

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI EKSTRAKSİYON METOTLARI İLE ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.)
BİTKİSİNDEN ANTİOKSİDAN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar YAĞCIOĞLU

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

EKİM 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI EKSTRAKSİYON METOTLARI İLE ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.)
BİTKİSİNDEN ANTİOKSİDAN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Pınar YAĞCIOĞLU
(506111521)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatma Ebru FIRATLIGİL

EKİM 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506111521 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Pınar YAĞCIOĞLU**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**FARKLI EKSTRAKSİYON METOTLARI İLE ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.) BİTKİSİNDEN ANTİOKSİDAN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Fatma Ebru FIRATLIGİL**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Derya KAHVECİ KARINCAOĞLU
Yeditepe Üniversitesi

Teslim Tarihi : 02 Eylül 2015
Savunma Tarihi : 07 Ekim 2015

Aileme,

ÖNSÖZ

Öncelikle, tez çalışmam süresince, danışmanlığımı üstlenerek, değerli fikirleri ile beni yönlendiren, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur ve zevk duyduğum çok değerli hocam ve danışmanım Yrd. Doç. Dr. Fatma Ebru FIRATLIGİL'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman desteğini yanımda hissettiğim ve değerli fikirleri ile beni yönlendiren çok değerli hocam Doç. Dr. Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN'e saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim ve hayatım boyunca destekleri ve sevgileri ile her zaman yanımda olan, varlıkları ile bana güven veren canım annem Sedef YAĞCIOĞLU' na, canım babam TAŞKIN YAĞCIOĞLU' na ve canım kardeşim Selin YAĞCIOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince beni cesaretlendirerek, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Vedat KURDOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekim 2015

Pınar Yağcıoğlu
(Gıda Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	ixi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xixii
SUMMARY	xxi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Adaçayı	3
2.2 Oksidasyon ve Antioksidanlar	4
2.2.1 Fenolik bileşikler	6
2.2.1.1 Tıbbi aromatik bitkilerde bulunan fenolik bileşikler.....	7
2.3 Bitkisel Kaynaklardan Fenolik Madde Ekstraksiyonu.....	8
2.3.1 Klasik çözücü ekstraksiyonu	10
2.3.2 Ultrason destekli ekstraksiyon	13
2.3.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon.....	18
2.4 Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyon.....	22
3. MATERYAL VE METOTLAR	25
3.1 Materyal	25
3.2 Metotlar	25
3.2.1 Örneklerin hazırlanması	25
3.2.2 Deney tasarımı.....	26
3.2.3 Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstraksiyon	27
3.2.3.1 Klasik çözücü ekstraksiyonu.....	27
3.2.3.2 Ultrason destekli ekstraksiyon.....	28
3.2.3.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon.....	28
3.2.4 Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	29
3.2.5 Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi.....	29
3.2.6 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi.....	30
3.2.6.1 DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil) radikal yakalama yöntemi.....	30
3.2.7 İstatistiksel analizler.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonda Adaçayından Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyonu	31
4.1.1 Toplam fenolik madde sonuçları.....	33
4.1.2 Toplam flavonoid miktarı sonuçları.....	38
4.1.3 Antioksidan kapasite sonuçları	42
4.2 Ultrason Destekli Ekstraksiyonda Adaçayından Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyonu	46

4.2.1 Toplam fenolik madde sonuçları.....	48
4.2.2 Toplam flavonoid miktarı sonuçları.....	52
4.2.3 Antioksidan kapasite sonuçları.....	56
4.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonda Adaçayından Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyonu	60
4.3.1 Toplam fenolik madde sonuçları.....	60
4.3.2 Toplam flavonoid miktarı sonuçları.....	65
4.3.3 Antioksidan kapasite sonuçları.....	69
4.4 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	73
5. SONUÇ	75
KAYNAKLAR.....	79
EKLER.....	91
ÖZGEÇMİŞ	97

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2' azinobis (3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit) diammonium salt
ANN	: Yapay sinir ağıları
ANOVA	: Varyans analizi
CE	: Kateşin eşdeğeri
CO₂	: Karbondioksit
DPPH	: 1,1-difenil-2- pikrilhidrazil
FRAP	: Demir (III) indirgeyici antioksidan kapasitesi
FRS	: Serbest radikal indirgeyici
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GN	: Genetik algoritma
P_c	: Kritik basınç
SPSS	: Sosyal bilimler için istatistik programı
T_c	: Kritik sıcaklık
TEAC	: Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi
TF	: Toplam flavonoid madde
TP	: Toplam fenolik madde
UV-VIS	: Mor ötesi-görünür bölge

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Antioksidan etki mekanizmaları.....	6
Çizelge 2.2 : Fenolik bileşiklerin temel sınıfları, diyet kaynakları ve başlıca bileşenleri.....	7
Çizelge 2.3 : Klasik çözücü ekstraksiyonun kullanım alanlarından örnekler.....	11
Çizelge 2.4 : Ultrasonun gıdalardaki mevcut ve potansiyel uygulamaları.....	15
Çizelge 2.5 : Gıda alanında mikrodalga kullanım uygulamaları.....	19
Çizelge 3.1 : Üç bağımsız değişkenli Box-Behnken deneme planı.....	27
Çizelge 4.1 : Klasik çözücü ekstraksiyon için Box- Behnken deneme planı ile deneysel ve tahminlenen değerler	32
Çizelge 4.2 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam fenolik madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.....	34
Çizelge 4.3 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam fenolik maddde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).	34
Çizelge 4.4 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam flavonoid madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları	39
Çizelge 4.5 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam flavonoid maddde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).....	40
Çizelge 4.6 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda DPPH analiz sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.....	40
Çizelge 4.7 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda DPPH için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).	44
Çizelge 4.8 : Ultrason destekli ekstraksiyon için Box- Behnken deneme planı ile deneysel ve tahminlenen değerler	47
Çizelge 4.9 : Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.....	49
Çizelge 4.10: Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik maddde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).	49
Çizelge 4.11: Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları	53
Çizelge 4.12: Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid maddde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).....	53
Çizelge 4.13: Ultrason destekli ekstraksiyonda DPPH analiz sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.....	57
Çizelge 4.14: Ultrason destekli ekstraksiyonda DPPH için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).	57
Çizelge 4.15: Mikrodalga destekli ekstraksiyon için Box- Behnken deneme planı ile deneysel ve tahminlenen değerler	61
Çizelge 4.16: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları	62
Çizelge 4.17: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik maddde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).....	63

Çizelge 4.18: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları	66
Çizelge 4.19: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid maddde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).....	67
Çizelge 4.20: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda DPPH analiz sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.....	70
Çizelge 4.21: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda DPPH için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).	70
Çizelge 4.22: Yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen optimum noktalardaki toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve DPPH miktarları.....	73

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : <i>Salvia officinalis</i> L..	3
Şekil 2.2 : <i>Salvia officinalis</i> 'in içerdiği temel antioksidatif bileşikler	9
Şekil 2.3 : Ses dalgası tipleri.....	13
Şekil 2.4 : İndirek ve direk ultrason uygulamaların şematik gösterimi	14
Şekil 2.5 : Mikrodalga destekli ekstraksiyon sisteminin şematik görünümü	19
Şekil 3.1 : IKA A11 marka öğütücü	26
Şekil 3.2 : (a)Universal 32R marka santrifüj; (b) Memmert marka çalkalayıcı su banyosu	27
Şekil 3.2 : VWR marka ultrasonik banyo	28
Şekil 3.3 : Ev tipi mikrodalga fırın	28
Şekil 3.4 : UV-Vis spektrofotometre	29
Şekil 4.1 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam fenolik madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	33
Şekil 4.2 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon süresinde (90 dakika), toplam fenolik madde miktarı için yanıt yüzey grafiği.....	37
Şekil 4.3 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam fenolik madde miktarı için yanıt yüzey grafiği.....	37
Şekil 4.4 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam fenolik madde miktarı için yanıt yüzey grafiği.....	38
Şekil 4.5 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam flavonoid madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	39
Şekil 4.6 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon süresinde (90 dakika), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.....	41
Şekil 4.7 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam flavonoid madde miktarı için yanıt yüzey grafiği.....	41
Şekil 4.8 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam flavonoid madde miktarı için yanıt yüzey grafiği.....	42
Şekil 4.9 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda DPPH için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	43
Şekil 4.10 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon süresinde (90 dakika), DPPH için yanıt yüzey grafiği.....	45
Şekil 4.11 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), DPPH için yanıt yüzey grafiği.....	45
Şekil 4.12 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), DPPH için yanıt yüzey grafiği.....	46
Şekil 4.13 : Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	48

