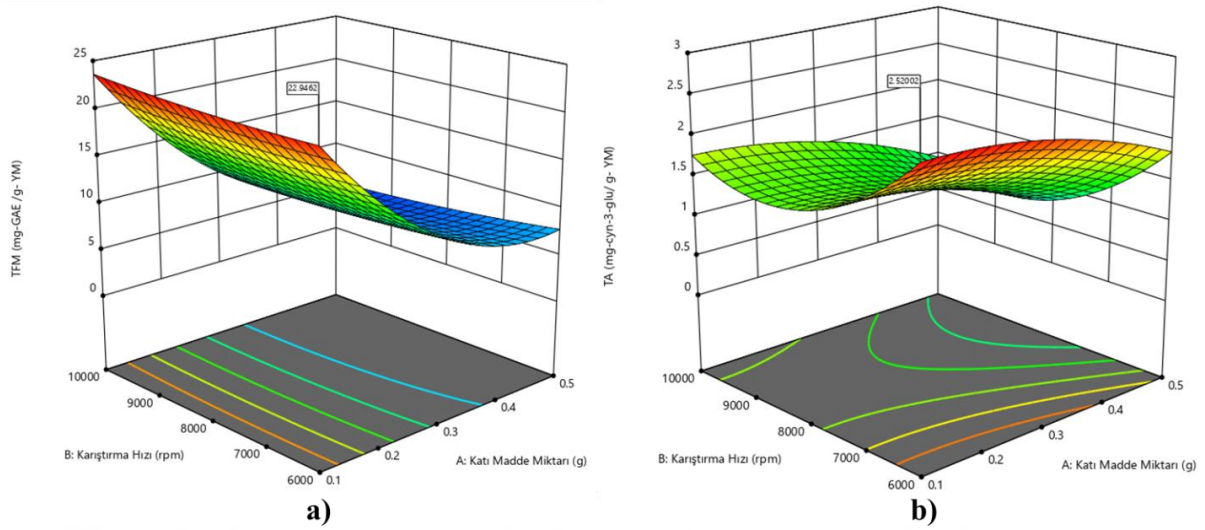
28	23,25±0,001 ^q	1,10±0,003 ^x
29	6,48±0,001 ^w	0,67±0,003 ^q
30	8,14±0,001 ^ü	1,71±0,001 ^w

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

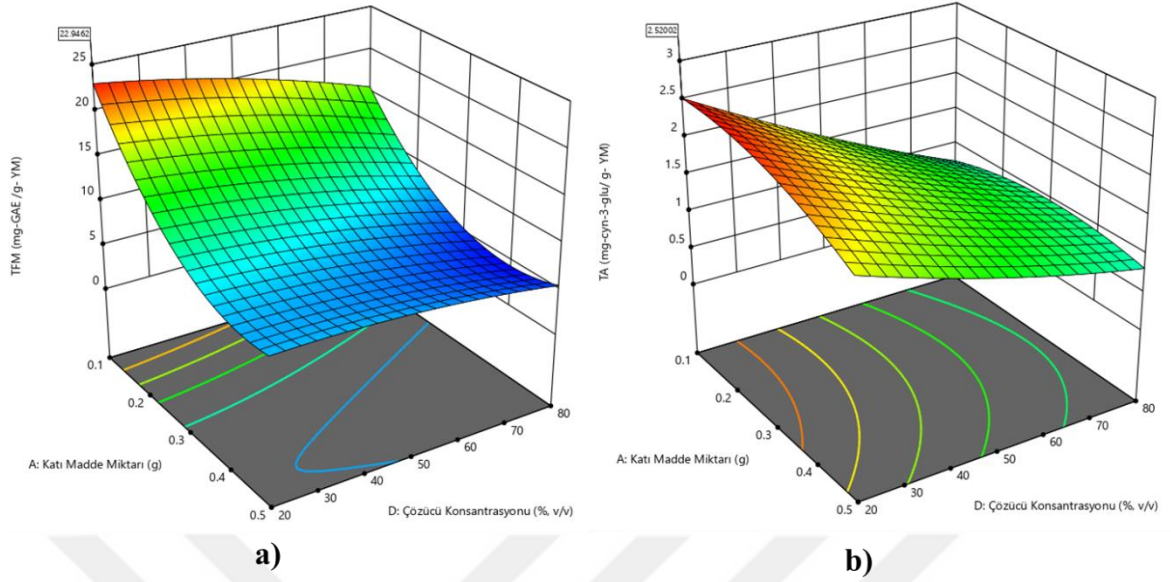
Çeşitli koşullarda HDE ile ekstrakte edilen şeftali kabuklarının içeriklerine bakıldığında, toplam fenolik madde miktarının gram yaş malzeme başına 4,41 ile 23,40 mg-GAE arasında değiştiği görülmektedir (Tablo 4.48). Toplam antosiyanin içeriğinin ise 0,05 ile 1,72 mg-cyn-3-glu/ g-YM arasında değerler aldığı gözlenmiştir.

Şekil 4.38, sabit bazı değerlerde (ekstraksiyon süresi= 80 s, çözücü konsantrasyonu= % 20, v/v) katı madde miktarı ve karıştırma hızının toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Fenolik madde açısından bakıldığında, verimin katı madde miktarının artması ile azaldığını görmekteyiz (Şekil 4.38a). Zira solvent miktarının sabit kalması ve buna rağmen ekstrakte edilecek madde miktarının artması, ekstraksiyon verimini azaltıcı bir durumdur. Çünkü kütle iletimi konsantrasyon gradientinin tersi yönünde ilerler. Benzer şekilde Garrido ve diğ. de üzümünden doğal antioksidanları MDE ile ekstrakte ederken katı madde miktarını proses parametresi olarak incelemişler ve aynı tepkiyi kaydetmişlerdir (Garrido ve diğ., 2019). Şekil 4.38b'de ise TA veriminin aynı etkiye nasıl tepki verdiğini göstermektedir. 3D'den de görüldüğü gibi TFM kadar keskin bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.38: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, karıştırma hızına (Ekstraksiyon süresi= 80 s, çözücü konsantrasyonu= % 20, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

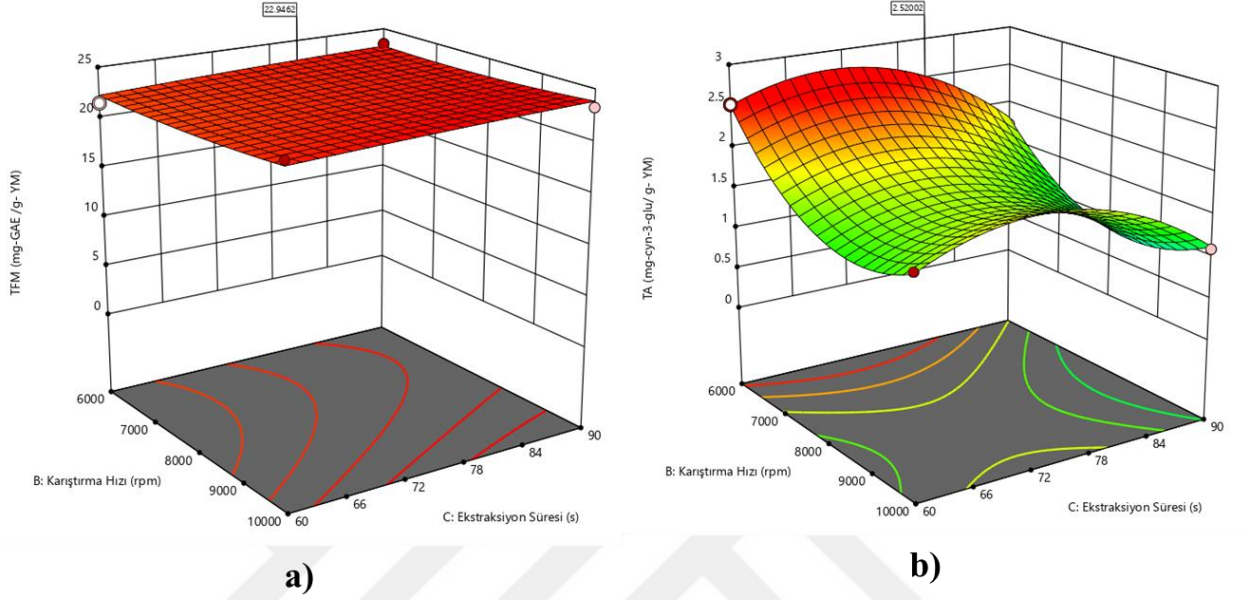
Şekil 4.39, sabit bazı değerlerde (ekstraksiyon süresi= 80 s, karıştırma hızı= 6000 rpm) katı madde miktarı ve çözücü konsantrasyonunun toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Ekstrakte edilen madde miktarının artmasıyla beraber verimdeki azalış bu görsellerde de gözlenmiştir. EtOH konsantrasyonunun TFM verimine etkisi çok belirgin olmamakla beraber (Şekil 4.39a), TA açısından baktığımızda etanol oranının artması verimi hafif bir şekilde azaltmıştır. Bu durum solvent sisteminin polaritesi ile açıklanabilir. Şöyle ki etanol-su karışımının içerisindeki su miktarı arttıkça solvent sisteminin polaritesi de artmaktadır. Zira suyun polaritesi etanole göre yüksektir. Dolayısıyla sulu alkol içerisindeki su oranının artması ile polar antosiyaninlerin ekstraksiyonunun artması (Şekil 4.39b) beklenilebilen bir durumdur (Shirzad ve diğ., 2017).



Şekil 4.39: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, çözücü konsantrasyonuna (Ekstraksiyon süresi= 80 s, karıştırma hızı= 6000 rpm) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

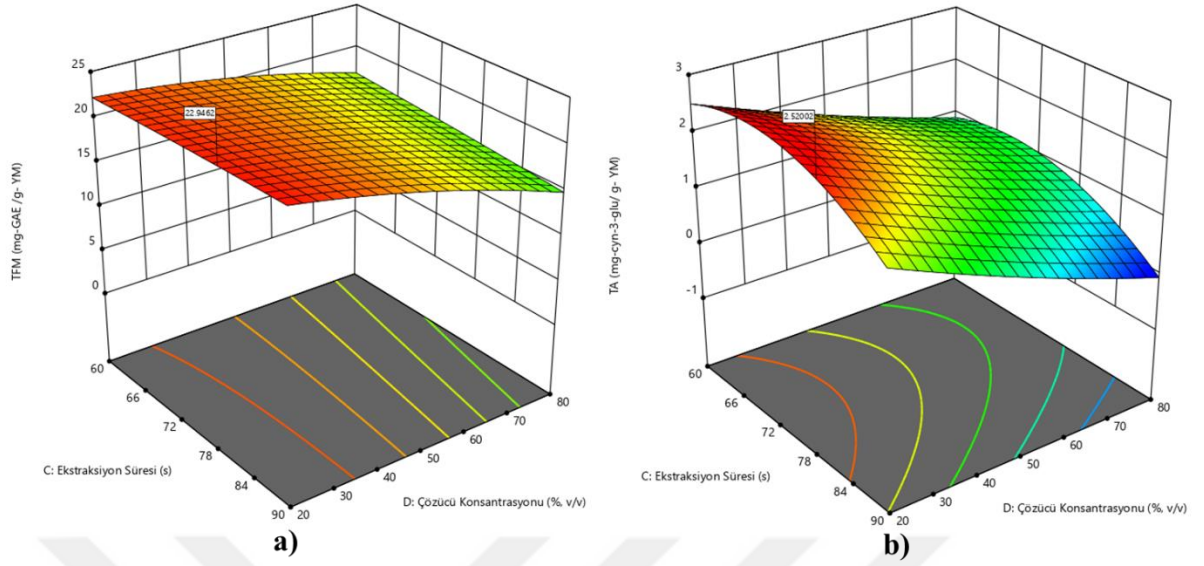
Şekil 4.40, sabit bazı değerlerde (çözücü konsantrasyonu= %20, v/v, katı madde miktarı=0,1 g) karıştırma hızı ve sürenin toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Karıştırma hızı ve ekstraksiyon süresinin TFM üzerinde çok etkili olmadığı görülmektedir (Şekil 4.40a). Pandey ve diğ. de UDE yöntemi ile *Rheum moorcroftianum* rizomlarından fenolik antioksidanları elde ederken de zamanın ekstraksiyon verimi üzerinde önemli bir etki göstermediğini raporlamışlardır (Pandey ve diğ., 2018). TA açısından baktığımızda belirgin bir etki söz konusudur (Şekil 4.40b). Beklenildiği gibi, çözücünün çözünen maddeyi özütleme süresinin uzatılması, verimin artmasına neden olmuştur. Belirli bir süre sonra (~80 saniye sonra) verimin düşmeye geçmesi, ortamın uzun süre karıştırma işlemine maruz kalması sonucu ısınması ve ısıya duyarlı antosiyaninlerin bozunması durumuyla açıklanabilir. Benzer bir eğilimi Ghafoor ve diğ. de gözlemlemiştir (Ghafoor ve diğ., 2009). Üzüm çekirdeklerinden antosiyanin ekstrakte ederken UDE yöntemini kullanarak etanol-su sistemini solvent olarak kullanmışlar ve zamanın belirli bir değere kadar olumlu etkisini ardından verimi düşüren bir etkiye bıraktığını kaydetmişlerdir. Diğer taraftan, karıştırma hızının artması belirli bir değere kadar (yaklaşık 8000 rpm) TA verimini düşürmüştü, ardından verim artmaya başlamıştır (Şekil 4.40b). Kurtulbaş ve diğ. de mandalina ve greyfurt kabuklarından biyolojik olarak aktif bileşenleri HDE yöntemiyle sulu alkol çözeltisi kullanarak ekstrakte ederken benzer bir profil gözlemlemiştir (Kurtulbaş ve diğ., 2019). Bu durumu,

biyoaktif maddeleri parçalayan enzimlerin bozunarak bu biyoaktif maddelerin çökmesine neden olması ile açıklamışlardır.



Şekil 4.40: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, karıştırma hızının, ekstraksiyon süresine (Çözücü konsantrasyonu= %20, v/v, katı madde miktarı=0,1 g) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Şekil 4.41, sabit bazı değerlerde (karıştırma hızı= 6000 rpm, katı madde miktarı=0,1 g) EtOH konsantrasyonu ve sürenin toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Her iki HDE proses parametresinin bu sistemler üzerindeki etkileri yukarıda detaylı olarak açıklanmıştı. Benzer cevap değerlerinin söz konusu bağımsız faktörlere gösterdikleri tepkiler Şekil 4.41’ de de görülmektedir.



Şekil 4.41: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, ekstraksiyon süresinin, çözücü konsantrasyonuna (Karıştırma hızı= 6000 rpm, katı madde miktarı=0,1 g) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

4.2.4.2. Modelleme

HDE yöntemi ile şeftali kabuklarından TFM ve TA açısından zengin ekstrakt elde ederken türetilen ANOVA tabloları Tablo 4.49 ve 4.50 ile verilmiştir. YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak HDE ile şeftali kabuklarından TFM ve TA ekstraksiyonu için hesaplanmış olan ANOVA test sonuçlarını göstermektedir. Her iki cevap değeri için üretilmiş olan ikinci dereceden polinom denklemler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$).

Tablo 4.49: HDE yöntemi kullanılarak şeftali yapraklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.

TFM	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	1139,71	14	81,41	81,17	< 0,0001	önemli
A- Katı Madde Miktarı	908,26	1	908,26	905,65	< 0,0001	
B- Karıştırma Hızı	2,13	1	2,13	2,13	0,1652	

Tablo 4.50 (devam):

C- Süre	0,2796	1	0,2796	0,2788	0,6052	
D-Çözücü Konsantrasyonu	35,29	1	35,29	35,19	< 0,0001	
AB	8,36	1	8,36	8,34	0,0113	
AC	0,3829	1	0,3829	0,3818	0,5459	
AD	24,43	1	24,43	24,36	0,0002	
BC	0,0012	1	0,0012	0,0012	0,9732	
BD	8,60	1	8,60	8,58	0,0104	
CD	9,03	1	9,03	9,01	0,0090	
A²	59,37	1	59,37	59,20	< 0,0001	
B²	0,3040	1	0,3040	0,3031	0,5900	
C²	0,0268	1	0,0268	0,0267	0,8723	
D²	1,41	1	1,41	1,40	0,2549	
Kalıntı	15,04	15	1,00			
Uyum Eksikliği	13,40	10	1,34	4,08	0,0671	önemsiz
Saf Hata	1,64	5	0,3286			

Tablo 4.51: HDE yöntemi kullanılarak şeftali yapraklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.

TA	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	8,34	14	0,5956	61,68	< 0,0001	önemli
A- Katı Madde Miktarı	0,9890	1	0,9890	102,41	< 0,0001	

Tablo 4.50 (devam):

B- Karıştırma Hızı	0,2205	1	0,2205	22,84	0,0002	
C- Süre	0,7578	1	0,7578	78,47	< 0,0001	
D-Çözücü Konsantrasyonu	2,14	1	2,14	221,30	< 0,0001	
AB	0,0187	1	0,0187	1,94	0,1844	
AC	0,3456	1	0,3456	35,78	< 0,0001	
AD	0,5471	1	0,5471	56,65	< 0,0001	
BC	0,0689	1	0,0689	7,13	0,0175	
BD	1,74	1	1,74	179,72	< 0,0001	
CD	0,0737	1	0,0737	7,63	0,0145	
A²	0,0958	1	0,0958	9,92	0,0066	
B²	0,9256	1	0,9256	95,85	< 0,0001	
C²	0,7993	1	0,7993	82,77	< 0,0001	
D²	0,0155	1	0,0155	1,60	0,2248	
Kalıntı	0,1449	15	0,0097			
Uyum Eksikliği	0,1265	10	0,0126	3,44	0,0928	önemsiz
Saf Hata	0,0184	5	0,0037			

Eşitlik (4.13) ve (4.14), sırasıyla TFM ve TA için kodlanmış faktörler açısından Design-Expert tarafından türetilmiş olan son denklemleri vermektedir:

$$\begin{aligned} \text{TFM} \quad & 9,00 - 7,10A + 0,3444 B - 0,1246 C - 1,40 D - 0,7230 AB + \quad (4.13) \\ & 0,1547 AC + 1,24 AD + 0,0085 BC + 0,7331BD - 0,7513 CD \\ & + 4,79 A^2 + 0,3426 B^2 - 0,1017 C^2 - 0,7365D^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{TA} \quad & 1,06 - 0,2344 A - 0,1107 B - 0,2052 C - 0,3446 D - 0,0342 \quad (4.14) \\ & AB + 0,1470 AC + 0,1849 AD + 0,0656 BC + 0,3293 BD - \\ & 0,0679 CD - 0,1923 A^2 + 0,5977 B^2 - 0,5554 C^2 + 0,0773D^2 \end{aligned}$$

Şeftali kabuklarının HDE ile ekstraksiyon prosesinde seçilmiş olan bağımsız parametreler içerisinde TFM açısından en önemli parametre ekstrakte edilecek madde miktarıdır ($p < 0,0001$). Bunu çözücü konsantrasyonu takip etmiştir (Tablo 4.49). Ekstraksiyon süresi ve karıştırma hızı istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$). Diğer taraftan katı madde miktarı ile ekstraksiyon süresi arasındaki etkileşim hariç tüm bağımsız değişkenler arasındaki etkileşimler yine etkindir ($p < 0,05$). Katı madde miktarının ikinci dereceden kuvveti de söz konusu sistem için önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$).

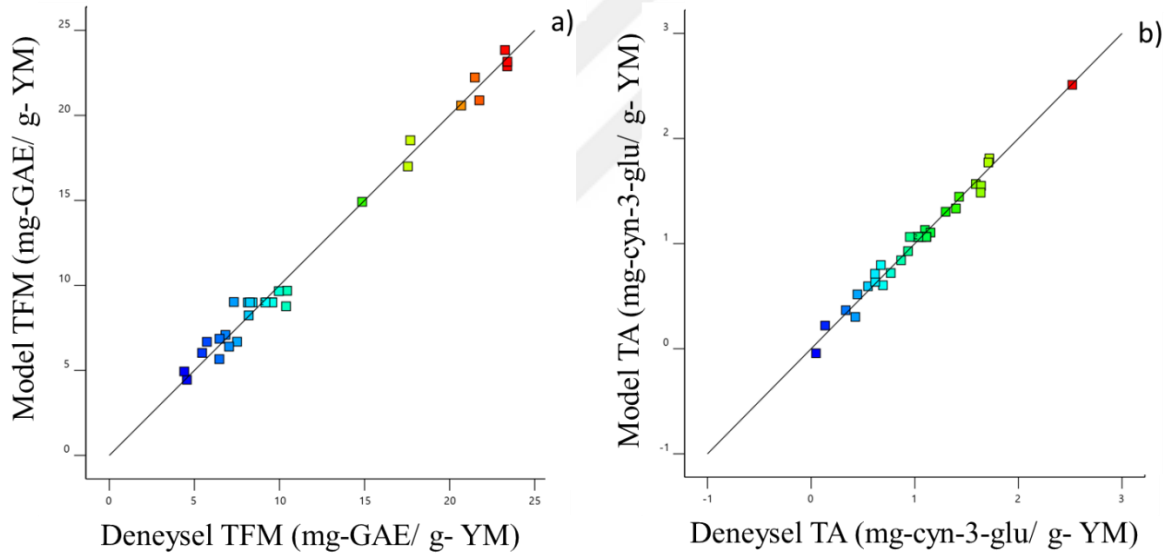
TA verimi açısından HDE sistemini tüm parametreler etkilemiştir (Tablo 4.50). Bunlar arasında en önemli parametre EtOH konsantrasyonu bulunmuştur ve bunu sırasıyla katı madde miktarı ve ekstraksiyon süresi takip etmiştir ($p < 0,0001$). Katı madde miktarı ile karıştırma hızı arasındaki etkileşim ve EtOH konsantrasyonunun ikinci dereceden kuvveti hariç tüm etkileşimler ve ikinci dereceden kuvvetler de söz konusu sistem için istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.51 ise her iki cevap değeri için SD, R^2 , R^2_a , R^2_t ve CV değerlerini göstermektedir. Yüksek belirleme katsayılarına ($> 0,98$) bağlı olarak, cevap değerlerindeki toplam varyasyonun sadece ~% 2' sinin türetilen denklemler ile açıklanamayacağı sonucuna varabiliriz. CV değeri de oldukça tatmin edici olarak hesaplanmıştır ($< \% 10$). Diğer taraftan, R^2_a R^2_t ile makul bir uyum içindedir ki bu da tatmin edici bir durumdur.

Tablo 4.52: HDE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.

Cevap Değişkeni	SD	R ²	R ² _a	R ² _t	CV
TFM(mg-GAE/ g-YM)	1,00	0,9870	0,9748	0,9350	8,65
TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,0983	0,9829	0,9670	0,9139	9,63

ANOVA bulgularına dayanarak, her iki sistem (TFM ve TA) için de deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında tatmin edici bir ilişki olduğu söylenebilir (Şekil 4.42).



Şekil 4.42: Şeftali kabuklarına uygulanan HDE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.

4.2.4.3. Optimizasyon ve Validasyon

Tablo 4.52, YMK tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, şeftali kabuklarından en yüksek TFM (22,94 mg-GAE/ g-YM) ve TA (2,52 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi HDE proses şartlarını vermektedir. Sistem

tarafından türetilen en iyi ekstraksiyon koşullarında deneysel olarak da çalışma yürütülmüş ve koşulların doğrulanması test edilmiştir. Uygulanan validasyon çalışmasının sonucuna göre, deneysel ve hesaplanan sonuçlar arasındaki kalıntının kabul edilebilir olması modelin söz konusu sistemler için uygun olduğunu desteklemektedir.

Tablo 4.53: Şeftali kabuklarının HDE için optimum koşullar ve validasyon.

Optimum Ekstraksiyon Koşulları				Parametre	Öngörülen Sonuç	Deneysel Sonuç	Hata Oranı (%)
A (g)	B (rpm)	C (s)	D (% v/v)	TFM (mg-GAE/ g-YM)	22,94	20,55±0,003	1,89
0,1	6000	80,2	20,00	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	2,52	2,47±0,001	1,98

4.2.5. Otomatik Çözücü Ekstraksiyonu

4.2.5.1. Proses Parametrelerinin Etkisi

Şeftali kabuklarından otomatik çözücü ekstraksiyon yöntemi kullanılarak fenolik ve antosiyaninlerce zengin ekstrakt eldesinde, Tablo 4.53 Yüzey Merkezli Kompozit ile tasarlanan mevcut çalışmanın deneysel planını göstermektedir. Tablo 4.53’ te görüldüğü gibi, Design-Expert ilgili OÇE sistemi için 5 merkez noktası (20 dk daldırma süresi, 50 dk yıkama süresi, 0,3 gram örnek ve % 50 etanol çözeltisi) ile 30 deneysel çalışma üretmiştir. Tablo 4.54 ise verilen şartlardaki deneysel sonuçları göstermektedir. Ayrıca, ilgili yazılım ile çizilen üç boyutlu grafikler (Şekil 4.42-4.45), proses parametrelerinin etkisini görsel olarak sunmaktadır.

Tablo 4.54: Şeftali kabuklarına uygulanan OÇE metodunun deneysel tasarımı.

Deney No	Daldırma Süresi (dk)	Yıkama Süresi (dk)	Katı Madde Miktarı (g)	Çözücü Konsantrasyonu (%, v/v)
1	20	50	0,3	20
2	20	50	0,3	50
3	10	60	0,5	20
4	20	40	0,3	50
5	20	50	0,3	50
6	20	50	0,3	50
7	30	60	0,5	20
8	10	40	0,1	80
9	30	40	0,1	20
10	10	40	0,5	20
11	20	50	0,3	50
12	10	60	0,1	20
13	30	40	0,1	80
14	10	60	0,5	80
15	20	50	0,3	50
16	10	50	0,3	50
17	20	50	0,1	50
18	20	50	0,5	50
19	30	50	0,3	50
20	30	40	0,5	20
21	30	60	0,5	80
22	20	50	0,3	80
23	10	60	0,1	80
24	10	40	0,1	20
25	30	60	0,1	80

Tablo 4.55 (devam):

26	20	50	0,3	50
27	20	60	0,3	50
28	30	40	0,5	80
29	10	40	0,5	80
30	30	60	0,1	20

OÇE yöntemi ile şeftali kabuklarından biyoaktif bileşenlerce zengin ekstrakt eldesinde uygulanan koşullara bağlı olarak, toplam fenolik madde miktarı gram yaş malzeme başına 8,24 ile 114,94 mg-GAE arasında değişmektedir (Tablo 4.54). OÇE ile elde edilen şeftali kabuğu ekstraktlarının toplam antosiyanin içeriği ise 0,36 ile 7,45 mg-cyn-3-glu/ g-YM arasında değerler almıştır.

Tablo 4.56: Şeftali kabuklarına uygulanan OÇE metodunun TFM ve TA değerleri açısından deneysel sonuçları*.

Deney No	TFM (mg-GAE/ g-YM)	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)
1	41,35±0,001 ^{a**}	3,45±0,001 ^a
2	47,83±0,002 ^b	2,65±0,002 ^b
3	28,85±0,001 ^c	1,21±0,001 ^c
4	31,26±0,003 ^d	0,86±0,001 ^d
5	49,42±0,001 ^e	2,82±0,002 ^e
6	48,46±0,002 ^f	2,78±0,001 ^f
7	20,08±0,001 ^g	0,47±0,002 ^g
8	100,13±0,000 ^g	6,32±0,001 ^h
9	67,12±0,001 ^h	1,81±0,003 ⁱ
10	32,62±0,001 ⁱ	1,73±0,000 ⁱ

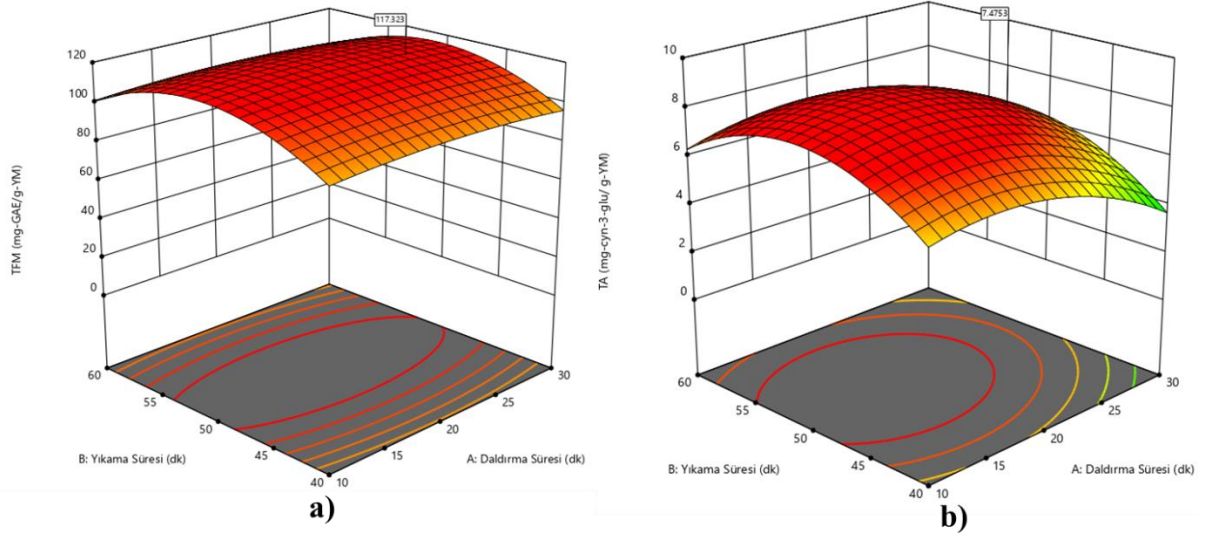
11	41,25±0,002 ⁱ	2,67±0,001 ^j
12	64,78±0,003 ^j	4,70±0,001 ^k
13	107,12±0,001 ^k	4,70±0,002 ^k
14	31,43±0,002 ^l	1,12±0,001 ^l
15	45,42±0,004 ^m	2,32±0,001 ^m
16	45,13±0,003 ⁿ	2,13±0,004 ⁿ
17	102,36±0,001 ^o	6,52±0,001 ^o
18	48,12±0,002 ^p	2,91±0,002 ^p
19	49,53±0,001 ^r	1,12±0,001 ^l
20	17,10±0,002 ^s	0,24±0,001 ^r
21	8,24±0,001 ^s	0,46±0,003 ^s
22	66,33±0,004 ^t	5,05±0,001 ^t
23	114,94±0,001 ^u	7,45±0,001 ^u
24	57,15±0,003 ^ü	4,40±0,002 ^v
25	102,24±0,002 ^v	5,99±0,004 ^y
26	43,21±0,001 ^y	2,60±0,001 ^z
27	33,65±0,001 ^z	0,97±0,003 ^q
28	16,19±0,002 ^q	0,36±0,001 ^w
29	43,90±0,001 ^w	2,56±0,002 ^x
30	76,12±0,001 ^x	3,92±0,001 ^ç

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

Şekil 4.43, sabit bazı değerlerde (katı madde miktarı= 0,11 g, çözücü konsantrasyonu= %75, v/v) daldırma ve yıkama sürelerinin toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine

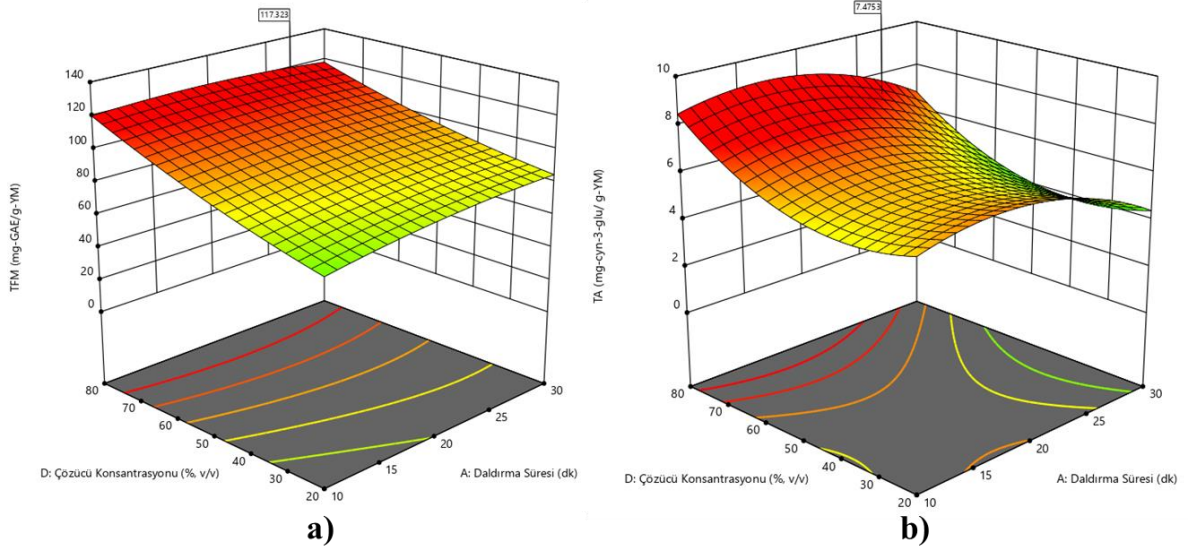
etkilerini göstermektedir. Otomatik solvent ekstraksiyonu, daldırma, uzaklaştırma, yıkama, geri kazanım ve soğutma gibi 5 adımdan oluşur. Daldırma, bu yöntemin ilk adımıdır. Daldırma adımı, numune, etkili bir ekstraksiyon işlemi için kaynayan çözücüye daldırılır. Bu süre OÇE sistemini etkileyen önemli bir proses parametresidir. Yıkama ve daldırma sürelerinin özellikle TA cevap değeri için kuadratik bir etkide bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.43b). Her iki parameter de belirli bir değere kadar verimleri arttırmış, belirli bir değerden sonra ise süreç ekstaksiyon aleyhine dönmüştür. Bu durum daha önce de (vişne kabuklarının OÇE ile ekstraksiyonu) açıklandığı gibi uzun ekstaksiyon sürelerinin ısıya fazla maruz kalma sonucu ısıya duyarlı biyoaktif bileşenler olan antosiyanin ve polifenollerin degradasyona uğraması ve verimin düşmesidir (Yolmeh ve diğ., 2014).



Şekil 4.43: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, yıkama süresinin, daldırma süresine (Katı madde miktarı= 0,110 g, çözücü konsantrasyon = %75, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

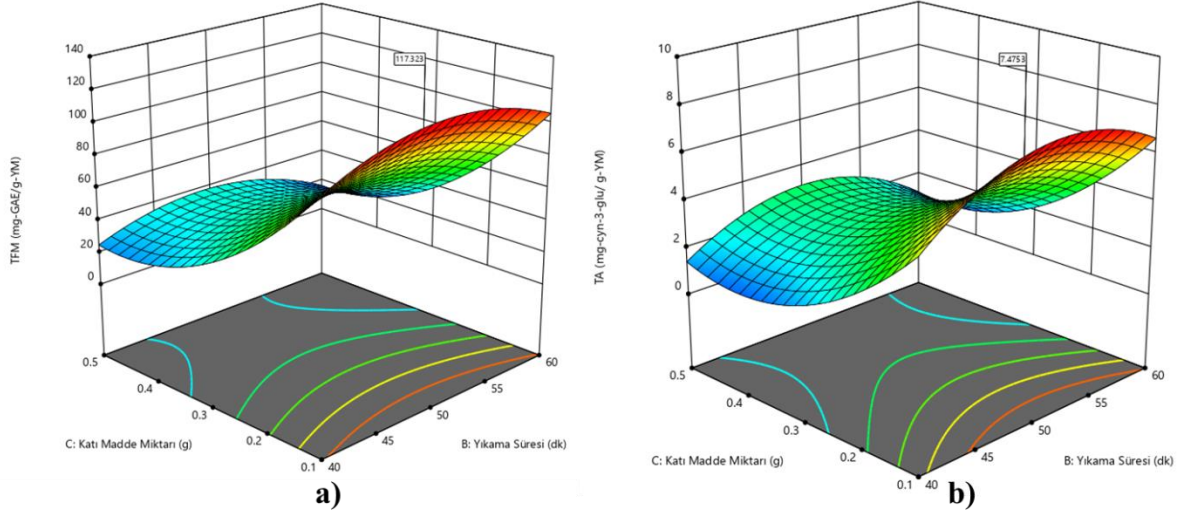
Şekil 4.44, sabit bazı değerlerde (katı madde miktarı=0,11 g, yıkama süresi =48,5 dk) daldırma süresi ve çözücü konsantrasyonunun toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. EtOH konsantrasyonunun TFM üzerinde düzenli olarak artan bir etki gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.44a). Şekil 4.44b incelendiğinde, solvent içerisindeki alkol oranının artması ile ekstraktın TA bileşiminin önce hafifçe bir düşüşe, ardından hızlı bir yükselişe geçtiği görülmektedir. Bu durum yukarıda alkolün antiseptik özelliğinin etkisi olduğu

ile açıklanmıştı. Güldiken ve diğ. antosiyanin ekstraksiyonu ile ilgili yapmış olduğu bir çalışmada da siyah havuçtan antosiyanin ekstraksiyonunda, ekstraktın siyanidin-3-glikozit içeriğinin etanol konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak değiştiği gözlenmiştir (Guldiken ve diğ., 2016). Shirzad ve diğ. göre bu durum etanolün kısa zaman periyotlarında etkili bir çözücü olduğunu göstermektedir (Shirzad ve diğ., 2017). Yani su, antioksidan etkiye sahip bileşenlerin ekstraksiyonunda belirli bir sistem için etanolden daha fazla zamana gereksinim göstermektedir.



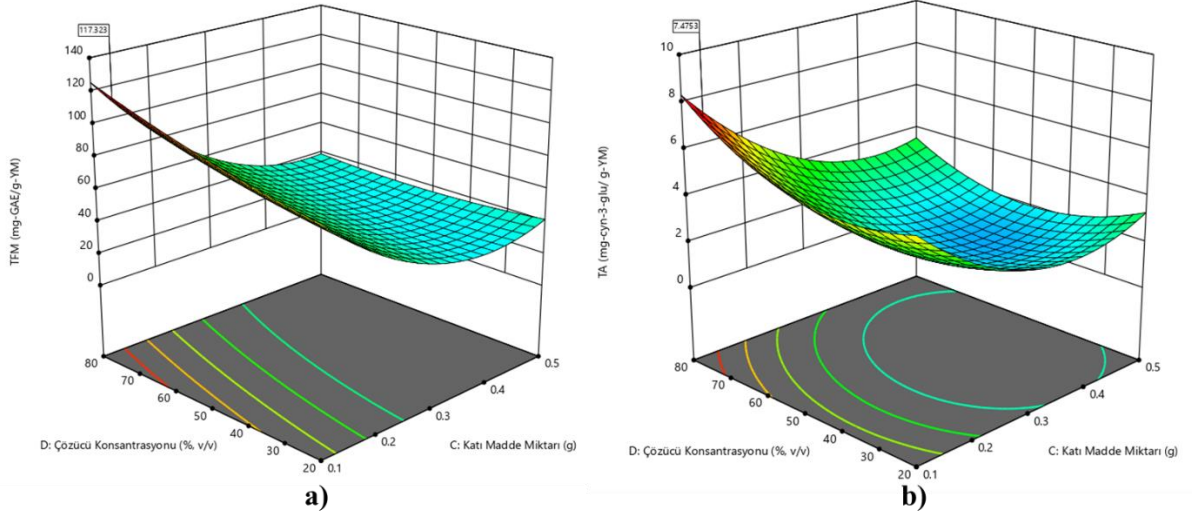
Şekil 4.44: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, çözücü konsantrasyonunun, daldırma süresine (Katı madde miktarı=0,110 g, yıkama süresi =48,5 dk) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Şekil 4.45, sabit bazı değerlerde (daldırma süresi=25,4 dk, çözücü konsantrasyonu=%75, v/v) yıkama süresi ve katı madde miktarının toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Katı madde miktarının şeftali kabuklarından OÇE ile TFM ve TA açısından zengin bir ekstrakt elde edilmesinde diğer üç yöntemde (MDE, UDE ve HDE) olduğu gibi bir etki gösterdiği görülmektedir. Kısacası, aynı solvent miktarı başına ekstrakte edilecek madde miktarı arttıkça ekstraksiyon verimi düşmektedir. Bu durumda kütle iletiminin temel prensiplerine göre beklenen bir durumdur.



Şekil 4.45: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, katı madde miktarının, yıkama süresine (Daldırma süresi=25,4 dk, çözücü konsantrasyonu=%75, v/v) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

Şekil 4.46, sabit bazı değerlerde (daldırma süresi=25,4 dk, yıkama süresi=48,5 dk) EtOH konsantrasyonu ve katı madde miktarının toplam fenolik madde (a) ve toplam antosiyanin (b) üzerine etkilerini göstermektedir. Her iki sistem için de benzer eğilimleri görmekteyiz. Solvent sistemi içerisindeki alkol oranı arttıkça elde edilen şeftali kabuğu ekstraktı içerisindeki TFM ve TA miktarları da orantılı olarak artmıştır. Kabuk miktarı ile de ters orantılı bir ekstrakt verimi söz konusudur.



Şekil 4.46: Şeftali kabuğu ekstraktının (a) TFM, (b) TA değerleri için, çözücü konsantrasyonunun, katı madde miktarına (daldırma süresi=25,4 dk, yıkama süresi=48,5 dk) bir fonksiyonu olarak 3D yüzey grafiği.

4.2.5.2. Modelleme

Şeftali kabuklarından OÇE yöntemi ile TFM ve TA açısından zengin ekstrakt elde ederken türetilen ANOVA tabloları Tablo 4.55 ve 4.56 ile verilmiştir. YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak OÇE ile şeftali kabuklarından TFM ve TA ekstraksiyonu için hesaplanmış olan ANOVA test sonuçlarını göstermektedir. Her iki cevap değeri için üretilmiş olan ikinci dereceden polinom denklemler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$).

Tablo 4.57: OÇE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA test sonuçları.

TFM	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	23283,52	14	1663,11	73,71	< 0,0001	önemli
A- Daldırma Süresi	169,13	1	169,13	7,50	0,0153	
B- Yıkama Süresi	3,32	1	3,32	0,1473	0,7065	
C- Katı Madde Miktarı	16526,57	1	16526,57	732,43	< 0,0001	

Tablo 4.55 (devam):

D-Çözücü Konsantrasyonu	1908,45	1	1908,45	84,58	< 0,0001	
AB	3,10	1	3,10	0,1375	0,7160	
AC	515,52	1	515,52	22,85	0,0002	
AD	179,68	1	179,68	7,96	0,0129	
BC	142,74	1	142,74	6,33	0,0238	
BD	43,41	1	43,41	1,92	0,1857	
CD	1563,15	1	1563,15	69,28	< 0,0001	
A²	22,89	1	22,89	1,01	0,3298	
B²	825,30	1	825,30	36,58	< 0,0001	
C²	1611,42	1	1611,42	71,42	< 0,0001	
D²	32,41	1	32,41	1,44	0,2493	
Kalıntı	338,46	15	22,56			
Uyum Eksikliği	286,73	10	28,67	2,77	0,1360	önemsiz
Saf Hata	51,73	5	10,35			

Tablo 4.58: OÇE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen TA için ANOVA test sonuçları.