Şekil 4.14: Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (30 dakika), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.....	50
Şekil 4.15 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.....	51
Şekil 4.16 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.....	51
Şekil 4.17 : Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	52
Şekil 4.18 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (30 dakika), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.....	54
Şekil 4.19 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.....	55
Şekil 4.20 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.....	55
Şekil 4.21 : Ultrason destekli ekstraksiyonda DPPH için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	56
Şekil 4.22 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (30 dakika), DPPH için yanıt yüzey grafiği.....	58
Şekil 4.23 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), DPPH için yanıt yüzey grafiği.....	59
Şekil 4.24 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.....	59
Şekil 4.25 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	60
Şekil 4.26 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (60 saniye), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.....	64
Şekil 4.27 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.....	64
Şekil 4.28 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit güçte (450 Watt), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.....	65
Şekil 4.29 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	66
Şekil 4.30 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (60 saniye), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.....	67
Şekil 4.31 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.....	68
Şekil 4.32 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit güçte (450 Watt), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.....	68
Şekil 4.33 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda DPPH için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.....	69
Şekil 4.34 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (60 saniye), DPPH için yanıt yüzey grafiği.....	71
Şekil 4.35 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), DPPH için yanıt yüzey grafiği.....	72
Şekil 4.36 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit güçte (450 Watt), DPPH için yanıt yüzey grafiği.....	72
Şekil 4.37 : Yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen optimum noktadaki toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve DPPH miktarları.....	73

Şekil A.1 : %60 etanol ile gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	92
Şekil A.2 : %70 etanol ile gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	92
Şekil A.3 : %80 etanol ile gallik asit kalibrasyon eğrisi	93
Şekil A.4 : %60 etanol ile kateşin kalibrasyon eğrisi	93
Şekil A.5 : %70 etanol ile kateşin kalibrasyon eğrisi	94
Şekil A.6 : %80 etanol ile kateşin kalibrasyon eğrisi	94
Şekil A.7 : %60 etanol ile trolox kalibrasyon eğrisi.....	95
Şekil A.8 : %70 etanol ile trolox kalibrasyon eğrisi	95
Şekil A.9 : %80 etanol ile trolox kalibrasyon eğrisi	96

FARKLI EKSTRAKSİYON METOTLARI İLE ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.) BİTKİSİNDEN ANTİOKSİDAN EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU

ÖZET

Son yıllarda tüketicilerin doğal ürünlere olan ilgisinin artması ve yapay antioksidanların sağlık üzerine olumsuz etkileri nedeniyle kullanımlarının sınırlandırılması ile oksidatif bozulmayı engellemek üzere bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal antioksidanların gıdalarda koruyucu olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar artmıştır.

Serbest radikaller gıdalarda neden oldukları bozunma reaksiyonlarının dışında, canlı hücre ve organ sistemleri üzerinde kanserojen, erken yaşlanma, kalp damar hastalıkları gibi önemli sağlık etkilere neden olmaktadır. Bu doğrultuda serbest radikallerin neden oldukları olumsuz sağlık etkilerini yavaşlatmak ya da durdurmak için antioksidan içeriği yüksek olan gıdaların tüketilmesi gerektiğinden bu ürünlere ilgi ve talep artmıştır.

Antioksidan özelliklerinin yüksek olması nedeniyle Lamiaceae familyasına ait biberiye, adaçayı, kekik, nane gibi aromatik bitkiler son yıllarda birçok araştırmaya konu olmuştur. Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) çok eski çağlardan beri şifalı bir bitki olarak bilinmektedir. Adaçayının sağlık üzerine bilinen etkilerinden bazıları şu şekildedir; uyarıcı, iştah açıcı, antimutajen, ateş düşürücü, spazm çözücü, sindirimi kolaylaştırıcı, soğuk algınlığını iyileştirici, antimikrobiyal. Adaçayının temel antioksidan etkisi karsonik asit, karnosol, kafeik asit türleri ve rosmarinik asit bileşenlerinden gelmektedir.

Bu çalışmada antioksidan özelliğinin yüksek olduğu bilinen adaçayından (*Salvia officinalis* L.) farklı ekstraksiyon metotları kullanılarak antioksidan ekstraksiyonu yapılmıştır. Kullanılan yöntemler; klasik çözücü, mikrodalga destekli, ultrason destekli ekstraksiyondur. Yanıt yüzey yöntemi kullanarak, her bir ekstraksiyon yöntemi için optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler; klasik çözücü ekstraksiyonunda; etanol konsantrasyonu (%60-80), sıcaklık (40-60 °C) ve ekstraksiyon süresi (60-120 dakika) olarak; ultrason destekli ekstraksiyonda; etanol konsantrasyonu (%60-80), sıcaklık (40-60 °C) ve ekstraksiyon süresi (15-45 dakika) olarak; mikrodalga destekli ekstraksiyonda; etanol konsantrasyonu (%60-80), mikrodalga gücü (300-600 Watt) ve ekstraksiyon süresi (30-90 dakika) olarak seçilmiştir. Yanıt olarak toplam fenolik miktarı, toplam flavonoid miktarı ve DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil) radikali yakalama yöntemi ile antioksidan aktivitesi seçilmiştir.

Sabit tartıma gelene kalar kurutulan adaçayı bitkisi, belirlenen her bir ekstraksiyon yöntemi için farklı ekstraksiyon koşulları altında Box-Behnken deney tasarımına göre merkez noktada 3 tekrarla toplamda 15 deney noktasında ekstrakte edilmiştir.

Elde edilen ekstraktlar 2500 rpm de 20 dakika santrifüj edilmiş, üst faz alınarak gerçekleştirilecek analizlere kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam fenolik madde analizi Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmış, sonuçlar galik asit cinsinden verilmiştir. Toplam flavonoid madde analizi alüminyum klorür kolorimetrik metoduna göre gerçekleştirilmiş ve antioksidan kapasite miktarı, DPPH radikali yakalama yöntemine göre yapılarak sonuçlar toplam flavonoid madde için kateşin cinsinden, antioksidan kapasite için trolox cinsinden hesaplanmıştır.

Klasik ekstraksiyon yönteminde, belirlenen optimum koşullarda ekstrakte edilen toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarı ve antioksidan kapasitesi sırasıyla, 3847.10 mg GAE/100 g kuru madde, 3250.90 mg CE/100 g kuru madde, 506.28 mg TEAC/100 g kuru madde olarak tespit edilmiştir. Klasik ekstraksiyon yöntemi ile adaçayından antioksidan ekstraksiyonu için belirlenen optimum koşullar; %60 etanol konsantrasyonu, 53.93 °C ekstraksiyon sıcaklığı, 84.84 dakika ekstraksiyon süresidir.