TA	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F-değeri	p-değeri	
Model	115,08	14	8,22	122,78	< 0,0001	önemli
A- Daldırma Süresi	8,78	1	8,78	131,12	< 0,0001	
B- Yıkama Süresi	0,6090	1	0,6090	9,10	0,0087	

Tablo 4.59 (devam):

C- Katı Madde Miktarı	67,15	1	67,15	1003,13	< 0,0001	
D-Çözücü Konsantrasyonu	8,10	1	8,10	120,99	< 0,0001	
AB	1,13	1	1,13	16,92	0,0009	
AC	0,1142	1	0,1142	1,71	0,2112	
AD	0,0076	1	0,0076	0,1135	0,7409	
BC	2,61	1	2,61	38,99	< 0,0001	
BD	0,0662	1	0,0662	0,9891	0,3357	
CD	4,82	1	4,82	71,93	< 0,0001	
A²	3,66	1	3,66	54,66	< 0,0001	
B²	9,34	1	9,34	139,58	< 0,0001	
C²	9,35	1	9,35	139,70	< 0,0001	
D²	5,33	1	5,33	79,63	< 0,0001	
Kalıntı	1,00	15	0,0669			
Uyum Eksikliği	0,8472	10	0,0847	2,70	0,1424	önemsiz
Saf Hata	0,1570	5	0,0314			

Eşitlik (4.15) ve (4.16), sırasıyla TFM ve TA için kodlanmış faktörler açısından Design-Expert tarafından türetilmiş olan son denklemleri vermektedir:

$$\begin{aligned}
 \text{TFM} \quad & 48,12 - 3,07 A + 0,4297 B - 30,30 C + 10,30 D - 0,4404 AB \quad (4.15) \\
 & - 5,68 AC - 3,35 AD - 2,99 BC - 1,65 BD - 9,88 CD - 2,97 \\
 & A^2 - 17,85 B^2 + 24,94 C^2 + 3,54 D^2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{TA} \quad & 2,73 - 0,6983 A + 0,1839 B - 1,93 C + 0,6708 D + 0,2661 AB \quad (4.16) \\
 & + 0,0845 AC - 0,0218 AD - 0,4039 BC - 0,0643 BD - 0,5486 \\
 & CD - 1,19 A^2 - 1,90 B^2 + 1,90 C^2 + 1,43 D^2
 \end{aligned}$$

Fenolik madde açısından bakıldığında (Tablo 4.55), yıkama süresi harç tüm bağımsız değişkenler OÇE sistemi üzerinde istatistiksel olarak etkili bulunmuştur ($p < 0,05$). En etkili proses değişkeni şeftali kabuğudur ve bunu EtOH konsantrasyonu takip etmiştir ($p < 0,0001$). Proses parametreleri arasındaki etkileşimlerden A ve C, A ve D, ve B ve C arasındaki etkileşimler de yine önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Yıkama süresinin ve katı madde miktarının ikinci dereceden kuvvetleri de yine şeftali kabuklarından OÇE yöntemiyle TFM açısından zengin ekstrakt eldesinde istatistiksel olarak etkili görülmüştür ($p < 0,0001$).

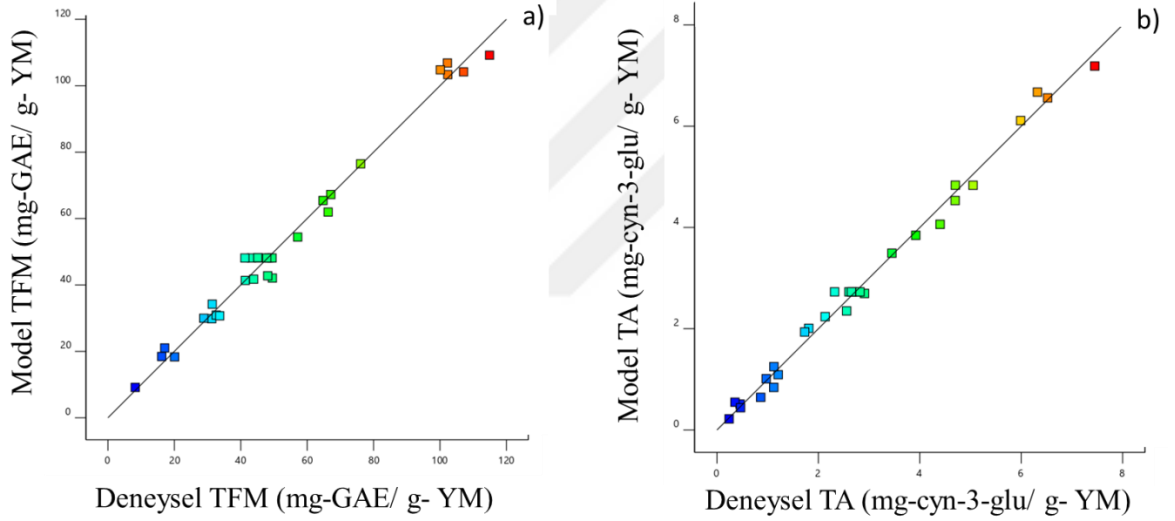
Tablo 4.56 incelendiğinde, söz konusu sistem ile elde edilen antosiyaninlerce zengin bir ekstrakt eldesinde seçilmiş olan tüm parametreler etkin görülmektedir. Katı madde miktarı en önemli proses değişkeniyken bunu sırasıyla daldırma süresi ve çözücü konsantrasyonu takip etmektedir ($p < 0,0001$). Daldırma ve yıkama süreleri, yıkama süresi ve katı madde miktarı, katı madde miktarı ve EtOH konsantrasyonu arasındaki etkileşimler de istatistiksel açıdan önemlidir ($p < 0,05$). Diğer taraftan tüm bağımsız faktörlerin ikinci dereceden kuvvetleri de yine söz konusu sistem için etkili görülmektedir ($p < 0,0001$).

Ayrıca, uyum eksikliği değeri her iki cevap değeri için p , 0,05'ten büyük hesaplanmıştır. Bu durum modelin verilen data'lara uyumsuzluğunun bir ölçüsü olduğunu göstermektedir ki istatistiksel açıdan önemsiz olarak hesaplanması, bu sistem için türetilmiş olan modellerin veriler için uygun olduğunu göstermektedir. Tablo 4.57 ise her iki cevap değeri için SD , R^2 , R^2_a , R^2_t ve CV değerlerini göstermektedir. Yüksek belirleme katsayılarına ($> 0,98$) bağlı olarak, cevap değerlerindeki toplam varyasyonun sadece $\sim 1\%$ in türetilen denklemler ile açıklanamayacağı sonucuna varabiliriz. Diğer taraftan, R^2_a R^2_t ile makul bir uyum içindedir ki bu da son derece tatmin edici bir durumdur. CV değeri de oldukça tatmin edici olarak hesaplanmıştır ($< 10\%$).

Tablo 4.60: OÇE yöntemi kullanılarak şeftali kabuklarından elde edilen cevap değişkenleri için istatistiksel veriler.

Cevap Değişkeni	SD	R ²	R ² _a	R ² _t	CV
TFM(mg-GAE/ g-YM)	4,75	0,9857	0,9723	0,9275	9,01
TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	0,2587	0,9913	0,9833	0,9483	9,00

ANOVA bulgularına dayanarak, her iki sistem (TFM ve TA) için de deneysel veriler ile tahmin edilen veriler arasında tatmin edici bir ilişki olduğu söylenebilir (Şekil 4.47).



Şekil 4.47: Şeftali kabuklarına uygulanan OÇE yöntem ile elde edilen a) model TFM ile deneysel TFM b) model TA ile deneysel TA arasındaki korelasyon.

4.2.5.3. Optimizasyon ve Validasyon

Otomatik çözücü ekstraksiyonu kullanılarak şeftali kabukların TFM ve TA açısından maksimum bir ekstrakt elde etmek için Desing-Expert yazılımı ile optimizasyon çalışması yapılmıştır. Tablo 4.58, YMK tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek TFM (117,32mg-GAE/ g-YM) ve TA (7,47 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi OÇE proses şartlarını vermektedir. Koşulların

doğrulanması da test edilmiştir. Deneysel ve hesaplanan sonuçlar arasındaki kalıntının kabul edilebilir olması da modelin söz konusu sistemler için uygun olduğunu desteklemektedir.

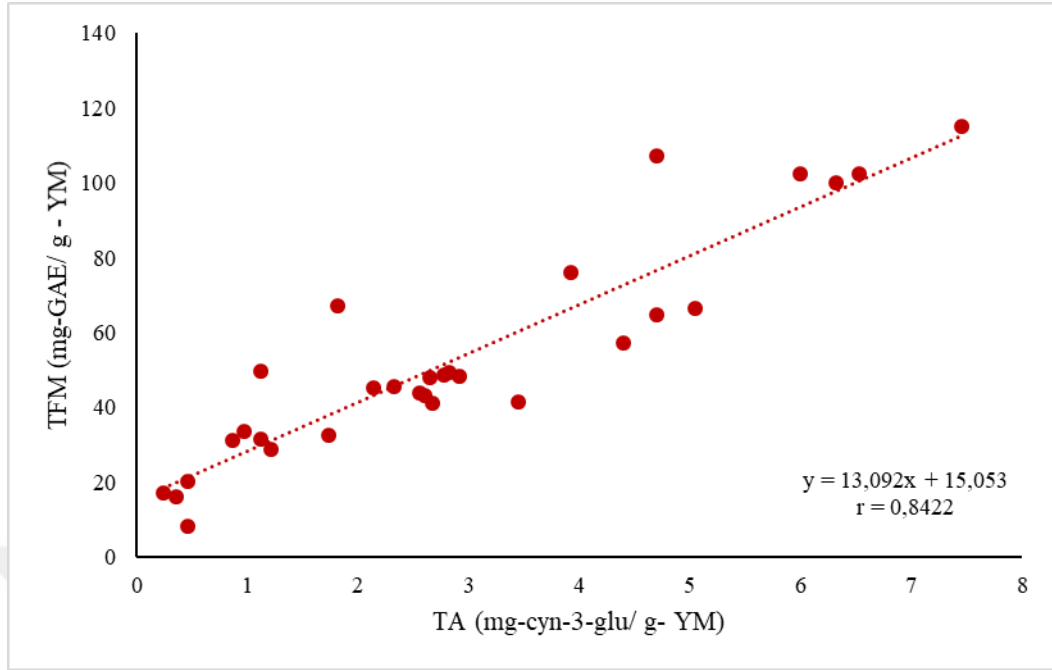
Tablo 4.61: Şeftali kabuklarının OÇE için optimum koşullar ve validasyon.

Optimum Ekstraksiyon Koşulları				Parametre	Öngörülen Sonuç	Deneysel Sonuç	Hata Oranı (%)
A (dk)	B (dk)	C (g)	D (% v/v)	TFM(mg-GAE/ g-YM)	117,32	117,09±0,013	0,19
25,40	48,50	0,11	75,00	TA (mg-cyn-3-glu/ g-YM)	7,47	7,10±0,005	5,21

4.2.5.4. Biyoaktif İçeriğin Değerlendirilmesi

Çalışma materyali olarak seçilmiş olan şeftali kabuklarının sahip olduğu biyoaktif özellikler toplam fenolik, antosiyanin ve çeşitli testlerle (DPPH, CUPRAC ve ABTS) ölçülmüş olan antioksidan aktivite değerleri açısından değerlendirilmiştir.

Şekil 4.48, otomatik çözücü ekstraksiyonu ile çeşitli koşullarda elde edilen ekstraktraktların içeriğindeki fenolik ve antosiyanin ölçümleri arasındaki ilişkiyi sergilemektedir. Daha net bir ifade ile söz konusu bağımlı değişkenler (TFM ve TA) arasındaki korelasyon katsayıları aracılığıyla ilgili ilişkiyi doğrulamak için matematiksel bir ifade oluşturulmuştur (Kurtulbaş ve diğ., 2019). Korelasyon katsayısının 0,84' ten büyük bir değer vermesi toplam antosiyaninlerin seçilen atık ürünün biyofenol kapasitesine katkısının ne derece yüksek olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.48: OÇE ile hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktının TFM ile TA değerleri arasındaki ilişki.

Tablo 4.59 ise Tablo 4.53’ te verilen şartlarda elde edilmiş olan ekstraktların farklı testler (DPPH, CUPRAC ve ABTS) ile ölçülmüş antioksidan aktivite değerlerini vermektedir.

Tablo 4.62: Şeftali yapraklarına uygulanan OÇE ile elde edilen ekstraktların DPPH, CUPRAC ve ABTS testleri ile ölçülen antioksidan aktivite değerlerinin karşılaştırmalı sonuçları*.

Deney No	DPPH (mg-TEAC/ g-YM)	CUPRAC (mg-TEAC/ g-YM)	ABTS (mg-TEAC/ g-YM)
1	36,52±0,003 ^{a**}	99,14±0,002 ^a	32,43±0,001 ^a
2	41,65±0,002 ^b	85,18±0,001 ^b	26,17±0,002 ^b
3	20,51±0,001 ^c	24,81±0,001 ^c	13,31±0,001 ^c
4	36,58±0,001 ^d	28,88±0,003 ^e	13,22±0,003 ^e
5	45,96±0,002 ^e	87,68±0,005 ^d	27,09±0,005 ^d
6	45,17±0,003 ^f	91,27±0,004 ^e	27,76±0,002 ^e
7	17,01±0,001 ^g	25,33±0,001 ^f	10,30±0,001 ^f

Tablo 4.59 (devam):

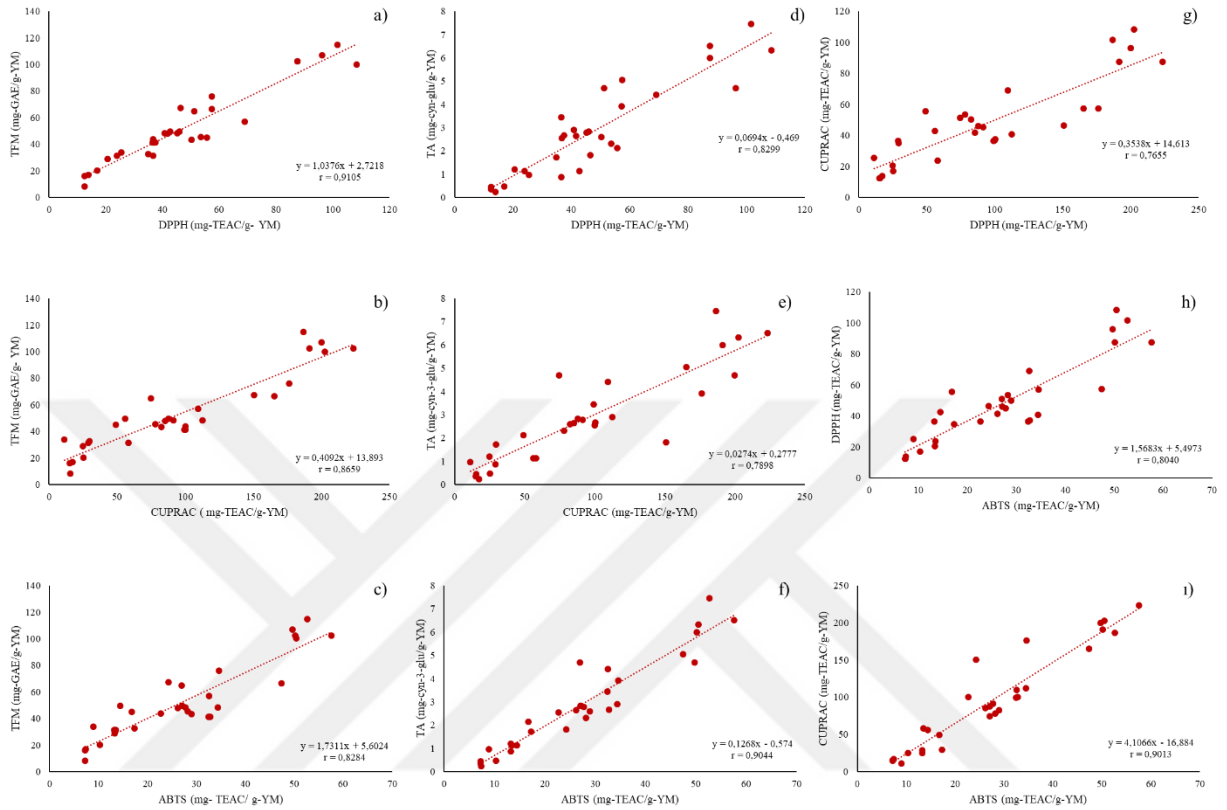
8	108,45±0,001 ^h	202,45±0,001 ^g	50,44±0,001 ^g
9	46,37±0,002 ^j	150,63±0,003 ^g	24,29±0,003 ^h
10	34,88±0,001 ^k	29,44±0,001 ^h	17,30±0,002 ⁱ
11	37,37±0,000 ^l	100,14±0,002 ⁱ	32,78±0,001 ⁱ
12	51,18±0,001 ^m	74,56±0,001 ⁱ	27,02±0,003 ^j
13	96,18±0,001 ⁿ	199,87±0,000 ^j	49,66±0,001 ^k
14	23,82±0,005 ^o	58,04±0,001 ^k	13,47±0,002 ^l
15	53,51±0,003 ^p	78,14±0,002 ^l	28,21±0,001 ^m
16	55,60±0,002 ^r	49,00±0,003 ^m	16,78±0,005 ⁿ
17	87,51±0,001 ^s	223,40±0,005 ⁿ	57,57±0,005 ^o
18	40,73±0,002 ^s	112,40±0,006 ^o	34,40±0,004 ^p
19	42,69±0,001 ^t	55,89±0,001 ^p	14,43±0,003 ^r
20	13,89±0,005 ^u	17,13±0,001 ^r	7,40±0,002 ^s
21	12,52±0,002 ^v	15,42±0,002 ^s	7,23±0,001 ^s
22	57,31±0,003 ^y	165,24±0,003 ^s	47,39±0,001 ^t
23	101,50±0,001 ^z	186,52±0,008 ^t	52,65±0,002 ^u
24	68,97±0,002 ^q	109,48±0,005 ^u	32,57±0,003 ^v
25	87,45±0,002 ^w	191,25±0,001 ^v	50,12±0,004 ^y
26	50,13±0,001 ^x	82,36±0,001 ^y	28,94±0,004 ^z
27	25,36±0,001 ^ç	11,22±0,002 ^z	8,95±0,001 ^x
28	12,52±0,002 ^v	14,98±0,003 ^q	7,24±0,002 ^q
29	36,67±0,003 ^ö	99,92±0,003 ^w	22,69±0,003 ^w
30	57,24±0,006 ^ü	176,17±0,002 ^x	34,56±0,001 ^ö

* Veriler ortalama (n = 3) ± standart sapma olarak verilmiştir.

** Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, p < 0.05'te önemli bir fark gösterir.

Şekil 4.49 ise bu testlerin doğruluğunu göstermektedir. Her bir test sonucunun birbiri arasındaki pozitif ve tatmin edici korelasyon (> 0,76) sonuçların doğruluğunu test etmektedir. Diğer

tarafından, TFM ve TA ile antioksidan aktivite arasındaki güçlü pozitif korelasyon ($> 0,78$), toplam biyofenollerin şeftali kabuğunun antioksidan kapasitesine katkısını doğrulamaktadır.



Şekil 4.49: OÇE ile hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktının a) TFM ile DPPH, b) TFM ile CUPRAC, c) TFM ile ABTS, d) TA ile DPPH, e) TA ile CUPRAC, f) TA ile ABTS, g) DPPH ile CUPRAC, h) DPPH ile ABTS, i) CUPRAC ile ABTS değerleri arasındaki ilişkisi.

4.2.6. Karşılaştırmalı Sonuçlar

Dört farklı ileri ayırma yöntemi (MDE, UDE, HDE ve OÇE) kullanılarak şeftali kabukları ekstrakte edilmiştir. Her bir sistemin deneysel tasarımı ve optimizasyon çalışması YYY'nin YMK tasarımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktların içeriğindeki TFM ve TA değerlerinin maksimum olması hedeflenerek optimum koşullar belirlenmiştir. Tablo 4.60, söz konusu optimum koşullarda elde edilen maksimum cevap değerlerini karşılaştırmalı olarak sunmaktadır.

Ekstraksiyon Methodu	Optimum Çalışma Koşulları		Optimum Değer							
			TFM (mg-GAE/g-YM)			TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)			<i>p</i> - Hidroksibenzoik Asit (mg/ g-YM)	<i>p</i> - Kumarik Asit (mg/ g- YM)
			Öngörülen Sonuç	DeneySEL Sonuç	Hata Oranı (%)	Öngörülen Sonuç	DeneySEL Sonuç	Hata Oranı (%)	DeneySEL Sonuç	DeneySEL Sonuç
MDE	A	500	19,35	20,36 ^a	4,96	1,12	1,19 ^a	5,88	2,65 ^a	3,59 ^a
	B	80								
	C	90								
UDE	A	10	12,64	13,03 ^b	2,99	0,107	0,112 ^b	4,46	0,40 ^b	1,61 ^b
	B	0,1								
	C	30,3								

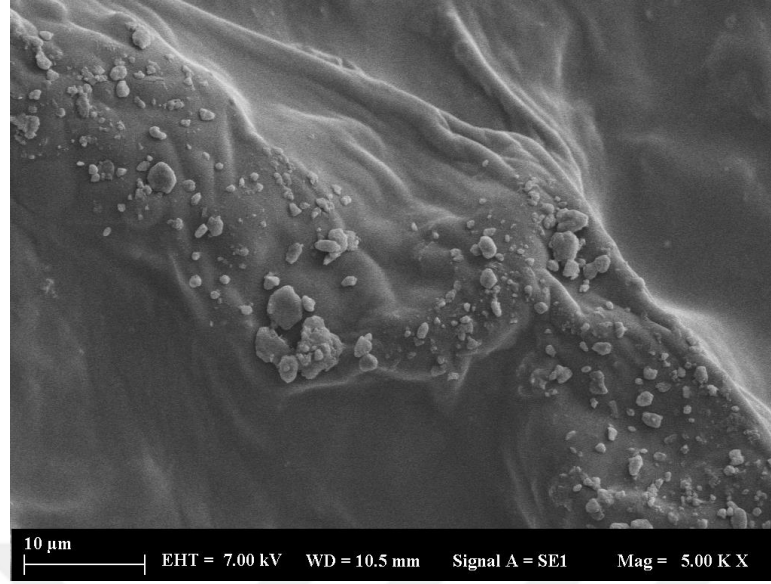
HDE	A	0,1	22,94	20,55 ^c	1,89	2,52	2,47 ^c	1,98	2,39 ^c	2,22 ^c
	B	6000								
	C	80,2								
	D	20								
OÇE	A	25,40	117,32	117,09 ^d	0,19	7,47	7,10 ^d	5,21	4,63 ^d	24,86 ^d
	B	48,50								
	C	0,11								
	D	75								

* Aynı sütun içinde ortak bir harfi paylaşmayan sonuçlar, $p < 0.05$ 'te önemli bir fark gösterir.

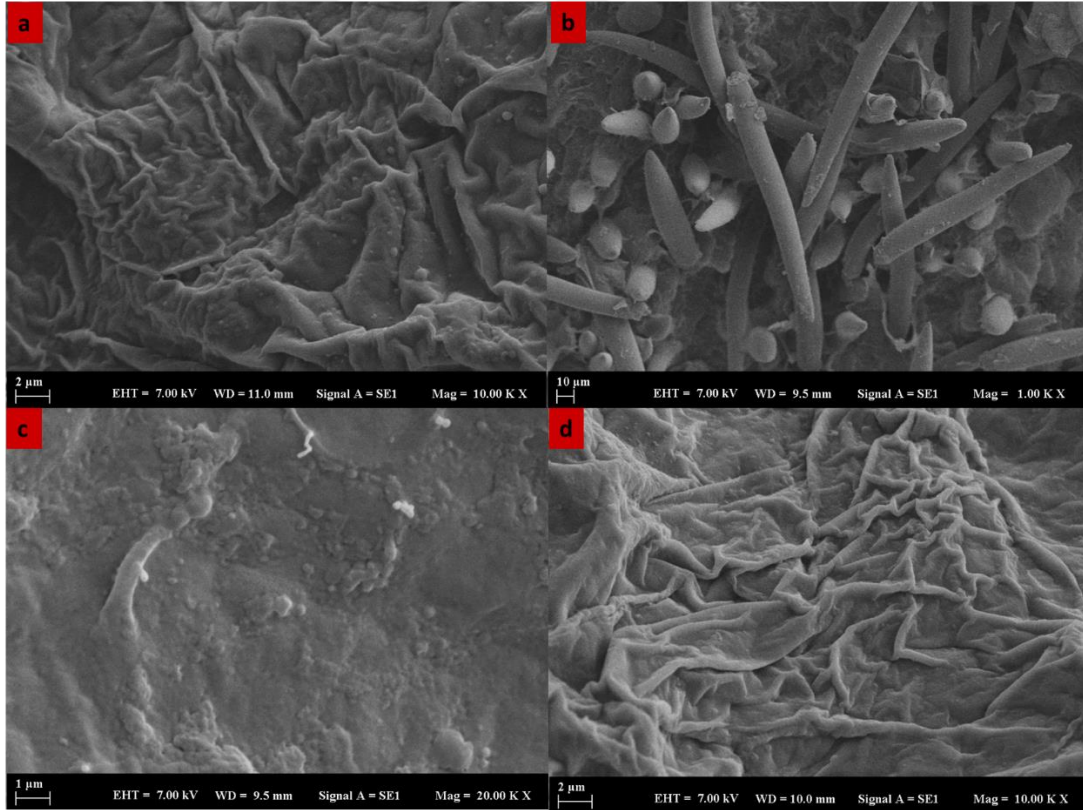
Liu ve diğ. 5 farklı tür şeftalinin kabuğunu oda sıcaklığında konvansiyonel çalkalama yöntemiyle 1 saat (%50 metanol-su kullanarak) ekstrakte ettikleri bir çalışmada 0,82 ile 1,64 mg-GAE/g-YM arasında (şeftalinin türüne bağlı olarak) TFM verimi elde edilmiştir (H. Liu, Cao ve Jiang, 2015). Saidani ve diğ. de 9 tür şeftalinin kabuğunu biyoaktif içeriği açısından incelemişlerdir (Saidani ve diğ., 2017). Onlar da HDE ile %60 metanol çözeltisini solvent olarak kullanmışlar ve farklı şeftali türlerinin kabuklarının TFM içeriğinin 0,25 ile 1,62 mg-GAE/g-YM arasında değiştiğini gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada da yine farklı şeftali türünün kabuğunun fenolik madde içeriği üzerine etkisi incelenmiş ve çalkalama ile 1 saat konvansiyonel ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir (H. Liu ve diğ., 2018). Bu çalışmada raporlanan TFM seviyeleri 0,49 ile 2,51 arasında değişmektedir. Bu çalışmada elde edilen TFM verimleri söz konusu çalışmalara kıyasla çok fazladır. Bu kadar farklı sonuçlar elde edilmesinin pek çok nedeni vardır. Bunlardan bazıları örnek hazırlama, kullanılan ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon şartları (sıcaklık, katı madde miktarı, solvent miktarı, ekstraksiyon süresi, solvent türü gibi), kullanılan bitkisel metaryelin türü ve coğrafi koşulları, ve hasat zamanı gibi faktörlerdeki farklılıklar olabilir.

4.2.7. Morfolojik Çalışmalar

Şeftali kabuklarının yapılarında meydana gelen değişimler (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Her bir yöntemin malzeme üzerine etkisini karşılaştırmalı olarak gözlemleyebilmek için söz konusu yöntemlerin (MDE, UDE, HDE ve OÇE) uygulanmasının ardından çöküntü olarak kalan kabuklar süzülerek kurutulmuştur. Sonuçlar (SEM görüntüleri) karşılaştırmalı olarak Şekil 4.50 ve Şekil 4.51 ile sunulmuştur.



Şekil 4.50: Ekstraksiyon işlemleri öncesi şeftali kabuğunun morfolojik yapısı.



Şekil 4.51: Ekstraksiyon işlemi sonrası şeftali kabuğu morfolojik yapısı (a): MDE, (b): UDE, (c) HDE, (d) OÇE.

Şekil 4.50 ve Şekil 4.51 incelendiğinde ekstraksiyondan sonra bitki numunesinin fiziksel yapısında bariz kırılma değişiklikleri olduğu görülmektedir. MDE (Şekil 4.51a) ve OÇE (Şekil 4.51d) yöntemleri ile ekstraksiyon sonrasında, yüzey yapısı kritik bir şekilde hasar görmüştür ve bu durum hücre duvarının kırılmasına neden olmuştur. Şekil 4.51b ve Şekil 4.51c’ de ise UDE ve HDE yöntemlerinin hücre duvarları üzerine etkisi görülmektedir. UDE, çözücünün hücre duvarlarına nüfuz etmesine izin vermekte ve akustik kavitasyon tarafından üretilen kabarcıklar, hücre duvarının bozulmasına yardımcı olmaktadır. Ancak bu değişikliklerin MDE ve OÇE kadar etkili olmadığı görülmektedir. Benzer bir sonuç Alara vd. çalışmasında görülmüş, mikrodalga destekli ekstraksiyonun ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemine göre hücre duvarlarında daha yüksek hasara yol açtığı ve fenolik madde verimini arttırdığı raporlanmıştır (Alara ve diğ., 2018).

4.2.8. Stabilité Çalışmaları

Şeftali kabuklarından biyoaktif bileşenlerce zengin ekstrakt eldesinde uygulanan optimizasyon çalışması, özütleyici olarak sulu alkol çözeltisinin kullanıldığı en iyi koşulları (Tablo 4.60) belirlemişti. Bu özütleyiciyi sürdürülebilir bir ortam olarak önermek için, seçilen yöntemler (MDE, UDE, HDE ve OÇE) ile üretilen şeftali kabuğu ekstraktları, çeşitli koşullara maruz bırakıldı. Örneklerin sırasıyla dondurucu (-20 °C), buzdolabı (4 °C) ve oda sıcaklığı (25 °C) koşullarında tutulmasıyla ürünlerin saklama stabilitesi değerlendirilmiştir. Bununla beraber güneş ışınlarının oksidasyona etkisi olup, bozunmayı hızlandırıcı bir faktör olup olmadığı da değerlendirilmiştir. Ürünler toplam fenolik, toplam antosiyanin, *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri açılarından periyodik olarak test edildi (Ek 5 – Ek 8). Bu depolama kararlılığı testi 60 gün sürmüştür.

4.2.8.1. MDE Yöntemiyle Elde Edilen Şeftali Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi

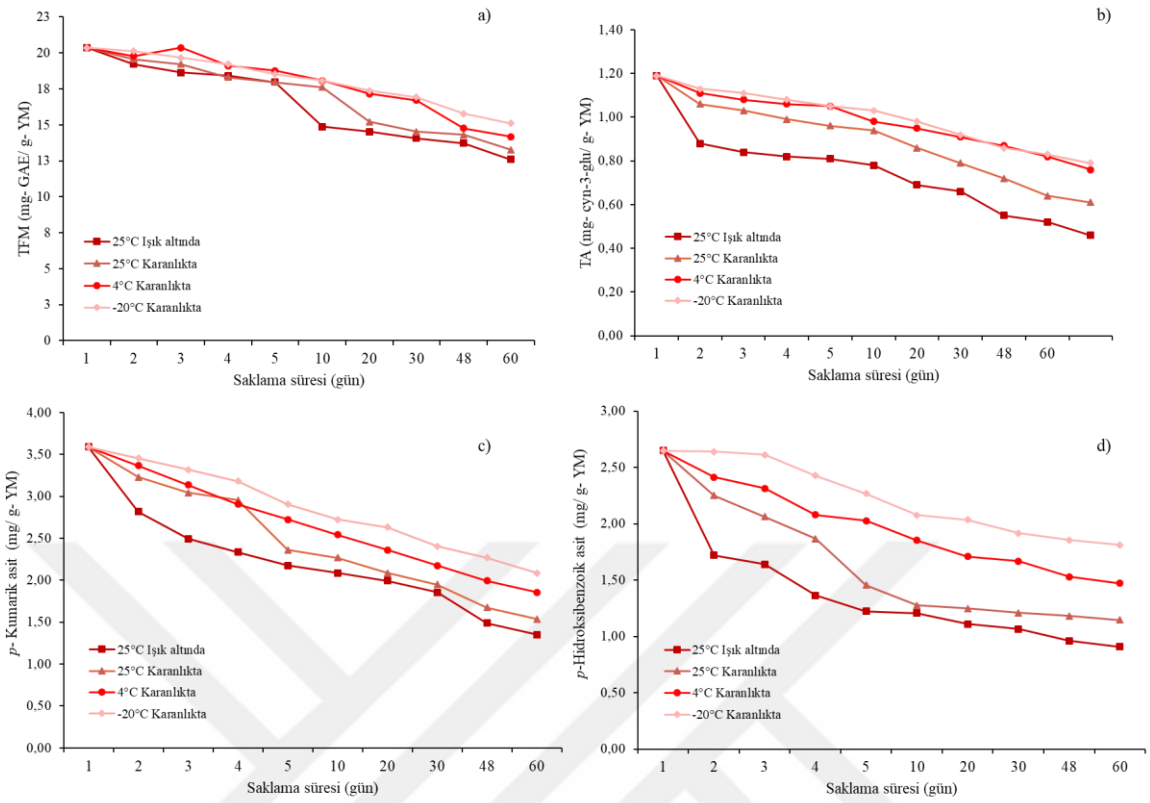
Tablo 4.61, MDE ile elde edilen şeftali kabuğu ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerine (TFM, TA ve *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri) göre zamanın bir fonksiyonu olarak her bir depolama ortamının karşılaştırmalı sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.52 ise bu süreçte (60 gün) gerçekleşen değişimi gözler önüne sermektedir.

Öncelikle şeftali kabuğu özütlerinin depolanması sırasında ışığın etkisine baktığımızda, söz konusu 4 bağımlı değişkendirdeki azalmanın en çok ışıktaki bekletilenlerde olduğunu görmekteyiz. Şekil 4.52a, fenolik madde miktarının ilk 5 günün ardından, Şekil 4.52b, c ve d ise ilk günün ardından antosiyaninlerin ve söz konusu bireysel komponentlerin (*p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit) hızla azalmaya başladığını sergilemektedir. 60 günün sonunda örneklerin TFM içeriği yaklaşık %38, TA içeriği %61, *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri ise sırasıyla ~65 ve 62% oranlarında azalmıştır.

Diğer taraftan, sıcaklığında biyoaktif bileşenler üzerinde doğrudan etkili olduğu söylenebilir (Tablo 4.61). Depolama sıcaklığının artması ile beraber bozunma hızının ve oranında düzenli olarak arttığı görülmektedir (Şekil 4.52). Şeftali kabuğu özütlerinin 60 gün sonundaki bozunma oranı %35'ten (oda sıcaklığı) %19'a (derin dondurucu) kadar azaltılmıştır. Toplam antosiyanin içeriğindeki iki aylık süreçteki bozunma yaklaşık olarak %49 iken, aynı örnek buzdolabında muhafaza edildiğinde aynı süreçteki bozunma %36 ve son olarak da derin dondurucu da muhafaza edildiğinde bu düşüş yaklaşık %32 olarak hesaplanmıştır. İki aylık bir depolama süresi sonunda bireysel fenolik bileşiklerdeki (*p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit) azalma %57'lerden (25 °C) sırasıyla %32 ve %42'lere (-20 °C) kadar düşürülmüştür.

Tablo 4.64: MDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış şeftali kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA, *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit değerleri*.

Saklama Koşulları	TFM (mg-GAE/g-YM)		TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		<i>p</i> -Hidroksibenzoik Asit (mg/ g-YM)		<i>p</i> -Kumarik Asit (mg/ g-YM)	
	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu
1 atm, 25°C Işık altında	20,36±0,001	12,59±0,002 ^a	1,19±0,001	0,46±0,003 ^a	2,65±0,002	0,91±0,001 ^a	3,59±0,004	1,35±0,005 ^a
1 atm, 25°C Karanlık	20,36±0,001	13,28±0,002 ^b	1,19±0,001	0,61±0,002 ^b	2,65±0,002	1,14±0,002 ^b	3,59±0,004	1,53±0,005 ^b
1 atm, 4°C Karanlık	20,36±0,001	14,19±0,004 ^c	1,19±0,001	0,76±0,001 ^c	2,65±0,002	1,47±0,001 ^c	3,59±0,004	1,86±0,003 ^c
1 atm, - 20°C Karanlık	20,36±0,001	16,52±0,001 ^d	1,19±0,001	0,79±0,004 ^d	2,65±0,002	1,81±0,003 ^d	3,59±0,004	2,08±0,001 ^d



Şekil 4.52: MDE yöntemiyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b), *p*-Kumarik asit (c) ve *p*-Hidroksibenzoik asit (d) değerlerinin değişimi.

4.2.8.2. UDE Yöntemiyle Elde Edilen Şeftali Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi

Tablo 4.62, UDE ile elde edilen şeftali kabuğu ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerine (TFM, TA ve *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri) göre zamanın bir fonksiyonu olarak her bir depolama ortamının karşılaştırmalı sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.53 ise bu süreçte (60 gün) gerçekleşen değişimi görsel olarak sunmaktadır.

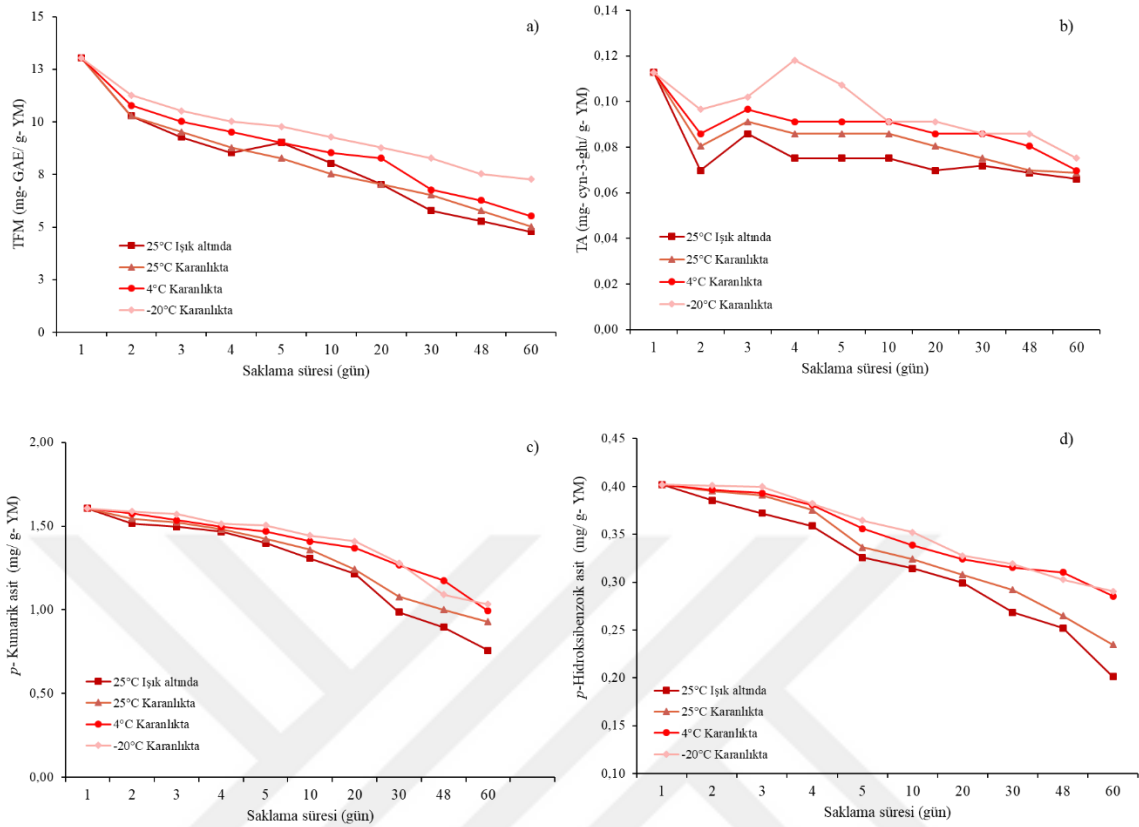
Oda sıcaklığında depolanan şeftali kabuğu özütleri incelendiğinde, iki türlü (aydınlığa ve karanlığa maruz bırakılan örnekler) değerlendirme yapmak mümkündür. Aynı örneğin karanlık ve aydınlık koşullarda muhafaza edilmesine göre farklı oranlarda degradasyon söz konusu olmuştur (Şekil 4.53). UDE ile elde edilen özütlerin ışık altındaki bozunması diğer örneklerdeki gibi en fazla oranda olmuştur. Hatta şekil 4.53b’de gösterildiği gibi en hızlı bozunma ikinci günden itibaren antosiyaninlerde gözlenmiştir. Işık altında iki ay sonunda %63 oranında TFM, %40 TA, %50 ve 53 oranlarında ise sırasıyla *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri bozunmuştur. Aynı şartlar sağlanarak bu kez karanlıkta 2 ay muhafaza edilen aynı

örneklerin %61 TFM, %37 TA, %43 ve 42 *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri azalmıştır.

Depolama sıcaklığının ekstraktların kalitesine etkisine baktığımızda sıcaklığın oda temperaturünden -20 °C'ye düşürülmesi ile bozunma oranlarının TFM için %61'den %44'e, TA için %37'den %32'ye, *p*-Hidroksibenzoik asit için %43'ten %28'e ve *p*-Kumarik asit için %42'den %36'ya gerilediğini görmekteyiz (Şekil 4.48).

Tablo 4.65: UDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış şeftali kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA, *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit değerleri.

Saklama Koşulları	TFM (mg-GAE/g-YM)		TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		<i>p</i> -Hidroksibenzoik Asit (mg/ g-YM)		<i>p</i> -Kumarik Asit (mg/ g-YM)	
	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu
1 atm, 25°C Işık altında	13,03±0,001	4,78±0,001 ^a	0,11±0,002	0,066±0,001 ^a	0,40±0,003	0,20±0,003 ^a	1,61±0,002	0,76±0,002 ^a
1 atm, 25°C Karanlık	13,03±0,001	5,03±0,004 ^b	0,11±0,002	0,069±0,002 ^{ab}	0,40±0,003	0,23±0,001 ^b	1,61±0,002	0,92±0,003 ^b
1 atm, 4°C Karanlık	13,03±0,001	5,53±0,001 ^c	0,11±0,002	0,070±0,003 ^{ab}	0,40±0,003	0,28±0,002 ^c	1,61±0,002	0,99±0,001 ^c
1 atm, -20°C Karanlık	13,03±0,001	7,28±0,003 ^d	0,11±0,002	0,075±0,005 ^b	0,40±0,003	0,29±0,005 ^c	1,61±0,002	1,03±0,001 ^d



Şekil 4.53: UDE yöntemiyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b), *p*-Kumarik asit (c) ve *p*-Hidroksibenzoik asit (d) değerlerinin değişimi.