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde belirlenen optimum koşullarda ekstrakte edilen toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarı ve antioksidan kapasitesi sırasıyla, 4196.00 mg GAE/100 g kuru madde, 3706.00 mg CE/100 g kuru madde, 496.88 mg TEAC/100 g kuru madde olarak tespit edilmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile adaçayından antioksidan ekstraksiyonu için belirlenen optimum koşullar; %60 etanol konsantrasyonu, 60 °C ekstraksiyon sıcaklığı, 38.03 dakika ekstraksiyon süresidir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde, belirlenen optimum koşullarda alınan sonuçlar ise toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarı ve antioksidan kapasitesi sırasıyla, 6271.00 mg GAE/100 g kuru madde, 5033.00 mg CE/100 g kuru madde, 493.22 mg TEAC/100 g kuru maddedir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile adaçayından antioksidan ekstraksiyonu için belirlenen optimum koşullar; %60 etanol konsantrasyonu, 518.18 Watt mikrodalga gücü, 82.72 saniye ekstraksiyon süresidir.

Uygulanan üç yöntem karşılaştırıldığında, mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin en verimli yöntem olduğu görülmektedir. Bunu ultrason destekli ekstraksiyon ve klasik çözücü ekstraksiyonu takip etmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar neticesinde, kısa süreli ekstraksiyonla yüksek antioksidan elde edilen mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminin adaçayından antioksidan ekstrakte etmek için kullanılabileceği söylenebilir.

OPTIMIZATION OF ANTIOXIDANT EXTRACTION FROM SAGE (*Salvia officinalis* L.) USING DIFFERENT EXTRACTION METHODS

SUMMARY

Lipid oxidation is one of the major problem occurring in oils and foods rich in polyunsaturated fatty acids. In order to control lipid oxidation, synthetic compounds have been widely used in food industry. Nevertheless, toxicological effects together with consumer preference for natural products have resulted in increased interest in the use and research of natural antioxidants.

Plant antioxidants protect human tissues against stress and diseases as well as they prevent the oxidation of foods. Presence of phenolics help protect against cardiovascular diseases, cancer and other degenerative diseases. The use and consumption of natural antioxidants from plant material has become an important to prevent from disease.

Phenolics are complex molecules found in all plants as their secondary metabolites. These include simple phenols, hydroxybenzoic acid and cinnamic acid derivatives, flavonoids, coumarines and tannins, among others. Phenolics can complex with carbohydrates, proteins, and other compounds which can influence the extraction efficiency. Phenolics are also not uniformly distributed in plants at the tissue, cellular and subcellular levels. Insoluble phenolics are the components of cell walls, while soluble phenolics are compartmentalized within the plant cell vacuoles. This is why all phenolics or phenolic specific groups is not possible to extract completely from plant material. Extraction parameters such as solvent selection and concentration, particle size of sample, extraction temperature, extraction time, solid:solvent ratio are effect the extraction yield of phenolic compounds. Extraction method is also important for extraction phenolic compounds from plant materials. Because of some drawback of solvent extraction, new extraction processes have been developed with the aim of providing characteristics such as enhanced selectivity, automation, lower consumption of organic solvents, and higher extraction efficiency. Techniques such as supercritical fluid extraction, pressurized liquid extraction, subcritical water extraction, ultrasound-assisted extraction, microwave-assisted extraction, solid-phase extraction, solid-supported liquid-liquid extraction, high hydrostatic pressure extraction, matrix solid-phase dispersion, and countercurrent chromatography are some advanced extraction techniques that have been applied to phenolic compound extraction, isolation, and fractionation.

Response surface method (RSM) is a mathematical and statistical tool, which has been widely used to optimise various parameters in industry processing. RSM can evaluate the impact of different multiple parameters, and simultaneously optimise experimental conditions.

Box–Behnken design (BBD), a type of RSM, is a second-order multivariate technique based on three-level incomplete factorial design. BBD has been widely applied in the past decade to optimize the extraction procedure of bioactive compounds from natural sources, such as phenolic compounds.

The interest has been increased to medicinal and aromatic plants due to high antioxidant activity. Sage (*Salvia officinalis* L.) is one of the most important medicinal and aromatic plant which belongs to Lamiaceae family. Recently, they have been extensively studied for their antioxidant activities as well. Sage is widely also used in traditional medicine since ancient times for their health beneficial effects such as stimulating, appetizing, antimutagenic, and fever reducer, anti-spasmodic, digestive, colds healing, antimicrobial. The main phenolic compounds identified in sage samples are rosmarinic acid, carnosic acid, carnosol, rosmanol.

In this study, solvent extraction, ultrasound assisted extraction and microwave assisted extraction techniques were applied for the extraction of antioxidant compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). Response surface methodology was employed to optimize the extraction conditions according to the total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity (DPPH method).

Ethanol concentration (60-80%), extraction temperature (40-60 °C), extraction time (60-120 min) for solvent extraction; ethanol concentration (70-90%), extraction temperature (40-60 °C), extraction time (15-45 min) for ultrasound assisted extraction; and ethanol concentration (70-90%), microwave power (300-600 Watt), extraction time (30-90 s) for microwave assisted extraction were selected as the independent variables. Total phenolic content, total flavonoid content and total antioxidant capacity were selected for response.

Fresh sage was dried in an oven at 35 °C until it reached a constant weight. Dry samples were finely grounded with high speed coffee grinder to 1-2 mm pieces. The fine, dried samples (1 g) were extracted with 20 ml solvent for solvent and ultrasound assisted extraction, 2 g dried samples were extracted with 40 ml solvent for microwave assisted extraction. Extractions were performed using Box-Benken design at 15 different experiment condition. Extracts centrifuged 20 min at 2500 rpm than the upper layer was taken and stored at -20°C until they were analysed. All samples were extracted in duplicate and average values were reported.

Total phenolic content was determined with Folin-Ciocalteu method. The results were expressed as mg Gallic acid equivalent (GAE) per 100 g DW sample. Total flavonoid analysis was done according to aluminum chloride colorimetric method. The results were expressed as milligrams of (+)-catechin equivalent (CE) per 100 g of DW sample. Total antioxidant capacity was analyzed with 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) analysis method. The results were expressed as mg of Trolox equivalent (TE) per 100 g of DW of sample. Samples of each extraction were analyzed in triplicate and average values were reported.

The optimal extraction conditions for solvent extraction method were 60% ethanol concentration, 53.93 °C extraction temperature, 84.84 min extraction time, while maximal theoretical total phenolic content was 3847.1 mg GAE/100 g DW, total flavonoid content was 3250.9 mg CE/100 g DW, total antioxidant capacity was 506.28 mg TEAC/100 g DW.

The optimal extraction conditions for ultrasound assisted extraction method were 60% ethanol concentration, 60 °C extraction temperature, 38.03 min extraction time.

Under these optimum conditions, predicted total phenolic content, total flavonoid content and DPPH values were as follows 4196 mg GAE/100 g DW, 3706 mg CE/100 g DW, 496.88 mg TEAC/100 g DW.

The optimal extraction conditions for microwave assisted extraction method were 60% ethanol concentration, 518.18 Watt microwave power, 82.72 s extraction time, while maximal theoretical total phenolic content was 6271 mg GAE/100 g DW, total flavonoid content was 5033 mg CE/100 g DW, total antioxidant capacity was 493.22 mg TEAC/100 g DW.

Total phenolic content and total flavonoid content of sage obtained by microwave assisted extraction at the optimum conditions were higher than those obtained by solvent extraction and ultrasound assisted extraction. Total antioxidant capacity with DPPH method of sage obtained by solvent extraction was higher than the other extraction techniques.

1. GİRİŞ

Tıbbi aromatik bitkilerin yüzyıllardır halk arasında tedavi amacıyla kullanılmasının yanında son yıllarda modern tıp alanında ve gıda takviyesi olarak kullanımları oldukça yaygınlaşmıştır. Dünya pazarında tıbbi aromatik bitkilere talep her geçen gün artmaktadır. Türkiye'nin coğrafi konumu, ekolojik ve biyolojik çeşitliliği sayesinde tıbbi aromatik bitki çeşitliliği oldukça fazladır. Türkiye, Avrupa kıtasında bulunan bitki türlerinin %75'ini barındırmakta olup, bunun yaklaşık üçte biri endemiktir (Özhatay, 1997).