4.2.8.3. HDE Yöntemiyle Elde Edilen Şeftali Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi

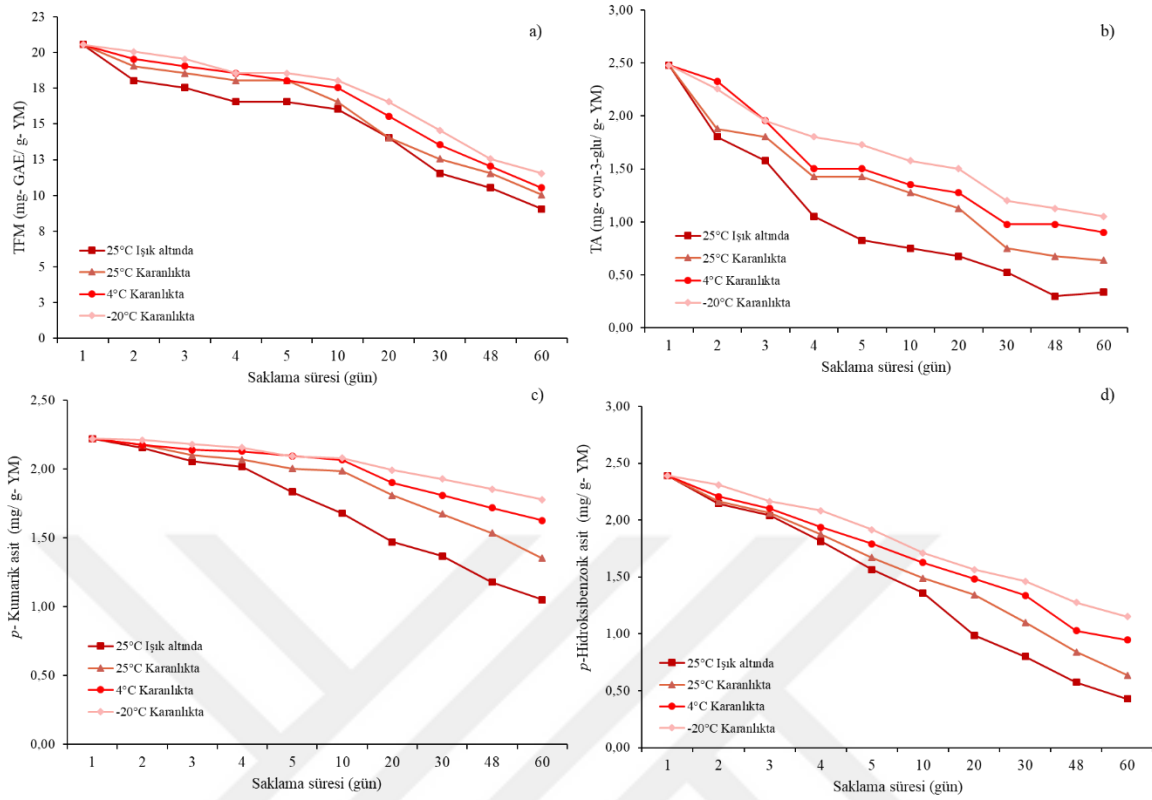
Tablo 4.63, HDE ile elde edilen şeftali kabuğu ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerine (TFM, TA ve *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri) göre zamanın bir fonksiyonu olarak her bir depolama ortamının karşılaştırmalı sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.54 ise bu süreçte (60 gün) gerçekleşen değişimi görsel olarak sunmaktadır.

Tüm kalite parametreleri için en fazla bozunma yine ışık altında oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde gözlenmiştir. Oda sıcaklığında depolanan HDE örneklerinin TFM içeriği 2 ay sonunda karanlık şartlara bırakıldığında %51 iken aydınlık şartlara bırakıldığında ise %56 oranında bir bozunma gözlenmiştir. Sıcaklık azaldıkça bu oran %49 (4 °C) ve %44 (-20 °C) olarak gerilemiştir (Şekil 4.54). TA içeriği açısından değerlendirildiğinde bu durum aydınlıktan karanlığa geçildiğinde %87'den %74'e düşmüş, ortam şartları soğuduğunda ise %74'ten %64

ve %57'ye kadar azalma gözlenmiştir. Aynı durum *p*-Hidroksibenzoik asit için 2 aylık bir sürecin ardından %87'lerden %52'lere kadar inmiş, *p*-Kumarik asit için ise %53'ten %20'ye kadar düşmüştür.

Tablo 4.66: HDE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış şeftali kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA, *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit değerleri.

Saklama Koşulları	TFM (mg-GAE/g-YM)		TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		<i>p</i> -Hidroksibenzoik Asit (mg/ g-YM)		<i>p</i> -Kumarik Asit (mg/ g-YM)	
	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu
1 atm, 25°C	20,55±0,003	9,05±0,001 ^a	2,47±0,001	0,33±0,002 ^a	2,39±0,001	0,43±0,003 ^a	2,22±0,001	1,05±0,001 ^a
Işık altında								
1 atm, 25°C	20,55±0,003	10,05±0,002 ^b	2,47±0,001	0,64±0,001 ^b	2,39±0,001	0,63±0,004 ^b	2,22±0,001	1,35±0,003 ^b
Karanlık								
1 atm, 4°C	20,55±0,003	10,55±0,001 ^c	2,47±0,001	0,90±0,003 ^c	2,39±0,001	0,94±0,001 ^c	2,22±0,001	1,63±0,003 ^c
Karanlık								
1 atm, -20°C	20,55±0,003	11,55±0,003 ^d	2,47±0,001	1,05±0,004 ^d	2,39±0,001	1,15±0,005 ^d	2,22±0,001	1,78±0,001 ^d
Karanlık								



Şekil 4.54: HDE yöntemiyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b), *p*-Kumarik asit (c) ve *p*-Hidroksibenzoik asit (d) değerlerinin değişimi.

4.2.8.4. OÇE Yöntemiyle Elde Edilen Şeftali Kabuğu Ekstraktlarının Stabilitesi

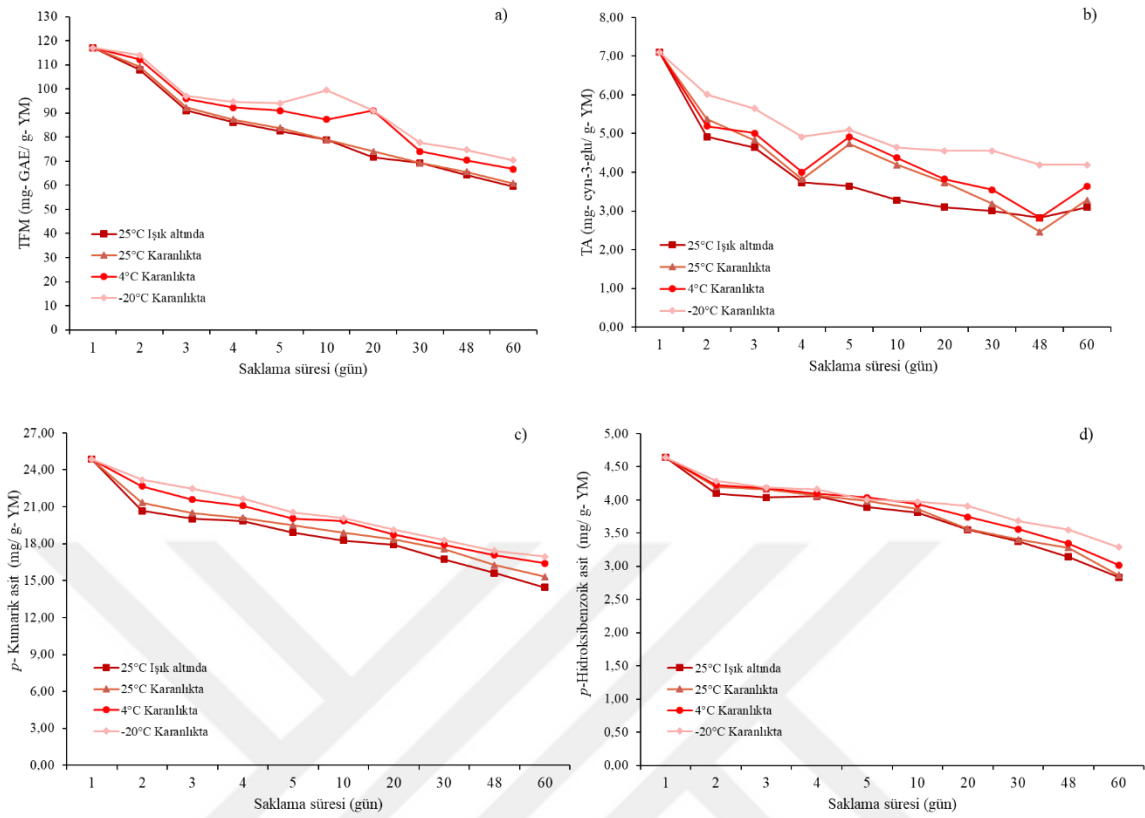
Tablo 4.64, OÇE ile elde edilen şeftali kabuğu ekstraktlarının biyoaktif bileşenlerine (TFM, TA ve *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri) göre zamanın bir fonksiyonu olarak her bir depolama ortamının karşılaştırmalı sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.55 ise bu süreçte (60 gün) gerçekleşen değişimi görsel olarak sunmaktadır.

Tüm kalite parametreleri (fenolik ve antosiyanin içerikler ve en önemli fenolik bileşenler açısından) için en fazla bozunma yine ışık altında oda sıcaklığında muhafaza edilen örneklerde gözlenmiştir. Fakat bozunma oranları diğer örneklerde olduğu gibi birbirinden çok farklı değildir (Şekil 4.55). Örneğin oda sıcaklığında depolanan OÇE örneklerinin TFM içeriği 2 ay sonunda karanlık şartlara bırakıldığında %49 iken aydınlık şartlara bırakıldığında ise %48 oranında bir bozunma gözlenmiştir. Sıcaklık azaldıkça bu oran %43 (4 °C) ve %40 (-20 °C) olarak gerilemiştir (Şekil 4.55). TA içeriği açısından değerlendirildiğinde bu durum aydınlıktan

karanlığa geçildiğinde %56'dan %54'e düşmüş, ortam şartları soğuduğunda ise %54'ten %49 ve %41'e kadar azalma gözlenmiştir. Aynı durum *p*-Hidroksibenzoik asit için 2 aylık bir sürecin ardından %39'lardan %29'lara kadar inmiş, *p*-Kumarik asit için ise %42'den %32'ye kadar düşmüştür.

Tablo 4.67: OÇE yöntemi ile optimum koşullarda hazırlanmış şeftali kabuğu ekstraktlarının farklı saklama koşullarındaki TFM, TA, *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit değerleri.

Saklama Koşulları	TFM (mg-GAE/g-YM)		TA (mg-cyn-3-glu/g-YM)		<i>p</i> -Hidroksibenzoik Asit (mg /g-YM)		<i>p</i> -Kumarik Asit (mg /g-YM)	
	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu	Başlangıç	60 gün sonu
1 atm, 25°C Işık altında	117,09±0,013	59,52±0,001 ^a	7,10±0,005	3,10±0,001 ^a	4,63±0,003	2,83±0,001 ^a	24,86±0,005	14,45±0,001 ^a
1 atm, 25°C Karanlık	117,09±0,013	60,73±0,002 ^b	7,10±0,005	3,28±0,002 ^b	4,63±0,003	2,87±0,002 ^b	24,86±0,005	15,32±0,002 ^b
1 atm, 4°C Karanlık	117,09±0,013	66,79±0,003 ^c	7,10±0,005	3,64±0,005 ^c	4,63±0,003	3,02±0,001 ^c	24,86±0,005	16,42±0,004 ^c
1 atm, - 20°C Karanlık	117,09±0,013	70,42±0,001 ^d	7,10±0,005	4,19±0,003 ^d	4,63±0,003	3,29±0,003 ^d	24,86±0,005	16,95±0,001 ^d



Şekil 4.55: OÇE yöntemiyle hazırlanan şeftali kabuğu ekstraktlarının, farklı saklama koşullarında TPC (a), TA (b), *p*-Kumarik asit (c) ve *p*-Hidroksibenzoik asit (d) değerlerinin değişimi.

Otomatik çözücü ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen şeftali kabuğu ekstraktlarının özellikle karanlık ve aydınlık ortamlardaki bozunma oranları arasındaki farkın yüksek olmaması ve yine bozunma oranlarının diğer yöntemlerle elde edilen ekstraktlara göre daha düşük seviyelerde olması dikkat çekici ayrıntılardır. Bu durumda ekstrakt elde etme metodu da ürünün stabilitesi üzerine etkili bir parametredir şeklinde bir sonuç çıkarmak mümkündür. Bu durumda ürünün biyoaktif içeriğinin diğer yöntemlerle (HDE; MDE ve UDE) elde edilen ekstraktlara göre oldukça yüksek olmasının da etkisi olabilir. Yani ürün biyoaktif maddelerce ne kadar zengin ise ürünün bozunmaya karşı direnci yani kalitesi de o kadar yüksektir gibi bir sonuç çıkarılabilir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkisel gıdaların işlenmesi, fenolik bileşikler de dâhil olmak üzere zengin biyoaktif bileşik kaynakları olan yan ürünlerin üretilmesiyle sonuçlanmaktadır. Tarımsal ve endüstriyel atıklardaki fenolik bileşiklerin varlığı, bunların ekstraksiyonu ve antioksidan aktivitesi bu tezin başlama noktasını oluşturmaktadır. Ayrıca, yapılan araştırmalar neticesinde bazı meyvelerin kabuklarının yenilebilir etli kısımlardan daha yüksek miktarlarda fenolik içerdiği görülmüştür. Bu tez çalışmasında özellikle vişne ve şeftali kabuklarının araştırma metaryali olarak incelenmesinin nedeni de budur.

Bu tez çalışmasının her aşamasında yapılanları tek tek irdelemek gerekirse:

- Öncelikle seçilmiş olan potansiyel antioksidan kaynakları olan vişne ve şeftaliye ait atık yan ürünlerin değerlendirmesi yapılmıştır. Sonuçlar ilgili meyvelerin suları ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir.
- Vişne suyu endüstrisinde vişne mahsulünden vişne suyu ile beraber yan ürünler olan kabuk, posa, yaprak ve sap gibi katı atıklar da üretilmektedir. Çalışmaya hangi atıktan başlanacağına karar verebilmek için hepsinin karşılaştırmalı bir çalışması yürütülmüştür. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanarak, 30 mL % 80 etanol-su çözücü sistemi ile 0,5 g katı atık 500 W mikrodalga gücünde 90 s ekstrakte edilmiştir. Söz konusu şartlar ön denemelere dayanarak belirlenmiştir.
- En dikkat çekici ayrıntı, vişnenin suyunun atıklarına kıyasla daha az oranlarda biyoaktif bileşenler (fenolik bileşenler ve antosiyaninler gibi) içermesi ve daha az antioksidan kapasiteye sahip olması olmuştur. En yüksek toplam polifenol seviyesine vişne yaprakları sahipken, en yüksek antosiyanin değerini (yapraklarına kıyasla 49 kat daha fazla seviyede) vişne kabukları göstermiştir. Serbest radikal süpürme etkisi açısından değerlendirildiğinde söz konusu atık yan ürünlerin benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Antosiyanin açısından en zengin ekstraktı vişne kabuğu verdiği için ilerleyen çalışmalarda bu yan ürün potansiyel doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilmiştir.
- Diğer taraftan, şeftali suyu endüstrisi de esas olarak kabuk, posa ve yaprak ile temsil edilen büyük miktarlarda atık üretmektedir. Yine aynı şartlarda mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak atıklardan ekstraktlar elde edilmiş ve içeriklerindeki

toplam fenolik ve antosiyanin madde miktarları ve antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir. Her üç bağımlı değişken açısından da en yüksek içeriğe şeftali kabuklarının sahip olduğu gözlenmiştir. Kabukların şeftali posa ve suyuna göre 6-7 kat daha yüksek oranda fenolik madde içerdiği gözlenmiştir. Yapraklar dikkate alındığında da yine şeftali kabuklarının, şeftali yapraklarının içerdiğinin 6 katı antosiyanin içerdiği görülmüştür. Dolayısıyla, çalışmalara şeftali kabukları ile devam edilmiştir.

- Vişne ve şeftali katı atıklarına karar verildikten sonra çevre dostu ve ileri olarak kabul edilen Yeşil Ekstraksiyon olarak bilinen mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrasonik destekli ekstraksiyon, homojenizatör destekli ekstraksiyon ve otomatik çözücü ekstraksiyonu yöntemleri uygulanarak biyolojik olarak aktif bileşenlerce zengin ekstraktlar elde edilmiştir.
- Çalışma materyali olarak seçilmiş olan vişne ve şeftali kabuklarının sahip olduğu biyoaktif özellikler toplam fenolik, antosiyanin ve çeşitli testlerle (DPPH, CUPRAC ve ABTS) ölçülmüş olan antioksidan aktivite değerleri açısından değerlendirilmiştir. İlgili bağımlı değişkenler arasındaki korelasyon katsayıları aracılığıyla ilgili ilişkiyi doğrulamak için matematiksel ifadeler de oluşturulmuştur. Buna göre toplam fenolik ve toplam antosiyanin arasındaki matematiksel ifade sonucu üretilmiş olan korelasyon katsayısının 0,90 (vişne kabukları için) ve 0,84' ten (şeftali kabukları için) büyük değerler vermesi toplam antosiyaninlerin seçilen atık ürünlerin biyofenol kapasitesine katkısının ne derece yüksek olduğunu doğrulamaktadır.
- Diğer taraftan, farklı koşullarda elde edilmiş söz konusu vişne ve şeftali kabuğu özütlerinin antioksidan aktiviteleri 3 farklı metod ile in vitro olarak test edilmiştir. 3 antioksidan aktivite testi kullanılarak verilerin keskinliği ve güvenilirliği sorgulanmıştır.

Vişne kabuğu özütleri dikkate alındığında:

- Her bir test sonucunun birbiri arasındaki pozitif ve tatmin edici korelasyon ($> 0,83$) sonuçların doğruluğunu test etmektedir. Ayrıca, 3 yöntemle de ölçülen antioksidan aktivite test sonuçlarının toplam fenolik ve toplam antosiyanin değerleri arasındaki güçlü pozitif korelasyon ($> 0,79$), toplam biyofenollerin vişne kabuğunun antioksidan kapasitesine katkısını doğrulamaktadır.

Şeftali kabuğu özütleri dikkate alındığında:

- Her bir test sonucunun birbiri arasındaki pozitif ve tatmin edici korelasyon ($> 0,76$) sonuçların doğruluğunu test etmektedir. Ayrıca, 3 yöntemle de ölçülen antioksidan aktivite test sonuçlarının toplam fenolik ve toplam antosiyanin değerleri arasındaki güçlü pozitif korelasyon ($> 0,78$), toplam biyofenollerin vişne kabuğunun antioksidan kapasitesine katkısını doğrulamaktadır.
- Deneysel çalışmanın planlanması için istatistiksel deneysel tasarım yöntemi olan Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılmış ve Yüzey Merkezli Kompozit tasarımı uygulanmıştır. Deneysel tasarım uygulanmadan önce her bir ekstraksiyon prosesini etkileyen en önemli parametreler belirlenmiştir. Her bir yöntemin bağımsız değişkenleri belirlendikten sonra bu değişkenlerin seviyeleri ön denemeler ile belirlenmiştir. Ön denemelerde bağımlı değişken olarak ekstraktın fenolik içeriği dikkate alınmış ve seviyeler bu cevap değerinin değişimine (azalma ve/veya artma) göre belirlenmiştir.
- Bu çalışmadaki amaç yeşil teknolojiler kullanarak metod geliştirme olduğu için çevre dostu ve genellikle güvenilir olarak bilinen (Generally Recognized as Safe-GRAS) etanol çözücü olarak seçilmiştir. Zira hedef ürünler gıda, ilaç ve kozmetik gibi alanlarda doğal katkı maddesi olarak önerilmektedir.
- Tüm ekstraksiyon yöntemlerinde saf etanol kullanıldığında sulu etanole oranla daha düşük bir verim gözlenmiş ve bu durum polarite ile açıklanmıştır. Şöyle ki, etanole su ilave edildiğinde çözücünün polaritesi etkilenmekte ve polar fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu etkilemektedir. Alkol-su karışımlarının kullanılması, özütleme oranlarını tek bileşenli çözücü sisteminden daha fazla geliştirdiği için bu etki beklenen bir durumdur. Yani ikili sistemde etanol, çözünen maddenin çözünürlüğünü iyileştirirken, su matristen hedef bileşenin desorpsiyonuna katkıda bulunmaktadır. Dolayısıyla, ön deneme sonuçları da değerlendirilerek, seçilmiş olan tüm ekstraksiyon proseslerinde etanol konsantrasyon seviyesi hacimce % 20 ile 80 değerleri arasında seçilmiştir.
- Design-Expert paket programı (versiyon 12) kullanılarak uygulanan Yanıt Yüzey Yöntemi'nin Yüzey Merkezli Kompozit tasarımı ile sadece deneylerin istatistiksel tasarımı yapılmamış aynı zamanda her bir proses parametresinin ilgili prosese etkileri istatistiksel olarak varyans analizi (ANOVA) testi ile belirlenmiş, aynı zamanda ilgili yazılım ile çizilen üç boyutlu grafikler (3D) ile proses parametrelerinin etkileri görsel olarak da sunulmuştur. Yine Design-Expert yazılımı kullanılarak elde edilen ANOVA

testi ile istatistiksel parametreler de hesaplanmıştır. Bu parametreler F ve p-değerleri, uyum eksikliği (lack of fit) değeri, belirleme katsayısı (R^2), ayarlanmış (adjusted) belirleme katsayısı (R^2_a), tahmini (predicted) belirleme katsayısı (R^2_t) ve varyasyon katsayısı (CV) şeklindedir. Bu parametreler bu program ile türetilen ikinci dereceden modellerin söz konusu sistem için uygun olup olmadığının göstergeleridir. Son olarak Yüzey Merkezli Kompozit tasarımının Desing-Expert yazılımı ile her bir proses sistemi için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimizasyonda hedef en yüksek toplam fenolik ve antosiyanin verimlerini elde etmek için gerekli koşulları belirlemektir. Yani tüm sistemler için bağımlı (cevap) değişkenler toplam fenolik ve toplam antosiyanin içeriği ölçümleridir. Son olarak her bir ekstraksiyon prosesi için optimum koşullar belirlendikten sonra verilen koşulların doğruluğu validasyon çalışmaları ile test edilmiştir.

- Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde her iki ham madde için de aynı proses parametreleri ve seviyeleri kullanılmıştır. Mikrodalga gücü (350-500 W), ekstraksiyon süresi (30-90 s) ve etanol konsantrasyonu (%20-80, v/v) bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir.
- Vişne kabuklarından polifenolik bileşenlerce zengin bir ekstrakt eldesinde mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı sistemde, Yüzey Merkezli Kompozit tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek toplam fenolik madde (44,15 mg-GAE/ g-YM) ve toplam antosiyanin (12,47 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları 90 s, 500 W mikrodalga gücünde %80 etanol solvent sistemi ile elde edilmiştir. Her iki cevap değeri için de seçilmiş olan tüm parametreler sistemi istatistiksel ($p < 0,0001$) olarak etkilemiştir. Yine her iki ölçülen değer için en etkin proses parametresi F değeri en yüksek olan ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Ayrıca, p değerinin istatistiksel açıdan önemli olması ($p < 0,0001$), yüksek belirleme katsayıları ($> 0,97$), R^2_a ve R^2_t değerlerinin uyum içinde olması, CV değerlerinin %10'un altında olması ve uyum eksikliğinin etkisiz ($p > 0,05$) olması gibi istatistiksel göstergelere dayanarak, her iki sistem için türetilmiş olan ikinci dereceden model denklemlerin söz konusu deneysel verileri başarı ile temsil ettiği söylenebilir.
- Şeftali kabuklarından polifenolik bileşenlerce zengin bir ekstrakt eldesinde mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı sistemde, Yüzey Merkezli Kompozit

tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek toplam fenolik madde (19,35 mg-GAE/ g-YM) ve toplam antosiyanin (1,12 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları 90 s, 500 W mikrodalga gücünde %80 etanol solvent sistemi ile elde edilmiştir. Her iki cevap değeri için de seçilmiş olan tüm parametreler sistemi istatistiksel ($p < 0,005$) olarak etkilemiştir. Toplam fenolik madde açısından en etkin parametre ekstraksiyon süresiyken, antosiyanin açısından istatistiksel olarak en önemli değişken mikrodalga gücüdür. Ayrıca, yüksek belirleme katsayıları ($> 0,93$), R^2_a ve R^2 değerlerinin uyum içinde olması, p değerinin istatistiksel açıdan önemli olması ($p < 0,0001$), CV değerlerinin %10'un altında olması ve uyum eksikliğinin etkisiz ($p > 0,05$) olması gibi istatistiksel göstergelere dayanarak, her iki sistem için türetilmiş olan ikinci dereceden model denklemlerin söz konusu deneysel verileri başarı ile temsil ettiği söylenebilir.

- Ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde her iki ham madde için de aynı proses parametreleri ve seviyeleri kullanılmıştır. Enerjinin genliği (%10-50), katı madde miktarı (0,1-0,5 g) ve etanol konsantrasyonu (%20-80, v/v) bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir.
- Vişne kabuklarından polifenolik bileşenlerce zengin bir ekstrakt eldesinde ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı sistemde, Yüzey Merkezli Kompozit tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek toplam fenolik madde (47,59 mg-GAE/ g-YM) ve toplam antosiyanin (6,63 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları 0,1 g kabuk kullanarak, enerjinin %34,34'ü ile %80 etanol solvent sistemi ile elde edilmiştir. Her iki cevap değeri için de seçilmiş olan tüm parametreler sistemi istatistiksel ($p < 0,05$) olarak etkilemiştir. Toplam fenolik madde açısından en etkin parametre katı madde miktarıyken, antosiyanin açısından istatistiksel olarak en önemli parametre genliktir. Ayrıca, p değerinin istatistiksel açıdan önemli olması ($p < 0,0001$), yüksek belirleme katsayıları ($> 0,92$), R^2_a ve R^2 değerlerinin uyum içinde olması, CV değerlerinin %10'un altında olması ve uyum eksikliğinin etkisiz ($p > 0,05$) olması gibi istatistiksel göstergelere dayanarak, her iki sistem için türetilmiş olan ikinci dereceden model denklemlerin söz konusu deneysel verileri başarı ile temsil ettiği söylenebilir.
- Şeftali kabuklarından polifenolik bileşenlerce zengin bir ekstrakt eldesinde ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı sistemde, Yüzey Merkezli Kompozit

tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek toplam fenolik madde (12,64 mg-GAE/ g-YM) ve toplam antosiyanin (0,107 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları 0,1 g kabuk kullanarak, enerjinin %10'u ile %30,3 etanol solvent sistemi ile elde edilmiştir. Her iki cevap değeri için de seçilmiş olan tüm parametreler içerisinde sistemi istatistiksel olarak etkileyen en önemli parametre katı madde miktarıdır. Ayrıca, p değerinin önemli olması ($p < 0,0001$), yüksek belirleme katsayıları ($> 0,96$), R^2_a ve R^2 değerlerinin uyum içinde olması, CV değerlerinin %10'un altında olması ve uyum eksikliğinin etkisiz ($p > 0,05$) olması gibi istatistiksel göstergelere dayanarak, her iki sistem için türetilmiş olan ikinci dereceden model denklemlerin söz konusu deneysel verileri başarı ile temsil ettiği söylenebilir.

- Homojenizatör destekli ekstraksiyon yönteminde her iki ham madde için de aynı proses parametreleri ve seviyeleri kullanılmıştır. Katı madde miktarı (0,1-0,5 g), karıştırma hızı (6000-10000 rpm), zaman (60-90 s) ve etanol konsantrasyonu (%20-80, v/v) bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir.
- Vişne kabuklarından biyolojik olarak aktif bileşenlerce zengin bir ekstrakt eldesinde homojenizatör destekli ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı sistemde, Yüzey Merkezli Kompozit tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek toplam fenolik madde (24,95 mg-GAE/ g-YM) ve toplam antosiyanin (4,23 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları 0,1 g kabuk kullanarak, 10000 rpm'de 75 s %40 etanol solvent sistemi ile elde edilmiştir. Her iki cevap değeri için de seçilmiş olan tüm parametreler içerisinde sistemi etkileyen en önemli bağımsız değişken katı madde miktarıdır ($p < 0,0001$). Ayrıca, yüksek belirleme katsayıları ($> 0,93$), p değerinin istatistiksel açıdan önemli olması ($p < 0,0001$), CV değerlerinin %10'un altında olması ve uyum eksikliğinin etkisiz ($p > 0,05$) olması gibi istatistiksel göstergelere dayanarak, her iki sistem için türetilmiş olan ikinci dereceden model denklemlerin söz konusu deneysel verileri başarı ile temsil ettiği söylenebilir.
- Şeftali kabuklarından biyolojik olarak aktif bileşenlerce zengin bir ekstrakt eldesinde homojenizatör destekli ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı sistemde, Yüzey Merkezli Kompozit tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek toplam fenolik madde (22,94 mg-GAE/ g-YM) ve toplam antosiyanin

(2,52 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları 0,1 g kabuk kullanarak, 6000 rpm'de 80 s %20 etanol solvent sistemi ile elde edilmiştir. Toplam fenolik madde verimi açısından söz konusu sistemi etkileyen en önemli parametre şeftali kabuğu miktarıdır ve bunu etanol konsantrasyonu takip etmiştir ($p<0,0001$). Diğer bağımsız değişkenler istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$). Diğer taraftan, toplam antosiyanin verimi açısından tüm proses değişkenleri sistemi önemli derecede etkilemiş ve bunlar içerisinde en etkili olan etanol konsantrasyonu olmuştur ($p<0,0001$). Her iki cevap değeri için de seçilmiş olan tüm parametreler içerisinde sistemi etkileyen en önemli bağımsız değişken katı madde miktarıdır ($p<0,0001$). Ayrıca, yüksek belirleme katsayıları ($> 0,98$), R_a^2 ve R_t^2 değerlerinin uyum içinde olması, p değerinin istatistiksel açıdan önemli olması ($p<0,0001$), CV değerlerinin %10'un altında olması ve uyum eksikliğinin etkisiz ($p>0,05$) olması gibi istatistiksel göstergelere dayanarak, her iki sistem için türetilmiş olan ikinci dereceden model denklemlerin söz konusu deneysel verileri başarı ile temsil ettiği söylenebilir.

- Otomatik çözücü ekstraksiyon yönteminde her iki ham madde için de aynı proses parametreleri ve seviyeleri kullanılmıştır. Daldırma süresi (10-30 dk), yıkama süresi (40-60 dk), katı madde miktarı (0,1-0,5 g) ve etanol konsantrasyonu (%20-80, v/v) bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir.
- Vişne kabuklarından biyolojik olarak aktif bileşenlerce zengin bir ekstrakt eldesinde otomatik çözücü ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı sistemde, Yüzey Merkezli Kompozit tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek toplam fenolik madde (119,64 mg-GAE/ g-YM) ve toplam antosiyanin (24,31 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları 23,8 dk daldırma ve 52,26 dk yıkama süresince 0,1 g kabuk kullanarak %80 etanol solvent sistemi ile elde edilmiştir. Her iki cevap değeri için de seçilmiş olan tüm parametreler sistemi istatistiksel olarak etkilemiştir ($p<0,05$). Fenolik madde açısından bakıldığında sistemi etkileyen en önemli bağımsız değişken daldırma süresidir ve bunu etanol konsantrasyonu takip etmektedir ($p<0,0001$). Antosiyaninler açısından değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak en etkili bağımsız değişken vişne kabuğu miktarıdır ve bunu çözücü konsantrasyonu takip etmektedir ($p<0,0001$). Ayrıca, yüksek belirleme katsayıları ($> 0,95$), p değerinin istatistiksel açıdan önemli olması ($p<0,0001$),

CV değerlerinin %10'un altında olması ve uyum eksikliğinin etkisiz ($p>0,05$) olması gibi istatistiksel göstergelere dayanarak, her iki sistem için türetilmiş olan ikinci dereceden model denklemlerin söz konusu deneysel verileri başarı ile temsil ettiği söylenebilir.

- Şeftali kabuklarından biyolojik olarak aktif bileşenlerce zengin bir ekstrakt eldesinde otomatik çözücü ekstraksiyon yönteminin kullanıldığı sistemde, Yüzey Merkezli Kompozit tasarımının Desing-Expert yazılımı ile yapılan optimizasyon çalışmasına göre, en yüksek toplam fenolik madde (117,32 mg-GAE/ g-YM) ve toplam antosiyanin (7,47 mg-cyn-3-glu/ g-YM) verimlerini elde etmek için gerekli en iyi proses şartları 25,4 dk daldırma ve 48,5 dk yıkama süresince 0,11 g kabuk kullanarak %75 etanol solvent sistemi ile elde edilmiştir. Fenolik madde açısından bakıldığında sistemi etkileyen en önemli bağımsız değişken şeftali kabuğu miktarıdır ve bunu çözücü konsantrasyonu takip etmektedir ($p<0,0001$). Antosiyaninler açısından değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak en etkili bağımsız değişken vişne kabuğu miktarıdır ve bunu sırasıyla daldırma süresi ve çözücü konsantrasyonu takip etmektedir ($p<0,0001$). Ayrıca, yüksek belirleme katsayıları ($> 0,98$), R^2_a ve R^2_t değerlerinin uyum içinde olması, p değerinin istatistiksel açıdan önemli olması ($p<0,0001$), CV değerlerinin %10'un altında olması ve uyum eksikliğinin etkisiz ($p>0,05$) olması gibi istatistiksel göstergelere dayanarak, her iki sistem için türetilmiş olan ikinci dereceden model denklemlerin söz konusu deneysel verileri başarı ile temsil ettiği söylenebilir.
- Dört farklı ileri ayırma yöntemi kullanılarak vişne ve şeftali kabukları ekstrakte edilirken, her bir sistemin deneysel tasarımı ve optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiş, elde edilen ekstraktların içeriğindeki toplam fenolik ve antosiyanin değerlerinin maksimum olması hedeflenerek optimum koşullar belirlenmiştir. Vişne kabukları söz konusu olduğunda gerek toplam fenolik gerek toplam antosiyanin gerekse de ekstraktın içeriğindeki en temel bireysel polifenol olan siyanidin-3-glukozit içeriği açısından en yüksek verim, otomatik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Bu performansı mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi izlemiştir. Homojenizatör destekli ekstraksiyon yöntemi, vişne kabuklarının ekstraksiyonunda en düşük performanslı bir yöntem olarak gözlenmiştir. En başarılı yöntem ile kıyasladığımızda yaklaşık 19 katlık bir fark olduğunu görebiliriz (bireysel fenolik bileşen açısından). Özetle, yeşil bir teknoloji olarak çok yakın bir zamanda geliştirilmiş alternatif bir

yöntem olan otomatik çözücü ekstraksiyonu, önceki geliştirilen yöntemlere göre neredeyse iki kat (mikrodalga destekli ekstraksiyon), 11 kat (ultrasonik destekli ekstraksiyon) ve 19 kat (homojenizatör destekli ekstraksiyon) daha başarılı performans göstermiştir.

- Şeftali kabukları söz konusu olduğunda ise gerek toplam fenolik gerek toplam antosiyanin gerekse de ekstraktın içeriğindeki en temel bireysel fenolik bileşenler olan *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içeriği açısından en yüksek verim, yine otomatik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Tüm yöntemler ile elde edilen ölçümler istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu performansı toplam fenolik ve antosiyaninler açısından homojenizatör destekli ekstraksiyon yöntemi izlemiştir. Bireysel bileşenler açısından (*p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri) ise en yüksek performansı mikrodalga teknolojisi takip etmektedir. Sonuç olarak, otomatik çözücü ekstraksiyon teknolojisi, önceki geliştirilen yöntemlere göre pek çok açılarından (toplam fenolik ve antosiyanin, *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit içerikleri) belirgin oranlarda (~3, 5, 6, 9, 11, 15, 70 kat gibi) farklar göstererek en yüksek sonuçları sergilemiştir. Karşılaştırma yaparken, bu yöntemin başarısını takip eden homojenizatör yönteminin de yatırım maliyeti oldukça düşük ve işletim maliyeti (oda sıcaklığında ve sadece birkaç dakika süren ekstraksiyon) de makul basit bir sistem olduğu göz önünde bulundurulması gereken ayrıntılardır.
- Vişne ve şeftali kabuklarının yapılarındaki morfolojik değişimler taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir.
- Optimizasyon çalışması, özütleyici olarak sulu alkol çözeltisinin kullanıldığı en iyi koşulları belirlendikten sonra, bu özütleyici ortamı sürdürülebilir bir ortam olarak önermek için, seçilen yöntemler ile üretilen vişne kabuğu ve şeftali kabuğu özütleri, çeşitli koşullara maruz bırakılmıştır. Sırasıyla dondurucu (-20 °C), buzdolabı (4 °C) ve oda sıcaklığı (25 °C) koşullarında tutulmasıyla ürünlerin saklama stabiliteleri değerlendirilmiştir. Bununla beraber güneş ışınlarının oksidasyona etkisi olup, bozunmayı hızlandırıcı bir faktör olup olmadığı da değerlendirilmiştir. Ürünler toplam fenolik ve antosiyanin içerikleri ve majör bireysel fenolik komponentleri açılarından periyodik olarak 60 gün boyunca test edilmişlerdir.
- Her iki ürün için de en dikkat çeken bulgunun her ölçülen kalite parametresi değeri için de oda sıcaklığı ve aydınlık bir ortamda muhafaza edilen örnek içerisindeki biyoaktif

içeriğın bozunma oranının en yüksek olmasıdır. Daha açık bir şekilde ifade etmek gerekirse biyoaktif özelliklerdeki azalmanın en çok ışıktı depolanan ürünlerde olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, elde edilen bulgulara dayanarak ortam sıcaklığında biyoaktif bileşenler üzerinde doğrudan etkili olduğu söylenebilir. Depolama sıcaklığının artması ile beraber bozunma hızının ve oranında düzenli olarak arttığı görülmüştür.

- Stabilité çalışması sırasında elde edilen en önemli gözlemlerden birisi de otomatik çözücü ekstraksiyon yöntemi kullanılarak elde edilen ürünlerin özellikle karanlık ve aydınlık ortamlardaki bozunma oranları arasındaki farkın yüksek olmaması ve yine bozunma oranlarının diğer yöntemlerle elde edilen ekstraktlara göre daha düşük seviyelerde olmasıdır. Bu durumda ekstrakt elde etme metodu da ürünün stabilitesi üzerine etkili bir parametredir şeklinde bir sonuç çıkarmak mümkündür. Diğer taraftan, bu bulguya sebep olan bir diğer önemli detay ise bu yöntemle elde edilen ürünlerin içeriğinin diğer yöntemlerle (homojenizatör, ultrasonik ve mikrodalga destekli ekstraksiyonlar) elde edilenlerden çok daha yüksek oranlarda biyoaktif madde içermesi olabilir. Yani ürün biyoaktif maddelerce ne kadar zengin ise ürünün bozunmaya karşı direnci yani kalitesi de o kadar yüksektir gibi bir sonuç çıkarılabilir.

KAYNAKLAR

- Adil, İ. H., 2006. *Pressurized Liquid Extraction of Phenolic Compounds From Fruit Pomaces*, Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- Akdağ, E., 2011. *Türkiye Meyve Suyu vb Ürünler Sanayi Raporu*. İstanbul.
- Akhbari, M., Hamed, S. ve Aghamiri, Z., 2019. Optimization of total phenol and anthocyanin extraction from the peels of eggplant (*Solanum melongena* L.) and biological activity of the extracts. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4), 3183–3197. doi:10.1007/s11694-019-00241-1
- Akowi, G. A. ve Zari, I., 2010. Effect of Extraction Temperature on Stability of Major Polyphenols and Antioxidant Activity of *Orthosiphon stamineus* Leaf. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 16(3–4), 160–166. doi:10.1080/10496475.2010.509652
- Alara, O. R., Abdurrahman, N. H. ve Ukaegbu, C. I., 2018. Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11, 12–17. doi:10.1016/j.jarmap.2018.07.003
- Alasavar, C. ve Shahidi, F., 2008. *Tree Nuts: Composition, Phytochemicals, and Health Effects - 1st ed.*, CRC Press, Boca Raton, ISBN: 9780849337352.
- Albarri, R., Toprakçı, İ., Kurtulbaş, E. ve Şahin, S., 2021. Estimation of diffusion and mass transfer coefficients for the microwave-assisted extraction of bioactive substances from *Moringa oleifera* leaves. *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi:10.1007/s13399-021-01443-8
- Amarowicz, R. ve Pegg, R. B., 2019. *Natural antioxidants of plant origin*. *Advances in Food and Nutrition Research* (1. bs., C. 90). Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.011
- Ameer, K., Bae, S. W., Jo, Y., Lee, H. G., Ameer, A. ve Kwon, J. H., 2017. Optimization of microwave-assisted extraction of total extract, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves, using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) modelling. *Food Chemistry*, 229, 198–207. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.121
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Bektaşoğlu, B. ve Bener, M., 2008. Cupric ion reducing antioxidant capacity assay for food antioxidants: Vitamins, polyphenolics, and flavonoids in food extracts. *Methods in Molecular Biology*, 477, 163–193. doi:10.1007/978-1-60327-517-0_14
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Çelik, S. E., 2008. Original Paper Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta*, 413–419. doi:10.1007/s00604-007-0777-0
- Aryee, A. N. A. ve Simpson, B. K., 2009. Comparative studies on the yield and quality of solvent-extracted oil from salmon skin. *Journal of Food Engineering*, 92(3), 353–358.

doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.12.011

- Ateş, F., Şahin, S., İlbay, Z. ve Kırbaşlar, Ş. İ., 2017. A Green Valorisation Approach Using Microwaves and Supercritical CO₂ for High-Added Value Ingredients from Mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) Leaf Waste. *Waste and Biomass Valorization*, 1–14. doi:10.1007/s12649-017-0074-z
- Aydın, B. ve Aktürk, D., 2018. Energy use efficiency and economic analysis of peach and cherry production regarding good agricultural practices in Turkey: A case study in çanakkale province. *Energy*, 158, 967–974. doi:10.1016/j.energy.2018.06.087
- Bai, X. L., Yue, T. L., Yuan, Y. H. ve Zhang, H. W., 2010. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis. *Journal of Separation Science*, 33(23–24), 3751–3758. doi:10.1002/jssc.201000430
- Ballard, T. S., Mallikarjunan, P., Zhou, K. ve O’Keefe, S., 2010. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), 1185–1192. doi:10.1016/j.foodchem.2009.11.063
- Benayad, Z., Martinez-Villaluenga, C., Frias, J., Gomez-Cordoves, C. ve Es-Safi, N. E., 2014. Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 62, 412–420. doi:10.1016/j.indcrop.2014.08.046
- Berger, P. D., Maurer, R. E. ve Celli, G. B., 2002. *Experimental Design* (2. bs.), Springer, Cham, Switzerland, ISBN: 978-3-319-64583-4
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. ve Escaleira, L. A., 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019
- Bhardwaj, S. K., Dwivedia, K. ve Agarwala, D. D., 2015. A Review: HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5(4), 76–81.
- Bilgin, M. ve Şahin, S., 2013. Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. doi:10.1016/j.jtice.2012.08.008
- Bilgin, M., Sahin, S., Dramur, M. U. ve Sevgili, L. M., 2013. Obtaining Scarlet Sage (*Salvia Coccinea*) Extract Through Homogenizer- And Ultrasound-Assisted Extraction Methods. *Chemical Engineering Communications*, 200(9), 1197–1209. doi:10.1080/00986445.2012.742434
- Blainski, A., Lopes, G. ve de Mello, J., 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from Limonium Brasiliense L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865. doi:10.3390/molecules18066852
- Blando, F. ve Oomah, B. D., 2019. Sweet and sour cherries: Origin, distribution, nutritional

- composition and health benefits. *Trends in Food Science and Technology*, 86(February), 517–529. doi:10.1016/j.tifs.2019.02.052
- Boeing, J. S., Barizão, É. O., Costa, B. ve Montanher, P. F., 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries : application of principal component analysis, 1–9.
- Cassol, L., Rodrigues, E., Pelayo, C. ve Noreña, Z., 2019. Extracting phenolic compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyx using microwave assisted extraction. *Industrial Crops and Products*, 133, 168–177.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V. ve Cravotto, G., 2019. Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.trac.2019.05.037
- Chemat, F. ve Cravotto, G., 2013. *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds. Food Engineering Series Series*, 1st ed., New York, Springer. ISBN: 978-1-4614-4830-3.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S. ve Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.06.035
- Chen, C., Shao, Y., Tao, Y. ve Wen, H., 2015. Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria polysaccharides* using RSM, and their biological activity. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1263–1269. doi:10.1016/j.lwt.2015.07.009
- Chen, M., Zhao, Y. ve Yu, S., 2015. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, 543–550. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.110
- Clifford, M. N., 2000. Chlorogenic acids and other cinnamates - Nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. John Wiley and Sons Ltd.
- Corradini, E., Foglia, P., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R. ve Laganà, A., 2011. Natural Product Research Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Product Research*, 25(5), 469–495. doi:10.1080/14786419.2010.482054
- Cortés-Rojas, D. F., Souza, C. R. F. ve Oliveira, W. P., 2016. Assessment of stability of a spray dried extract from the medicinal plant *Bidens pilosa* L. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences*, 28(2), 141–146. doi:10.1016/j.jksues.2014.04.004
- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O. ve Spigno, G., 2013. Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants : Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops & Products*, 50, 77–87. doi:10.1016/j.indcrop.2013.07.013

- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H. ve Madani, K., 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166, 585–595. doi:10.1016/j.foodchem.2014.06.066
- Damar, I. ve Ekşi, A., 2012. Antioxidant capacity and anthocyanin profile of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) juice. *Food Chemistry*, 135(4), 2910–2914. doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.032
- Deng, G.-F., Shen, C., Xu, X.-R., Kuang, R.-D., Guo, Y.-J., Zeng, L.-S., Li, H.-B., 2012. Potential of Fruit Wastes as Natural Resources of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 13. doi:10.3390/ijms13078308
- Deveci, E. Ü., 2008. *Portakal Atıklarından Aspergillus Niger Filamentli Fungusu Kullanılarak Sitrik Asit Üretiminde Değerlendirilmesi*. Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi.
- Dillard, C. J. ve Bruce German, J., 2000. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (12), 1744 -1756.
- Doughari, J. H., Human, I. S., Bennade, S. ve Ndakidemi, P. A., 2009. Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *ournal of Medicinal Plants Research*, 11(3), 839–848.
- Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V., Režek Jambrak, A. ve Jukić, M., 2013. The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117(4), 437–442. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.12.043
- Elhussein, E. A. A., Kurtulbaş, E., Bilgin, M., Birteksöz Tan, A. S., Hacıoğlu, M. ve Şahin, S., 2018. Screening of the most consumed beverages and spices for their bioactive non-nutrient contents. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2289–2301. doi:10.1007/s11694-018-9846-9
- Eriksson, M. ve Spångberg, J., 2017. Carbon footprint and energy use of food waste management options for fresh fruit and vegetables from supermarkets. *Waste Management*, 60, 786–799. doi:10.1016/j.wasman.2017.01.008
- Esparza, I., Jiménez-Moreno, N., Bimbela, F., Ancín-Azpilicueta, C. ve Gandía, L. M., 2020. Fruit and vegetable waste management: Conventional and emerging approaches. *Journal of Environmental Management*, 265:110510.
- Eyiz, V., Tontul, I. ve Turker, S., 2020. Optimization of green extraction of phytochemicals from red grape pomace by homogenizer assisted extraction. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(1), 39–47. doi:10.1007/s11694-019-00265-7
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z. ve Chen, D., 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 155–160. doi:10.1016/j.lwt.2007.01.019
- FAO, 2018, *Agricultural statistics*, [Ziyaret tarihi: 15.02.2021].