Tıbbi aromatik bitkiler içerisinde 200 çeşit, 3000 tür içeriği ile önemli bir yeri olan Lamiaceae familyasına ait olan *Salvia officinalis* L.'in sağlık üzerine bilinen birçok olumlu etkisi vardır. Adaçayının sağlık etkileri, yapısında bulunan esansiyel yağlar ile biyoaktif bileşenler ve bunların yüksek antioksidan aktivitelerinden kaynaklanmaktadır.

Yağlar ve yağlı gıdalarda oksidasyonu ve buna bağlı kimyasal ve duyuşal bozunmaları önleyerek gıdaların raf ömrünü arttırmak amacıyla antioksidan kullanımı oldukça yaygındır. Lipid oksidasyonunu önlemek için endüstride hali hazırda kullanılan sentetik ve doğal antioksidanlar mevcuttur. Endüstride, doğal antioksidanlar (vitamin E, C ve β -karotenler gibi) da tercih edilmekle birlikte sentetik antioksidanlara göre dayanıksız olması kullanımını sınırlandırmaktadır (Önenç ve Açıkgöz, 2005). Gıdalara fonksiyonel özellikler kazandırarak besin değerini artırma ve bozunma reaksiyonlarının önüne geçebilme noktasında antioksidan aktivitesinin yüksek olduğu bilinen tıbbi aromatik bitkilerin antioksidan olarak kullanılması gündeme gelmiştir. *Salvia officinalis* L. 'den elde edilmiş ekstraktların draje, tablet ve şurup formlarında satışları Amerika ve Avrupa'da mevcuttur.

Bitkisel kaynaklardan fenolik madde ekstraksiyonunda klasik çözücü ekstraksiyonuna alternatif olarak geliştirilmiş birçok ekstraksiyon metodu vardır. Ekstraksiyon süresini kısaltan, çevreye zararı olmayan ve çözücü kullanımı azaltarak ekstraksiyon verimini arttıran yeni yöntemlerden ultrason destekli, mikrodalga

destekli, süperkritik akışkan ve hızlandırılmış ekstraksiyon sistemleri klasik çözücü ekstraksiyonuna göre oldukça etkili yöntemlerdir ve düşük sıcaklıklarda çalışılabilme özellikleri sayesinde bitkisel kaynaklarda sıcaklık artışı ile oluşabilecek termal degradasyonun önüne geçilmesini sağlar.

Bu çalışmada, ülkemizde yaygın olarak yetişen ve son yıllarda dünya üzerinde ticari önemi artan adaçayından, antioksidanların; klasik çözücü ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmesi ve toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde miktarları ile antioksidan kapasitesinin belirlenerek yanıt yüzey yöntemi ile tüm ekstraksiyon metotları için optimum ekstraksiyon koşullarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Adaçayı

Adaçayı, Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait olan kokulu bitkilere verilen addır. Latince Salvira kelimesinden gelen ismi; korumak, korunmak, iyileştirmek anlamına gelmektedir. *Salvia* türünün dünya üzerinde bilinen yaklaşık 900 alt türü vardır. Orta ve Güney Amerika'da 500 tür, Orta Asya ve Akdeniz'de 250 tür, Doğu Asya'da 90 tür. Ülkemizde *Salvia* türü sayısı 92 olup bunların yarısı endemiktir. Bir çok ilimizde birden fazla endemik adaçayı türü bulunmaktadır. Örneğin; Adana'da *Salvia Clicica* (Klikya adaçayı), Afyon'da *Salvia Pisidica* (Pisidya adaçayı), Aydın ve İzmir'de *Salvia Smymaea* (İzmir adaçayı), Yozgat'ta *Salvia Yosgadensis* (Yozgat adaçayı).

Adaçayı'nın kökeni Akdeniz ve çevresi, özellikle Batı Anadolu ve Yunanistan olarak kabul edilmektedir. Ülkemizde güney sahillerimizde 1300-1500 m'de yetişmektedir. *Salvia officinalis*'in yayılış alanı Akdeniz çevresidir (İlisulu, 1992). Bitkinin genel olarak ekim zamanı ilkbahar veya sonbahar, toplama zamanı ise yaprakların çiçeklenme öncesi, Mayıs-Haziran aylarıdır.

En çok bilinen iki çeşidi bahçe adaçayı (*Salvia officinalis*) ve çayır adaçayıdır (*Salvia pratensis*). Avrupa'da tıbbi kullanımı resmen kabul edilmiş olan adaçayı, Türkçe tıbbi adaçayı olarak da isimlendirilen *Salvia officinalis* L. bitkisidir. Bu tür Türkiye'de doğal olarak yayılış göstermemektedir (Ekren ve diğ, 2007).

Tüylü, uzun grimsi yeşil renkte yaprakları olan, 30-70 cm boyunda olan bitkinin menekşe renkli çiçekleri halka dizilişlidir (Şekil 2.1). Karşılıklı olan beyaz keçeli yaprakları gümüş gibi parıldar ve acımtırak, ıtırılı bir koku yayarlar (Büyükkaya, 2002).



Şekil 2.1: *Salvia officinalis* L.

Salvia türleri bitki çayı olarak ve özellikle et yemeklerinde aroma verici baharat olarak kullanılmakla birlikte kozmetik, parfümeri ve kimya endüstrisinde de kullanılmaktadır (Chalchat, 1998). Tarih boyunca hem gıda olarak hem de sağlığa faydaları ile bir tedavi aracı olarak geniş çaplı kullanılmıştır ve günümüzde artarak kullanılmaya devam edilmektedir. Adaçayının biyolojik etkilerinden bazıları şu şekildedir; antibakteriyal, antifungal, antiviral, antiseptik, analjezik, antioksidan, astrenjan, antispazmodik, halusinojenik, merkezi sinir sistemi depresanı, antidiyabetik, antikanser, tüberkülostatik, kardiyovasküler ve insektisit aktiviteler (Kamatou ve diğ, 2008; Tada ve diğ, 1994; Martins ve diğ, 2015; Li ve diğ, 2015; Eidi ve Eidi, 2009; Ulueben 1997).

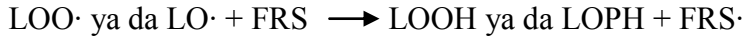
Adaçayı; eterli uçucu yağlar; tujon, sineol, linalol, borneol, salven, pinen ve kafur; saponinler, tanenler, fenolik bileşikler (terpenik bileşikler, fenolik asitler, flavonoidler ve fenolik glikozitler), östrojen benzeri maddeler, reçineli bileşikler içermektedir. Bazı uçucu yağların timol ve karvakrol da içerdiği bildirilmiştir (Zeybek ve Zeybek 2002; Wang ve diğ, 1998).

2.2 Oksidasyon ve Antioksidanlar

Gıdalarda oksidasyon mekanizması ile yağ, karbonhidrat ve protein oksidasyonları ile çeşitli bozulma reaksiyonları gerçekleşmekte ve ürünlerin kalite ve raf ömründe olumsuz etkilere neden olmaktadır. Oksidasyon reaksiyonu nem, ısı, ışık, metaller, metal içeren bileşikler, bir takım pigmentler, doymamışlık derecesi ve enzim varlığı sonucu hızlanmaktadır. Gıdalara uygulanan oksijen ile temasın engellenmesi, düşük

sıcaklık uygulamaları, enzimlerin inaktivasyonu, oksijen basıncının düşürülmesi, uygun ambalajlama gibi metotlar, oksidasyonu engellemek için her zaman yeterli olmamaktadır. Gıdaları oksidasyona karşı korumanın en etkili yolu antioksidanların kullanılmasıdır (Pokorny ve diğ., 2001).