FAO, 2021, *Agricultural statistics*, [Ziyaret tarihi: 15.02.2021].

Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., dos Santos, W. N. L., 2007. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier. doi:10.1016/j.aca.2007.07.011

Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A. ve Neri, D., 2010. Cherry antioxidants: From farm to table. *Molecules*, 15(10), 6993–7005. doi:10.3390/molecules15106993

Galanakis, C. M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier. doi:10.1016/j.tifs.2012.03.003

Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., Tiwari, B., Sweeney, T. ve O'Doherty, J., 2018. Extraction and Yield Optimisation of Fucose, Glucans and Associated Antioxidant Activities from *Laminaria digitata* by Applying Response Surface Methodology to High Intensity Ultrasound-Assisted Extraction. *Marine Drugs*, 16(8), 257. doi:10.3390/md16080257

Garrido, T., Gizdavic-Nikolaidis, M., Leceta, I., Urdanpilleta, M., Guerrero, P., de la Caba, K. ve Kilmartin, P. A., 2019. Optimizing the extraction process of natural antioxidants from chardonnay grape marc using microwave-assisted extraction. *Waste Management*, 88, 110–117. doi:10.1016/j.wasman.2019.03.031

Gazolu-Rusanova, D., Lesov, I., Tcholakova, S., Denkov, N. ve Ahtchi, B., 2020. Food grade nanoemulsions preparation by rotor-stator homogenization. *Food Hydrocolloids*, 102, 105579. doi:10.1016/j.foodhyd.2019.105579

Geiss, O., Senaldi, C., Bianchi, I., Lucena, A., Tirendi, S. ve Barrero-moreno, J., 2018. A fast and selective method for the determination of 8 carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in rubber and plastic materials. *Journal of Chromatography A*, 1566, 13–22. doi:10.1016/j.chroma.2018.06.047

Gelman, A., Tjur, T., McCullagh, P., Hox, J., Hoijsink, H. ve Zaslavsky, A. M., 2005. Discussion paper analysis of variance - Why it is more important than ever. *Annals of Statistics*, 33(1), 1–53. doi:10.1214/009053604000001048

Ghafari, S., Aziz, H. A., Isa, M. H. ve Zinatizadeh, A. A., 2009. Application of response surface methodology (RSM) to optimize coagulation-flocculation treatment of leachate using poly-aluminum chloride (PAC) and alum. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2–3), 650–656. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.07.090

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(11), 4988–4994. doi:10.1021/jf9001439

Gören, S. ve Ozdemir, F., 2010. Regulation of waste and waste management in Turkey. *Waste Management & Research*, 29(4), 433–441. doi:10.1177/0734242X10378887

Gouveia, L. ve Empis, J., 2003. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal

- extracts, biomass and fish feed: Effect of storage conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4(2), 227–233. doi:10.1016/S1466-8564(03)00002-X
- Gu, L. B., Zhang, G. J., Du, L., Du, J., Qi, K., Zhu, X. L., ... Jiang, Z. H., 2019. Comparative study on the extraction of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge (yellow horn) seed oil using subcritical n-butane, supercritical CO₂, and the Soxhlet method. *LWT*, 111, 548–554. doi:10.1016/j.lwt.2019.05.078
- Guldiken, B., Boyacioglu, D. ve Capanoglu, E., 2016. Optimization of Extraction of Bioactive Compounds from Black Carrot Using Response Surface Methodology (RSM). *Food Analytical Methods*, 1876–1886. doi:10.1007/s12161-015-0370-9
- Gupta, N., Poddar, K., Sarkar, D., Kumari, N., Padhan, B. ve Sarkar, A., 2019. Fruit waste management by pigment production and utilization of residual as bioadsorbent. *Journal of Environmental Management*, 244, 138–143. doi:10.1016/j.jenvman.2019.05.055
- Gupta, V., Jain, A. D. K., Gill, N. S. ve Gupta, K., 2012. Development and validation of HPLC method - a review. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 2(4), 17–25.
- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., ... Xia, W., 2009. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 63–70. doi:10.1016/j.seppur.2009.08.012
- He, K., Li, X., Chen, X., Ye, X., Huang, J., Jin, Y., ... Shu, H., 2011. Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), 1135–1142. doi:10.1016/j.jep.2011.07.033
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R. ve Bobilya, D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. Elsevier. doi:10.1016/S0955-2863(02)00208-5
- Huang, D., Boxin, O. U. ve Prior, R. L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. doi:10.1021/jf030723c
- Hudson, B. J. F., 1990. *Food Antioxidants*. 1st ed. United Kingdom, Elsevier Applied Science., ISBN-10 : 9401068240.
- Ilaiyaraja, N., Likhith, K. R., Sharath Babu, G. R. ve Khanum, F., 2015. Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 173, 348–354. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.035
- Ilbay, Z., Şahin, S. ve Kirbaşlar, Ş. I., 2013. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(11), 2804–2809.
- Jamei, R., 2006. The Effects of Light, Storage Temperature, pH and Variety on Stability of

- Anthocyanin Pigments in Four Malus Varieties. *Article in Pakistan Journal of Biological Sciences*. doi:10.3923/pjbs.2006.428.433
- Kano, T., Aota, Y. ve Maruoka, K., 2016. Rate Acceleration of Solid-Liquid Phase-Transfer Catalysis by Rotor-Stator Homogenizer. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 358(18), 2996–2999. doi:10.1002/adsc.201600425
- Kant, R., Shukla, R. K. ve Shukla, A., 2018. A Review on Peach (*Prunus persica*): An Asset of Medicinal Phytochemicals. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, 6(1), 2186–2200. doi:10.22214/ijraset.2018.1342
- Karabegović, I. T., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nada, Č. ve Lazić, M. L., 2014. Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Cherry Laurel Fruit. *Separation Science and Technology*, 49, 416–423. doi:10.1080/01496395.2013.838967
- Karak, P., 2019. Biological Activities of Flavonoids: an Overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567. doi:10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T. ve Lim, S. M., 2017. Anthocyanidins and anthocyanins : colored pigments as food , pharmaceutical ingredients , and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1). doi:10.1080/16546628.2017.1361779
- Kołodziejczyk, K., Sójka, M., Abadias, M., Viñas, I., Guyot, S. ve Baron, A., 2013. Polyphenol composition, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of the extracts obtained from industrial sour cherry pomace. *Industrial Crops and Products*, 51, 279–288. doi:10.1016/j.indcrop.2013.09.030
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. ve Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*. Elsevier. doi:10.1016/j.fbp.2010.04.008
- Kumar, N. ve Goel, N., 2019. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.btre.2019.e00370
- Kurtulbaş, E., Yazar, S., Makris, D. ve Şahin, S., 2019. Optimization of Bioactive Substances in the Wastes of Some Selective Mediterranean Crops. *Beverages*, 5(3), 42. doi:10.3390/beverages5030042
- Lapornik, B., Prošek, M. ve Wondra, A. G., 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 214–222. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.10.036
- Lee, J., Durst, R. W. ve Wrolstad, R. E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278. doi:10.1093/jaoac/88.5.1269
- Leopoldini, M., Marino, T., Russo, N. ve Toscano, M., 2004. Antioxidant properties of phenolic

- compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916–4922. doi:10.1021/jp037247d
- Letellier, M. ve Budzinski, H., 1999. Original articles Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27, 259–271.
- Liu, C., Li, M., Liang, C. ve Wang, W., 2013. Measurement and analysis of bimodal drop size distribution in a rotor-stator homogenizer. *Chemical Engineering Science*, 102, 622–631. doi:10.1016/j.ces.2013.08.030
- Liu, H., Cao, J. ve Jiang, W., 2015. Evaluation and comparison of vitamin C, phenolic compounds, antioxidant properties and metal chelating activity of pulp and peel from selected peach cultivars. *LWT - Food Science and Technology*, 63(2), 1042–1048. doi:10.1016/j.lwt.2015.04.052
- Liu, H., Jiang, W., Cao, J. ve Ma, L., 2018. Evaluation of antioxidant properties of extractable and nonextractable polyphenols in peel and flesh tissue of different peach varieties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(6), e13624. doi:10.1111/jfpp.13624
- Llompарт, M., Garcia-Jares, C., Celeiro, M. ve Dagnac, T., 2019. Extraction | Microwave-Assisted Extraction. *Encyclopedia of Analytical Science*, 3(June 2018), 67–77. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14442-7.
- López-Bascón-Bascon, M. A. ve Luque de Castro, M. D., 2019. Soxhlet extraction. *Liquid-Phase Extraction* içinde (ss. 327–354). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-816911-7.00011-6.
- Luque de Castro, M. D. ve Priego-Capote, F., 2010. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*. Elsevier. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.027.
- Malik, N. S. A. ve Bradford, J. M., 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina” olives. *Scientia Horticulturae*, 110(3), 274–278. doi:10.1016/j.scienta.2006.07.016.
- Manzoor, M., Anwar, F., Mahmood, Z., Rashid, U. ve Ashraf, M., 2012. Variation in Minerals, Phenolics and Antioxidant Activity of Peel and Pulp of Different Varieties of Peach (*Prunus persica* L.) Fruit from Pakistan. *Molecules*, 17(6), 6481–6490. doi:10.3390/molecules17066491.
- Martins, S., Mussatto, S. I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N. ve Teixeira, J. A., 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*. Elsevier. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.008.
- Middleton, E., 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 439, 175–182. doi:10.1007/978-1-4615-5335-9_13.
- Mishra, K., Ojha, H. ve Chaudhury, N. K., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4),

- 1036–1043. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.127.
- Mohamad Said, K. A. ve Mohamed Amin, M. A., 2016. Overview on the Response Surface Methodology (RSM) in Extraction Processes. *Journal of Applied Science & Process Engineering*, 2(1), 8–17. doi:10.33736/jaspe.161.2015.
- Mónica Giusti, M. ve Wrolstad, R. E., 2005. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2–2, 19–31. doi:10.1002/0471709085.ch18.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., ... Carlos Parajó, J., 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*. Elsevier. doi:10.1016/S0308-8146(00)00223-5.
- Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S. ve Teixeira, J. A., 2011. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*. doi:10.1016/j.seppur.2011.09.036.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Geoffrey Vining, G., Borror, C. M. ve Kowalski, S. M., 2004. Response Surface Methodology: A Retrospective and Literature Survey. *Journal of Quality Technology*, 36(1), 53–77. doi:10.1080/00224065.2004.11980252.
- Nagula, R. L. ve Wairkar, S., 2019. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.jconrel.2019.01.029.
- Nayik, G. A., 2020. *Antioxidants in Fruits: Properties and Health Benefits*. (A. Gull, Ed.) Springer Nature (1st bs.). Springer Singapore.
- Newman, M. ve Kirker, C. L., 2021. *Cherry*, 1st ed., Reaktion Books, ISBN-10 : 1789142822.
- Nimse, S. B. ve Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006. doi:10.1039/c4ra13315c
- Nollet, L. M. L. ve Toldra, F., 2013. *Food Analysis by HPLC*. 3rd ed., CRC Press, ISBN-10: 1439830843.
- Oancea, S., Grosu, C., Ketney, O. ve Stoia, M., 2013. Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars. *Acta Chimica Slovenica*, 60(2), 383–389.
- Ordóñez-Santos, L. E. ve Garzón-García, A. M., 2021. Optimizing homogenizer-assisted extraction of chlorophylls from plantain epicarp (*Musa paradisiaca* L.). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 1108–1115. doi:10.1007/s11694-020-00703-x
- Özyürek, M., Güçlü, K., Tütem, E., Bakan, K. S., Erçağ, E., Esin Çelik, S., ... Apak, R., 2011. A comprehensive review of CUPRAC methodology. *Analytical Methods*. Royal Society of Chemistry. doi:10.1039/c1ay05320e
- Pan, X., Niu, G. ve Liu, H., 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42(2), 129–133.

doi:10.1016/S0255-2701(02)00037-5.

- Pandey, A., Belwal, T., Sekar, K. C., Bhatt, I. D. ve Rawal, R. S., 2018. Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). *Industrial Crops and Products*, 119, 218–225. doi:10.1016/j.indcrop.2018.04.019
- Pereira, G. A., Molina, G., Arruda, H. S. ve Pastore, G. M., 2017. Optimizing the Homogenizer-Assisted Extraction (HAE) of Total Phenolic Compounds from Banana Peel. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), e12438. doi:10.1111/jfpe.12438
- Petersson, E. V., Liu, J., Sjöberg, P. J. R., Danielsson, R. ve Turner, C., 2010. Pressurized Hot Water Extraction of anthocyanins from red onion: A study on extraction and degradation rates. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2010.01.023
- Pham-Huy, L. A., He, H. ve Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. Master Publishing Group. www.ijbs.org adresinden erişildi.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B. ve Periyasamy, L., 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. Springer India. doi:10.1007/s12291-014-0446-0.
- Pisoschi, A. M. ve Negulescu, G. P., 2012. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 01(01), 1–10. doi:10.4172/2161-1009.1000106.
- Plazzotta, S., Ibarz, R., Manzocco, L. ve Martín-Belloso, O., 2020. Optimizing the antioxidant biocompound recovery from peach waste extraction assisted by ultrasounds or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 63, 104954. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104954.
- Poljsak, B., Šuput, D. ve Milisav, I., 2013. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 11. doi:10.1155/2013/956792.
- Pyrzyska, K. ve Pekal, A., 2013. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5, 4288–4295. doi:10.1039/c3ay40367j.
- Rajha, H. N., Darra, N. El, Hobaika, Z., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G. ve Louka, N., 2014. Extraction of Total Phenolic Compounds, Flavonoids, Anthocyanins and Tannins from Grape Byproducts by Response Surface Methodology. Influence of Solid-Liquid Ratio, Particle Size, Time, Temperature and Solvent Mixtures on the Optimization Process. *Food and Nutrition Sciences*, 05(04), 397–409. doi:10.4236/fns.2014.54048.
- Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K. ve Kumar, M. N. V. R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*. Elsevier. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.015.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Rice-Evans, C. A. ve Parker, L., 2003. *Flavonoids in Health and Disease*, 2nd ed., CRC Press, Boca Raton, ISBN-10: 0367446723.
- Rodsamran, P. ve Sothornvit, R., 2019. Extraction of phenolic compounds from lime peel waste using ultrasonic-assisted and microwave-assisted extractions. *Food Bioscience*, 28, 66–73. doi:10.1016/j.fbio.2019.01.017
- Routray, W. ve Orsat, V., 2014. MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods. *Industrial Crops & Products*, 58, 36–45. doi:10.1016/j.indcrop.2014.03.038
- Şahin, S., 2015. A novel technology for extraction of phenolic antioxidants from mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) leaves: Solvent-free microwave extraction. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32(5), 950–957. doi:10.1007/s11814-014-0293-y
- Şahin, S., Bilgin, M., Sayım, E. ve Güvenilir, B., 2017. Effects of natural antioxidants in the improvement of corn oil quality: olive leaf vs. lemon balm. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 374–380. doi:10.1111/ijfs.13291
- Şahin, S., İlbaş, Z. ve Kırbaşlar, İ., 2015. Study on Optimum Extraction Conditions for Olive Leaf Extracts Rich in Polyphenol and Flavonoid. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 50(8), 1181–1189. doi:10.1080/01496395.2014.966203
- Şahin, S., İlbaş, Z. ve Kırbaşlar, İ., 2018. Pulsed ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) leaves: Experimental and modeling study. *Chemical Engineering Communications*, 205(6), 717–726. doi:10.1080/00986445.2017.1328414
- Şahin, S., Kurtulbaş, E., Pekel, A. G., Toprakçı, İ. ve Bilgin, M., 2021. Enhanced extraction of high added-value products from *Hibiscus sabdariffa* using automatic solvent extractor: Kinetics and modeling. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 19, 100356. doi:10.1016/j.scp.2020.100356
- Şahin, S., Pekel, A. G. ve Toprakçı, İ., 2020. Sonication-assisted extraction of *Hibiscus sabdariffa* for the polyphenols recovery: application of a specially designed deep eutectic solvent. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1–11. doi:10.1007/s13399-020-00837-4
- Şahin, S. ve Şamli, R., 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595–602. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.07.029
- Saidani, F., Giménez, R., Aubert, C., Chalot, G., Betrán, J. A. ve Gogorcena, Y., 2017. Phenolic, sugar and acid profiles and the antioxidant composition in the peel and pulp of peach fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 126–133. doi:10.1016/j.jfca.2017.04.015

- SER 158 Series Automatic Solvent Extractor., 2021. 10 Nisan 2021 tarihinde <https://www.velp.com/en-us/ser-158-series-automatic-solvent-extractor.aspx> adresinden erişildi.
- Serradilla, M. J., Hernández, A., López-Corrales, M., Ruiz-Moyano, S., de Guía Córdoba, M. ve Martín, A., 2015. *Composition of the Cherry (Prunus avium L. and Prunus cerasus L.; Rosaceae). Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-408117-8.00006-4
- Shahidi, F., 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung/Food*, 44(3), 158–163. doi:10.1002/1521-3803(20000501)44:3<158::AID-FOOD158>3.0.CO;2-L
- Shahidi, Fereidoon ve Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jff.2015.06.018
- Shetty, K., Paliyath, G., Anthony, P. ve Levin, R. E., 2006. *Functional Foods and Biotechnology*, 1st ed., CRC Press, Boca Raton, eBook ISBN: 9780429129568.
- Shirzad, H., Niknam, V., Taheri, M. ve Ebrahimzadeh, H., (2017) Ultrasound-assisted extraction process of phenolic antioxidants from Olive leaves: a nutraceutical study using RSM and LC–ESI–DAD–MS. *Journal of Food Science and Technology*, 54(8), 2361–2371. doi:10.1007/s13197-017-2676-7
- Simsek, M., Sumnu, G. ve Sahin, S., 2012. Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sour Cherry Pomace. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 47(8), 1248–1254. doi:10.1080/01496395.2011.644616
- Singh, A., Sabally, K., Kubow, S., Donnelly, D. J., Gariepy, Y., Orsat, V. ve Raghavan, G. S. V., 2011. Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Antioxidants from Potato Peels. *Molecules*, 16(3), 2218–2232. doi:10.3390/molecules16032218
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A. ve Singh, N., 2017. Phenolic composition and antioxidant potential of grain legume seeds: A review. *Food Research International*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.foodres.2017.09.026
- Sparr Eskilsson, C. ve Björklund, E., 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*. Elsevier. doi:10.1016/S0021-9673(00)00921-3
- Stefanucci, A., Zengin, G., Llorent-Martinez, E. J., Dimmito, M. P., Della Valle, A., Pieretti, S., ... Mollica, A., 2020. *Viscum album* L. homogenizer-assisted and ultrasound-assisted extracts as potential sources of bioactive compounds. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13377. doi:10.1111/jfbc.13377
- Su, T., Wilf, P., Huang, Y., Zhang, S. ve Zhou, Z., 2015. Peaches Preceded Humans: Fossil Evidence from SW China. *Scientific Reports*, 5, 1–7. doi:10.1038/srep16794
- Tabaraki, R. ve Nateghi, A., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(6), 1279–1286. doi:10.1016/j.ultsonch.2011.05.004