Antioksidanlar, biyolojik sistemleri oksidasyon reaksiyonları ve bunun zararlı etkilerinden koruyan ya da oksidasyon reaksiyonlarını tamamen engelleyen maddeler şeklinde tanımlanmaktadır (Decker, 2002). Antioksidanlar; farklı kimyasal yapılarda, farklı antioksidatif etki mekanizmalarına sahiptirler (Çizelge 2.1). Antioksidan bileşiklerin en önemli mekanizması, lipid serbest radikalleri ile reaksiyona girip, inaktif ürünleri oluşturmalarıdır (Pokorny ve Korczak, 2001). Antioksidanlar serbest radikalleri inaktif hale getirerek ya da yakalayarak lipid oksidasyonu yavaşlatabilir ve böylece başlangıç ve ilerleme evrelerindeki reaksiyonları inhibe ederler. Serbest radikal yakalayıcılar (FRS) ya da zincir kırıcı antioksidanlar yağ hidroperoksitlerinin ayrılmasıyla oluşan peroksil ($\text{LOO}\cdot$) ve akoksi ($\text{LO}\cdot$) radikalleri ile reaksiyona girerek antioksidan aktivite gösterirler. Reaksiyon aşağıdaki şekilde gerçekleşir;



Serbest radikal yakalayıcıların peroksil radikallere ile reaksiyona girmesinin çeşitli nedenleri vardır:

- İlerleme aşaması lipid oksidasyonunda yavaş gerçekleşen bir basamaktır, bu nedenle sistemde peroksil radikaller tüm radikallerden daha fazla bulunur,
- Peroksil radikalleri, diğer radikallerden (örneğin alkoksi radikalleri) daha düşük enerjiye sahiptir ve bu nedenle serbest radikal yakalayıcılarının düşük enerjili oksijenleri ile çoklu doymamış yağ asitlerine göre daha hızlı reaksiyona girerler,
- Serbest radikal yakalayıcıları genellikle düşük konsantrasyonlarda bulunurlar ve başlangıç radikalleri ile etkin biçimde rekabet edemezler (örneğin $\cdot\text{OH}$). Bu nedenle serbest radikal yakalayıcılar, peroksil radikalleri için diğer bileşenlerle (özellikle doymamış yağ asitleri) daha etkin biçimde rekabet ederek lipid oksidasyonunu inhibe edebilir (Decker, 2002).

Çizelge 2.1: Antioksidan aktivite mekanizmaları (Pokony ve diğ, 2001).

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

2.2.1 Fenolik bileşikler

Doğal antioksidanların en temel bileşikleri fenolik bileşiklerdir. Fenolik bileşikler, bir benzen halkası üzerinde bir hidroksil grubu içeren, 8000 üzerinde türü bulunan kimyasal çeşitli bir sınıftır. Bazı fenolikler şikimik asit ya da poliketid yollarından elde edilen iki ya da daha fazla bileşenden türetilen kompleks moleküllerdir (Lee, 2004). Bütün bitki metabolizmalarında, sekonder metabolit olarak bulunan ve bitkilerin kendilerini bazı zararlılara karşı korumada rolleri olduğu sanılan çok sayıda farklı nitelik ve miktarlarda çeşitli fenolik bileşikler bulunmaktadır (Nizamlioğlu ve Nas, 2010). Fenolik bileşiklerin temel sınıfları, bulundukları diyet kaynakları ve bu sınıflara ait başlıca maddeler Çizelge 2.2' de verilmiştir.

Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, enzim inhibisyonuna neden olmaları, değişik gıdalarda saflık kontrol kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadırlar. Ayrıca, fenolik bileşiklerin kronik hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynadığını kanıtlayan birçok çalışma mevcuttur. Olumlu sağlık etkilerinin başında antikanser ve antiviral özellikleri ve kalp damar hastalığı riskini azaltmaları gelmektedir (Lee, 2004).

Çizelge 2.2: Fenolik bileşiklerin temel sınıfları, diyet kaynakları ve başlıca bileşenleri (Gliszczynska-Swiglo and Oszmianski, 2013).

Kimyasal yapı	Sınıf	Diyet kaynakları	Başlıca bileşenler
C6-C1 COOH	Benzoik asitler ve aldehitler	Dutlar, tahıllar, otlar ve baharatlar	4-Hidroksibenzoik, gallik, protokateşik, salisilik, vanilik, gentisik ve elajik asit; vanilin
C6-C3	Sinamik asitler	Elma, vişne, erik, dutlar, domates, kuşkonmaz, beyaz üzüm ve baharatlar	p-kumarik, kafeik, ferulik, sinapik ve klorojenik asit
C15 (C6-C3-C6)	Flavonoidler	Soğan, domates, elma, baharatlar, çay, turunçgiller	Kamferol, kuersetin, rutin, luteolin, kateşin, hesperitin, siyanidin, delfinidin
C6-C2-C6	Stilbenler	Üzümler ve şarap	Resveratrol
C18	Betasiyaninler	Kara havuç ve frenk inciri	Betanin ve isobetanin
Dimerler ya da oligomerler	Lignanlar	Keten tohumu, susam tohumu, tahıllar, baklagiller, dutlar ve sebzeler	Sekoizolarisiresinol, sekoizolarisiresinol diglukosit, izolarisiresinol, pinoresinol ve matairesinol
Oligomerler ya da polimerler	Tanninler	Elmalar, dutlar, üzümler ve kırmızı şarap	Prosiyanidinler B1, B2, B3, B4, C, gallotaninler ve elajitaninler

2.2.1.1 Tıbbi aromatik bitkilerde bulunan fenolik bileşikler

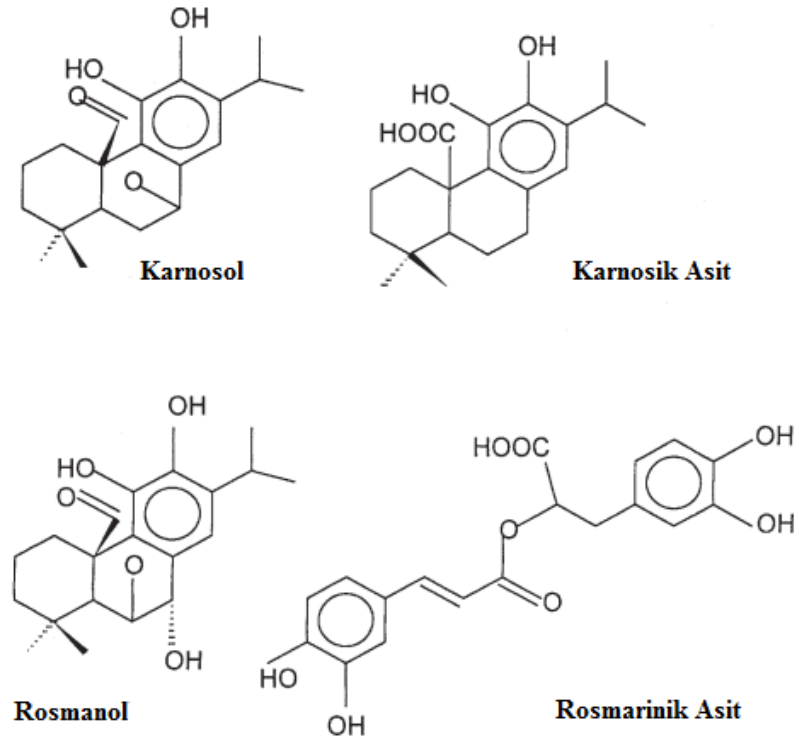
Oksidasyon reaksiyonlarına bağlı olarak gıdalarda meydana gelen kalite değişikliklerinin önüne geçebilmek için gıda sektöründe antioksidan kullanımı oldukça yaygındır. Endüstride çoğunlukla yapay antioksidanlar kullanılmaktadır. En çok kullanılan yapay antioksidanlar butillenmiş hidroksianisol (BHA), butillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyer butil hidrokinon (TBHQ) ve propil galatlar (PG)'dir. Ancak yapay antioksidanların insan sağlığı üzerine toksik, karsinojenik etki gösterebileceğinin bildirilmesi ve buna bağlı olarak kullanımlarının sınırlandırılmış olması nedeniyle ve artan tüketici kaygıları ve doğal gıdalara rağbetin artması ile bitkisel kaynaklardan elde edilen doğal antioksidanların kullanımını değerlendirmek üzere birçok çalışma gerçekleştirilmeye başlanmıştır.

Lamiaceae familyasına ait tıbbi aromatik bitkiler; özellikle biberiye, adaçayı, kekik, nane ve mercanköşk bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin yüksek olması nedeni ile son yıllarda üzerlerinde birçok akademik çalışma gerçekleştirilmiştir (Kivilompolo ve Hyötylainen, 2007, Farzaneh ve Carvalho, 2015; Skrovankova ve diğ., 2012; Khaled-Khodja ve diğ., 2014; Zgorka ve Glowniak, 2001). Hossain ve diğ. (2011), biberiye, mercanköşk ve güveyotu bitkilerinin antioksidan aktiviteleri ve fenolik madde profillerini incelemişlerdir. Biberiyede; rosmarinik asit, karnosik asit ve karnosol bileşenleri sırası ile 15.23 mg/g ; 10.986 mg/g; 5.647 mg/g ; mercanköşkte; rosmarinik asit, karsonik asit, lutein-7-O-glikozit, karnosol bileşenleri sırası ile; 17.50 mg/g; 6.375 mg/g; 5.674 mg/g; 5.288 mg/g; güveyotunda ise; rosmarinik asit, karsonik asit, karnosol, lutein-7-O-glikozit , apigenin-7-O-glikozit bileşenleri sırası ile; 10.21 mg/g; 8.621 mg/g; 6.186 mg/g; 5.397 mg/g; 2.751 mg/g olarak tespit etmişlerdir.

Adaçayının temel antioksidan etkisi karsonik asit, karnosol, kafeik asit türleri ve rosmarinik asit bileşenlerinden gelmektedir (Farhat ve diğ., 2014). *Salvia officinalis*' in içerdiği temel antioksidatif bileşikler Şekil 2.2' de verilmiştir. Kontogianni ve diğ. (2013), *Salvia officinalis* ekstraktlarında fitokimyasal içeriği ve miktarını belirlemek için yapmış oldukları çalışmada ursolik asit başta olmak üzere, oleanolik asit miktarlarının da yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

2.3 Bitkisel Kaynaklardan Fenolik Madde Ekstraksiyonu

Fenolik maddelerin ekstraksiyonunda çözücü seçimi ve konsantrasyonu, örneğin partikül büyüklüğü, sıcaklık, süre, örnek:çözücü oranı gibi ekstraksiyon parametreleri ve ekstraksiyon metotları etkilidir. Çözücü türü ve polaritesi antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde önemli olan tekli elektron transferi ve hidrojen atom transferi üzerine etkilidir (Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2006). Literatürde antioksidan ekstraksiyonu için kullanılmış olan farklı çözücüler mevcuttur. Tıbbi otların ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler genellikle metanol, etanol, aseton, pertolyum eter, hekzan ve bunların farklı konsantrasyonlarıdır.



Şekil 2.2: *Salvia officinalis*' in içerdiği temel antioksidatif bileşikler (Deans ve Simpson, 2000).

Aynı örnekten farklı ekstraksiyon parametreleri ile elde edilen fenolik madde miktarları değişiklik göstermektedir. Michiels ve diğ. (2012), portakal, elma, pırasa ve brokoli örnekleri üzerinde yapılan denemelerde antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri ve ekstraksiyon koşullarının antioksidan kapasite sonuçları üzerine etkisini incelemişlerdir. Ekstraksiyon koşulları olarak çözücü seçimi, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, katı madde çözücü oranı belirlenmiştir. Çözücü olarak metanol, asetik asit, su ve aseton seçilmiş ve bunların farklı oranlarda karışımları kullanılmıştır. Aseton bazlı çözücü karışımlarının metanol bazlı çözücü karışımlarına göre daha fazla fenolik madde ekstrakte ettiği bildirilmiştir. Sıcaklık olarak 4, 25, 50 ve 70 °C koşullarında iki farklı çözücü karışımı ile çalışılmıştır. 4 °C de gerçekleştirilen ekstraksiyona göre 70 °C de gerçekleştirilen ekstraksiyonda portakalda %21 verim artışı görülürken pırasada %10 verim düşüşü görülmüştür. 20-40-60 dakika inkübasyon süresi ile 20 dakika ekstraksiyon gerçekleştirilerek sürenin etkisi incelenmiştir. Pırasada 40 dakika inkübasyon süresi ile +%40 ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Portakalda ise 20 dakika inkübasyon süresi ile +%12 verim sağlanmıştır. Çözücü katı madde oranı 1g:2 mL ile 1 g:100 mL arasında test edilmiştir. Portakal ve pırasada 1:100 oranında maksimum verim elde edilirken, elma

ve brokolide 1:40 oranında maksimum verim elde edilmiştir. Çalışmada tüm parametrelerin antioksidan kompozisyonu ve miktarı üzerine çok fazla etkisi olduğu bildirilmiştir.

Bitkisel kaynaklardan çeşitli maddelerin eldesinde klasik ekstraksiyon metodunun kullanılması zaman kaybı ve yüksek miktarda çözücü gerektirmeleri, yorucu olmaları, düşük seçiciliğe ve düşük verime sahip olmaları ve çevreye zararlı etkilerinin bulunması gibi bazı olumsuz tarafları olması nedeni ile yeni ekstraksiyon tekniklerine yönelim artmıştır (Ghafoor ve diğ, 2010; Roy ve diğ, 2012). Yeni ekstraksiyon tekniklerinden bazıları; süperkritik akışkan ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyondur.

2.3.1 Klasik çözücü ekstraksiyonu

Ekstraksiyon; katı ya da sıvı fazda bulunan bileşenlerin, farklı çözünürlük özellikleri yardımı ile sıvı faza alınması işlemidir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve katı-sıvı ekstraksiyonu olarak iki şekilde gerçekleşir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunda; birbirine karışmayan iki sıvının yoğunluk farkından yararlanılarak ayırma hunisinde yoğun olan sıvının alta, daha az yoğun olan sıvının ise üste çıkması prensibi uygulanır. Genellikle kimya, petrol rafinerileri ve farnasötik endüstrilerinde uygulanan bir yöntemdir. Gıda alanında klasik çözücü ekstraksiyonunun kullanılması alanları Çizelge 2.3 'te verilmiştir.

Katı- sıvı ekstraksiyonunda öğütülmüş katı örneğin sıvı çözücü ile muamele edilmesi yolu ile katı matriksin sıvı çözücüye geçmesi sağlanır. Katı-sıvı ekstraksiyonun ana aşamaları şu şekildedir;

1. Çözücünün katı matris içine girişi,
2. Bileşenlerin çözünmesi ya da ayrışması
3. Çözünen bileşenlerin katı matrisin dışına aktarılması
4. Ekstakte edilen çözünen bileşenlerin katı matriksin dış yüzeyinden çözeltiye geçmesi
5. Ekstraktın katıya göre hareketi ve
6. Ekstrakt ve katının seperasyonu (Aguilera, 2003).

Çizelge 2.3: Klasik çözücü ekstraksiyonun kullanım alanlarından örnekler (Llyod ve Wyk, 2011).