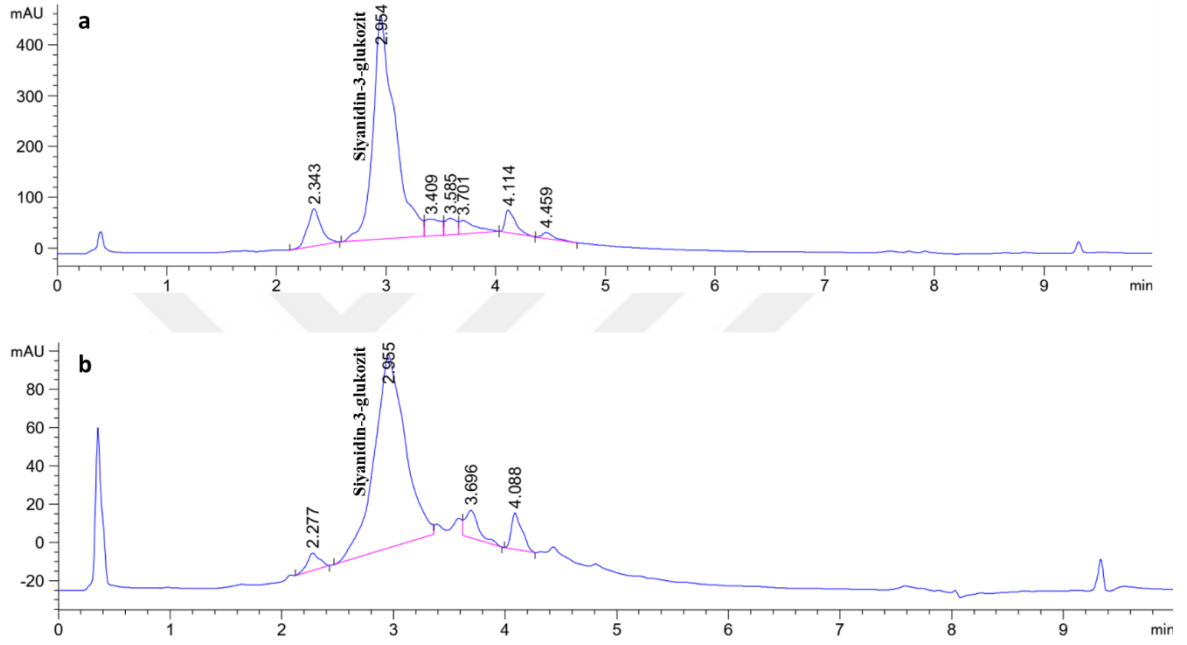
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B. ve Martin Lo, Y., 2013. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 202–208. doi:10.1016/j.ultsonch.2012.07.010
- Tomsone, L., Kruma, Z. ve Galoburda, R., 2012. *Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from horseradish roots (Armoracia Rusticana) Enhancing of legumes growing in Europe through sustainable cropping for protein supply for food and feed' (EUROLEGUME)*.
- Tonon, R. V, Brabet, C. ve Hubinger, M. D., 2010. Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart .) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907–914. doi:10.1016/j.foodres.2009.12.013
- Toydemir, G., 2013. *The Effects of Nectar Processing on Sour Cherry Antioxidant Compounds: Changes in Metabolite Profile and Bioavailability*. <http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933> adresinden erişildi.
- TUIK., 2019. Meyveler, içecekler ve baharat bitkileri, şehirlere göre üretim miktarı raporu. [Ziyaret tarihi: 02.01.2021].
- Uysal, S., Cvetanović, A., Zengin, G., Zeković, Z., Mahomoodally, M. F. ve Bera, O., 2019. Optimization of Maceration Conditions for Improving the Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Effects of *Momordica Charantia* L. Leaves Through Response Surface Methodology (RSM) and Artificial Neural Networks (ANNs). *Analytical Letters*, 52(13), 2150–2163. doi:10.1080/00032719.2019.1599007
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M. ve Bastos, M. L., 2002. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4989–4993. doi:10.1021/jf020225o
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. ve Bates, D., 2007. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. doi:10.1016/j.ifset.2007.04.014
- Wang, H., Nair, M. G., Iezzoni, A. F., Strasburg, G. M., Booren, A. M. ve Gray, J. I., 1997. Quantification and Characterization of Anthocyanins in Balaton Tart Cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2556–2560. doi:10.1021/jf960896k
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., ... Luo, X., 2018. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48(July), 538–549. doi:10.1016/j.ultsonch.2018.07.018
- Wijngaard, H. ve Brunton, N., 2009. The optimization of extraction of antioxidants from apple pomace by pressurized liquids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10625–10631. doi:10.1021/jf902498y
- Yang, L., Jiang, J.-G., Li, W.-F., Chen, J., Wang, D.-Y. ve Zhu, L., 2009. Optimum extraction Process of polyphenols from the bark of *Phyllanthus emblica* L. based on the response surface methodology. *Journal of Separation Science*, 32(9), 1437–1444.

doi:10.1002/jssc.200800744

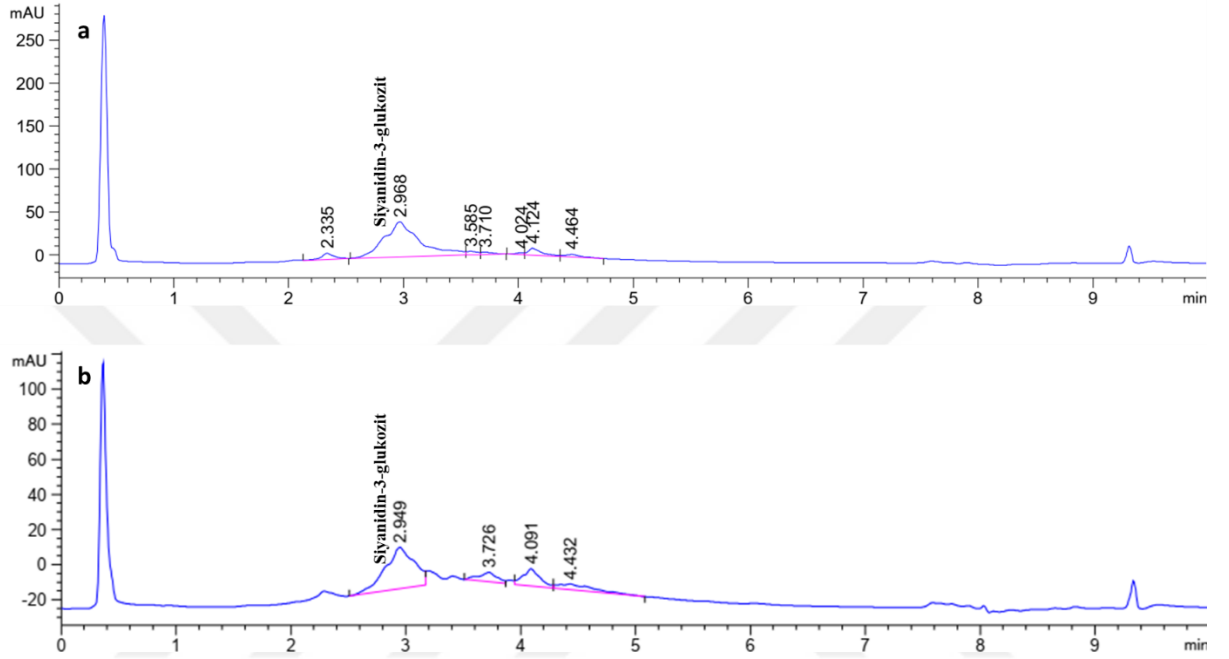
- Yazar, S., Kurtulbaş, E., Ortaboy, S., Atun, G. ve Şahin, S., 2019. Screening of the antioxidant properties of olive (*Olea europaea*) leaf extract by titanium based reduced graphene oxide electrode. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 36(7). doi:10.1007/s11814-019-0288-9
- Yılmaz, F. M., Görgüç, A., Karaaslan, M., Vardin, H., Ersus Bilek, S., Uygun, Ö. ve Bircan, C., 2019. Sour Cherry By-products: Compositions, Functional Properties and Recovery Potentials—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(22), 3549–3563. doi:10.1080/10408398.2018.1496901
- Yolmeh, M., Habibi Najafi, M. B. ve Farhoosh, R., 2014. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 155, 319–324. doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.059
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R. L., Miller, E. G., Pike, L. M. ve Patil, B. S., 2005. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2009–2014. doi:10.1021/jf0484632
- Zhang, Z., Pang, X., Ji, Z. ve Jiang, Y., 2001. Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chemistry*, 75(2), 217–221. doi:10.1016/S0308-8146(01)00202-3
- Zheng, Y., Crawford, G. W. ve Chen, X. (2014). Archaeological evidence for peach (*Prunus persica*) cultivation and domestication in China. *Plos One*, 9(9), 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0106595
- Zuin, V. G., Segatto, M. L. ve Zanotti, K., 2020. Towards a green and sustainable fruit waste valorisation model in Brazil: Optimisation of homogenizer-assisted extraction of bioactive compounds from mango waste using a response surface methodology. *Pure and Applied Chemistry içinde (C. 92, ss. 617–629)*. De Gruyter. doi:10.1515/pac-2019-1001

EKLER

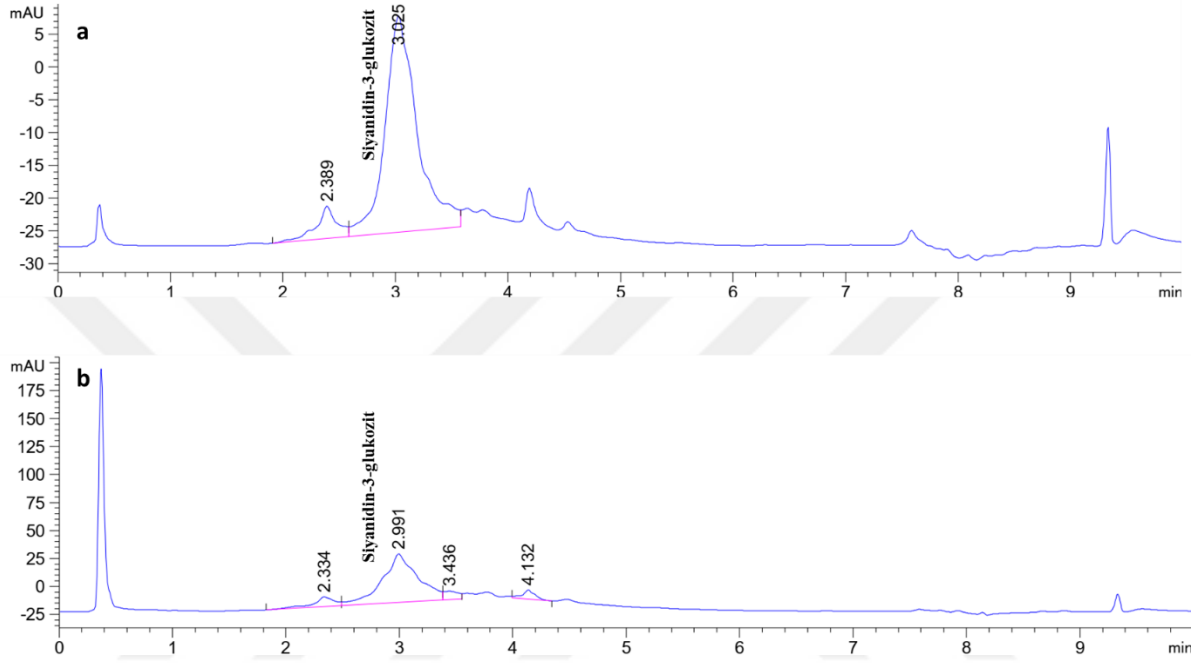
Ek 1. MDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş vişne kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu.



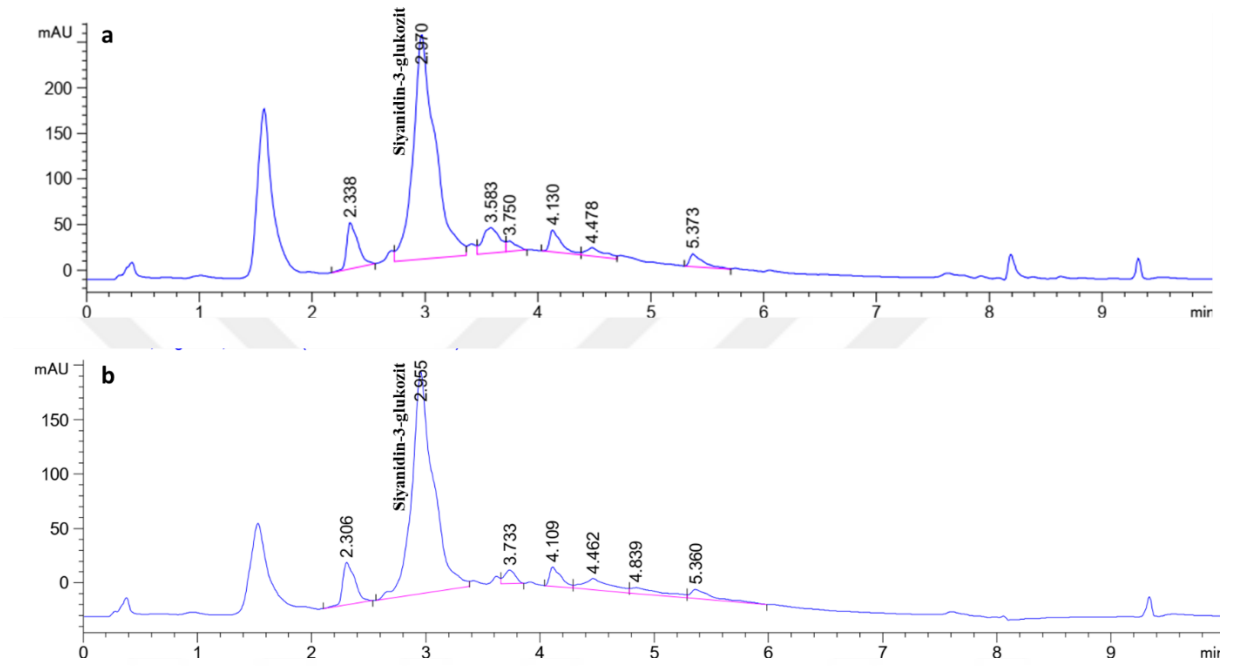
Ek 2. UDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş vişne kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu.



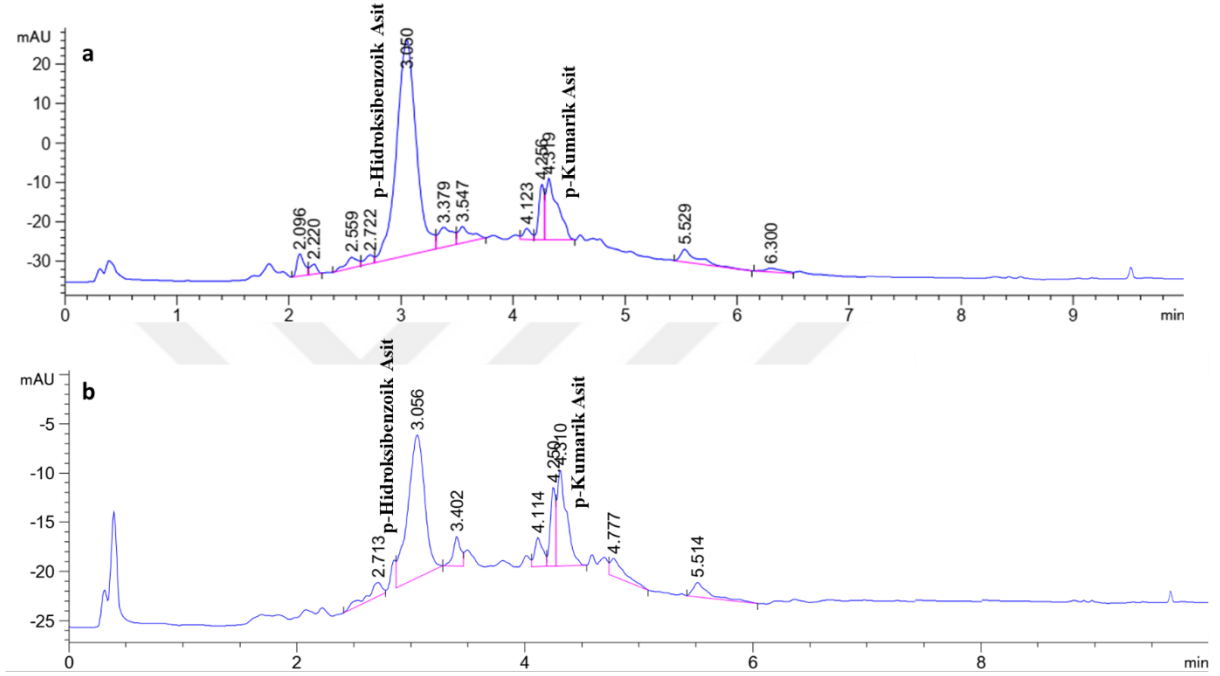
Ek 3. HDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş vişne kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu.



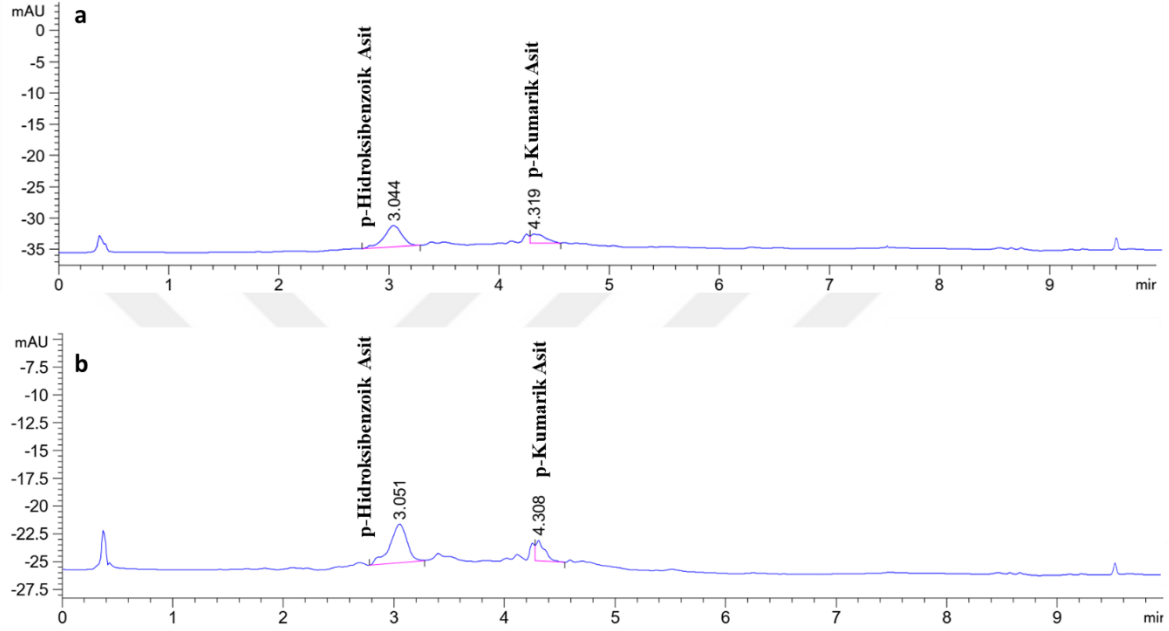
Ek 4. OÇE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş vişne kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki siyanidin-3-glukozit konsantrasyonu.



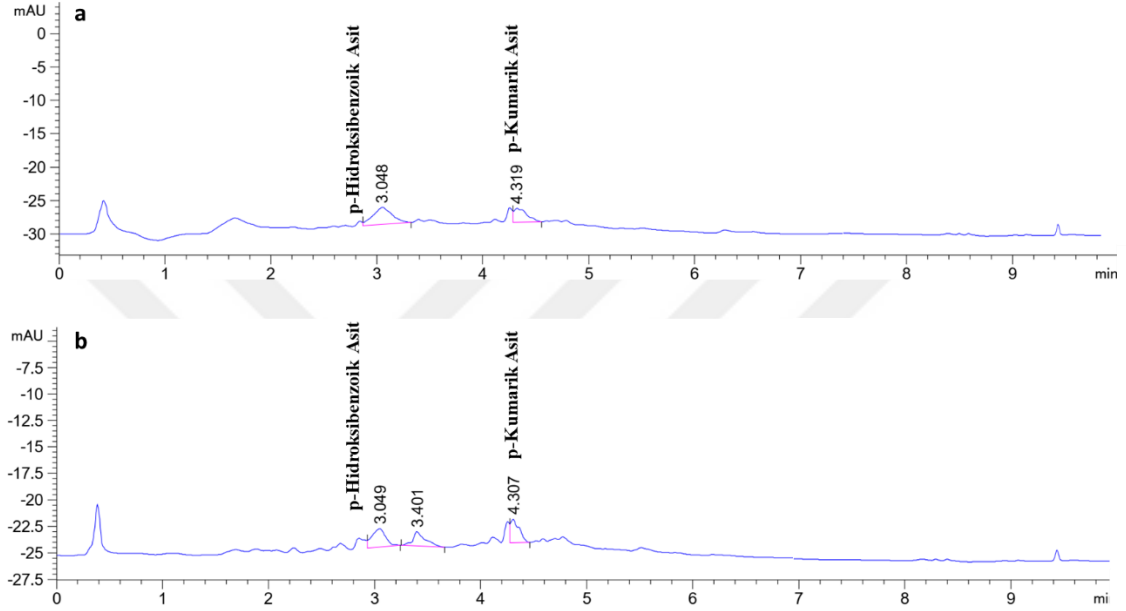
Ek 5. MDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş şeftali kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit konsantrasyonu.



Ek 6. UDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş şeftali kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit konsantrasyonu.



Ek 7. HDE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş şeftali kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit konsantrasyonu.



Ek 8. OCE yöntemi ile optimum proses koşullarında elde edilmiş şeftali kabuğu ekstraktlarının çeşitli depolama koşullarındaki HPLC kromatogram görüntüleri: (a) Başlangıç *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit konsantrasyonu (b) Depolama sonundaki *p*-Hidroksibenzoik asit ve *p*-Kumarik asit konsantrasyonu.