Çözücü	Besleme	Ürün	Komponent
Su	Elma pulpu	Elma suyu	-
	Maltlı arpa	Mayalanmış arpa	Şeker, tahıl çözeltisi
	Kelp	Karagenan	-
	Manyok	Nişasta	Siyanogeneyik glikositler
	Turunçgil sıkım kalıntısı	Turunçgil molası	-
	Papaya lateksi	Papain	Papain
	Biberiye yaprağı	Esansiyel yağ	Esansiyel yağ
	Turunçgil kabuğu	Esansiyel yağ	Esansiyel yağ
Asidik su	Kolajen	Jelatin	Jelatin
	Turunçgil kabuğu	Pektin	Pektin
	Yabandomuzu midesi	Pepsin	Pepsin
Alkali su	Yağsız soya unu	Soya proteini	-
Etanol	Kara havuç	Betalain	Betalain
	Hayvan pankreası	İnsülin	İnsülin
	Baharatlar	Baharat ekstraktları	-
	Vanilya çekirdeği	Vanilya esansı	-
Metilen klorür	Yeşil kahve çekirdekleri	Kafeinsiz kahve	Kafein
Hekzan	Soya	Soya yağı	-
Metil etil keton	Baharatlar	Baharat oleorasinleri	-
Tribütil fosfat	Fosforik asit	Gıdaya uygun fosforik asit	-

Endüstriyel uygulamalarda önemli bir kriter olan zaman kaybını önlemek için ekstraksiyon öncesi belirlenmesi gereken ekstraksiyon hızını etkileyen faktörler; katı fazın hazırlanması, difüzyon hızı, sıcaklık, çözücü seçimi ve katı materyalin nemidir (Takeuchi ve diğ, 2009).

Katı-sıvı ekstraksiyonu bitkisel kaynaklardan antioksidan ve fenolik madde ekstraksiyonlarında da uzun yıllardır uygulanan yöntemlerden biridir. Bu çalışmalardan birkaçı aşağıda özetlenmiştir.

Alberti ve diğ. (2014), yanıt yüzey yöntemi kullanarak elmadan fenolik madde ekstraksiyonu optimizasyonu çalışması gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada Box-Benhken deney tasarımı kullanılmış, bağımsız değişken olarak zaman (10-20 dakika), sıcaklık (10-40 °C) ve çözücü konsantrasyonu (% 70-99.9 metanol ve %50-80 aseton) seçilmiştir. Toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasitesine (DPPH ve FRAP yöntemleri ile) bakmışlardır. Optimum ekstraksiyon koşullarını 28 °C'de %84.5 metanol ile 15 dakika ekstraksiyon ve 10 °C'de %65 aseton ile 20 dakika olarak tespit etmişlerdir. Aseton ile gerçekleştirilmiş olan ekstraksiyonların çoğunda daha fazla biyoaktif bileşen ekstrakte edilebilmiş, dolayısıyla daha yüksek antioksidan kapasite tespit etmişlerdir.

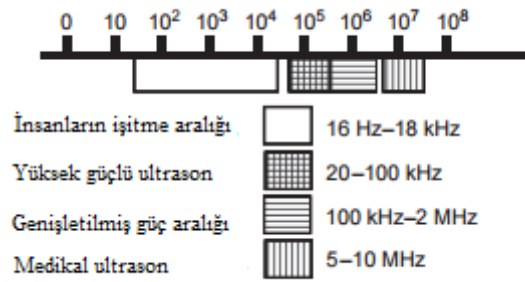
Vazquez ve diğ. (2012), yanıt yüzey yöntemi ile kestane tohumu kabuğundan antioksidan ekstraksiyonu optimizasyonu çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Çözücü olarak etanol ve metanol olmak üzere iki çözücü seçmişlerdir. 3³ faktöriyel dizayn kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada bağımsız değişkenleri sıcaklık (25-75 °C), zaman (30-120 dakika) ve çözücü konsantrasyonu (%50-90) seçmişlerdir. Ekstraksiyon verimi, toplam fenolik madde, antioksidan aktivite (FRAP, DPPH, ABTS metodları ile) ve ortalama molekül ağırlıklarını incelemişlerdir. Sıcaklık ve çözücü konsantrasyonlarının tüm ölçümler üzerinde etkili olduğunu ancak zamanın etkisinin önemsiz derecede az olduğunu tespit etmişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşulları metanolün çözücü olarak kullanıldığı deneylerde 75°C 'de 75 dakika boyunca %50 metanol konsantrasyonu ile gerçekleştirilen ve çözücü olarak etanolün kullanıldığı deneylerde ise 75°C'de 30 dakika boyunca %50 etanol olarak tespit edilmiştir. Bu koşullarda metanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda %18.95 verim elde edilmiş, toplam fenolik madde miktarı 36.32 g GAE/100 g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Etanol ile optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda ise %17.95 verim elde edilmiş, toplam fenolik madde miktarını ise 26.11 g GAE/ 100 g ekstrakt olarak bulmuşlardır.

Juntachote ve diğ. (2006) limon otu (*Cympopogon citratus*), havlıcan (*Alipnia galanga*), hint fesleğeni (*Ocimum sanctum*) ve biberiyeinin (*Rosmarinus officinalis*) etanol:su oranı, sıcaklık ve süre olarak 3 bağımsız değişken kullanılarak ekstraksiyon verimi ve ekstrakste edilen fenolik maddelerin antioksidan özelliklerini yanıt yüzey yöntemi kullanarak optimize etmişlerdir. Etanol:su oranı 3:1-1:3 v/v arası, ekstraksiyon sıcaklığı 25-75 °C arası, ekstraksiyon süresi 30-90 dakika arası

seçilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarını şu şekilde bulmuşlardır: limon otu için 3:1 etanol: su, 25 °C ve 30 dakika; havlıcan ve hint fesleğeni için 3:1 etanol:su, 75 °C ve 90 dakika, biberiye için ise yine 3:1 etanol:su, 75 °C ve 30 dakika. Etanol su oranının çalışılan tüm örnekler için ekstraksiyon verimi, indirgeme gücü ve toplam fenolik madde miktarı üzerine en fazla etkisi olan bağımsız değişken olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak etanol su oranının antioksidan aktivite üzerinde etkisinin olmadığı görülmüştür. Ekstraksiyon sıcaklığının, limon otunda ekstraksiyon verimi, havlıcada indirgeme gücü; hint fesleğeni ve biberiyede ise indirgeme gücü ve toplam fenolik madde üzerinde önemli bir etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Ekstraksiyon zamanının ise yalnızca hint fesleğeninin indirgeme gücü üzerinde etkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

2.3.2 Ultrason destekli ekstraksiyon

Ultrason, saniyede 20.000 veya daha fazla titreşim gerçekleştiren ses dalgaları ile enerji meydana getirilmesidir. İnsanların duyabileceği ses dalgaları 20 Hz ile 20 kHz arasındadır, ultrasonik ses dalgaları ise insanların duyabileceği ses dalgalarının üzerinde, 20 kHz ile 10 MHz arasındadır. Gıda sanayinde ultrason uygulamaları ise genellikle 20 kHz ile 1 MHz arasındadır. 5 MHz üzeri ultrason uygulamaları genellikle medikal tanı alanında kullanılmaktadır (Şekil 2.3).



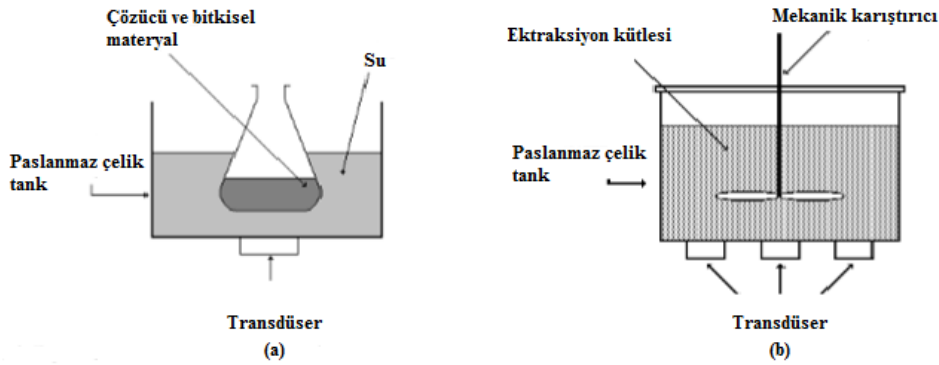
Şekil 2.3: Ses dalgası tipleri (Chemat ve diğ, 2008)

Ultrason cihazları alternatif akımı bir dönüştürücü (transdüser) sayesinde mekanik titreşimlere dönüştürürler. Ultrason destekli ekstraksiyonda ultrasonik banyo (indirekt) ve proflu ultrason (direkt) en çok kullanılan uygulamalardır (Takeuchi ve diğ, 2009). İndirek ve direk ultrason uygulamalarının şematik gösterimi Şekil 2.4' te verilmiştir. Ultrasonik banyolar, duvarında bir ya da daha çok transdüser bulunan paslanma çelik tanklardır. Ekonomik, kolay kullanımlı ve çok amaçlıdır. Ultrason

işlemi uygulanacak maddeler banyo içerisine yerleştirilir, madde içerisine uygulanan maksimum güç genellikle $1-5 \text{ W/cm}^2$ kadar geçebilmektedir. Ultrasonik banyo genellikle yüksek hacimdeki uygulamalarda kullanılmaktadır. Ultrasonik banyonun dezavantajı ise materyal ve çözücünün içerisine yerleştirildiği sıvının uygulama esnasında ısınmasıdır.

Proflu ultrason uygulamaları direk katı-sıvı karışım içerisine etki etmesi dolayısıyla fazla güç kullanımına neden olur. Bu nedenle genellikle laboratuvar ortamında gerçekleştirilen, küçük hacimli çalışmalarda kullanılmaktadır. Proflu ultrason cihazlarının avantajı ise daha verimli kavitasyon sağlayan lokalize enerjidir (Takeuchi ve diğ, 2009; Chemat ve diğ, 2008; Torley ve Bhandari, 2007).

Ultrason uygulaması gıda sektöründe birçok alanda kullanılmaktadır. Ultrasonun gıdalardaki mevcut ve potansiyel uygulama alanları Çizelge 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4: İndirek (a) ve direk (b) ultrason uygulamalarının şematik gösterimi (Vinatoru, 2001).

Ultrason destekli ekstraksiyonun avantajları; ekipmanın ucuz olması, kullanım kolaylığı, çevre dostu olması, minimum bozulma ile hedeflenen bileşenin ekstraksiyonunun maksimize edilmesi ve yüksek verim elde edilmesidir. Ultrason destekli ekstraksiyon kütle transferini hızlandırır böylece daha fazla işlem zamanı sağlar ve klasik ekstraksiyon metodu ile kıyaslandığında daha az çözücü tüketimi sağlar (Vieira ve diğ, 2013; Wu ve diğ, 2014; Gonzalez ve diğ, 2015). Ultrason destekli ekstraksiyon hücreleri parçalayarak penetrasyonu artırır (Vinatoru ve diğ, 2001).

Çizelge 2.4 : Ultrasonun gıdalardaki mevcut ve potensiyel uygulamaları (Tavman, 2009).

UYGULAMA	ETKİ
Katı yağların ve şekerlerin kristalizasyonu	Kristalizasyon akısını artırır, nükleasyonu uniformize eder.
Gaz giderme	Fermantasyon sonrası karbondioksit gazını giderir.
Köpük kırma	Kazanların doldurulması sırasında sıvıların pompalanmasından oluşan köpük giderme
Ekstraksiyon	Ekstraksiyon hızı ve etkinliğinin artırılmasında
Ultrason yardımıyla kurutma	Sıcak havayla kurutmada kuruma etkinliğini artırarak daha düşük sıcaklıklarda ve hava hızlarında yüksek verimle kuruma sağlar.
Karıştırma ve emülsifikasyon	Ticari olarak uygulanmaktadır aynı zamanda emülsiyon kırma da kullanılabilir.
Alkollü içeceklerin olgunlaştırılması ve oksidasyonu	Alkollü içeceklerin hızlı okside olmasını sağlar.
Etin olgunlaşması	Kürlenmiş etlerde miyofibriller proteinlere etki eder.
Nemlendirme ve fogging	Havanın nemlendirilmesinde kullanılan sistemlerde, dezenfektan olarak gazlama işleminde
Temizleme ve yüzey dekontaminasyonu	Kümes hayvanlarının kesiminde kullanılan ekipmanın temizlenmesinde ticari olarak kullanılmakta olan sistemde özellikle mevcut yöntemlerle kolay temizlenemeyen boru iç temizliğinde kullanılır.
Kesme	Çok yumuşak/sert yada kırıldan özellikteki zor ürünlerin kesilmesinde daha hijyenik, daha az kayıplı ve daha hızlı olan ticari uygulamalar
Atık işleme	Pestisit kalıntılarının giderilmesinde
Hava kaynaklı tozların çökeltilmesi	Duvar tipi sistemlerle havadaki tozların giderilmesi ve atık gazların tozların giderilmesinde
Enzim aktivitesinin inhibisyonu	Sükroz inversiyonunu ve pepsin aktivitesini durdurabilir; genellikle oksidazlar ultrason uygulamasıyla inaktive edilebilir fakat katalazlar sadece düşük konsantrasyonlarda etkilenir; redüktazlar ve amilazlar ultrason uygulamasına çok dirençlidir.
Canlı hücrelerin uyarılması	Düşük güçteki ultrason uygulaması hücre duvarı zarar görmeksizin hücrelerin etkinliğini artırır, örneğin yoğurt üretiminde Lactobasillus etkinliği %40 artmıştır, ayrıca tohum çimlenmesi ve balık yumurtası oluşumunda da etkinliği gösterilmiştir.
Ultrason destekli dondurma	Donmada kristal büyüklüğü kontrolü ve buz kristal oluşum bölgesinde geçen sürenin kısaltılması
Ultrason destekli filtrasyon	Filtre ortamından birim alandan birim zamanda geçen madde miktarında artış meydana gelir.
Mikrobiyal inaktivasyon	Sıcaklı ve basınçla kombine olarak uygulanan ultrason işlemiyle mikrobiyal inaktivasyonu daha etkinleştirir ve bunun sonucunda aynı letaliteyi sağlamak için gerekli işlem süresi kısalmış ve/veya sıcaklığı azalır.

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminin birçok avantajı olmasına rağmen yapılan bazı çalışmalarda ekstrakte edilen bileşenlerin stabilitesi üzerine olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır. Zhao ve diğ. (2006) yüksek yoğunluklu ultrason uygulaması ile ekstrakte ettikleri bir çeşit karetenoid olan (all-E)-astaksantin tanımlanamayan renksiz bileşenlere degrede oldukları tespit edilmiş ve artan ekstraksiyon süresi ve ultrason gücünün degradasyonu arttırdığı tespit edilmiştir. Biesaga (2011) mısırdaki bulunan flavonoidlerin farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstrakte edilmesi sonucu stabilitelerini karşılaştırmıştır. Ultrason destekli ekstraksiyon diğer yöntemlere göre flavonoidlerin daha fazla degrede olmasına neden olduğu tespit edilmiştir. İçerdikleri hidroksil grubu miktarı ile bağlantılı olarak mirisetin, kuersetin, kamferol, ramnetin en fazla degrede olan flavonoidlerdir.

Mason ve Vinatoru (2011) 'ya göre ultrasonun daha iyi kütle transferi ile ekstraksiyon verimini arttırmasında birbiri ile bağlantılı üç mekanizma söz konusudur. Birincisi, katı yüzeye yakın asimetrik kabarcıkların çökmesi ile mikrojetlerin oluşumu ile bitki dokusunun geçirgenliğini arttırır ve hücre içi maddeleri serbest bırakır ve hücreler parçalanır. İkincisi, kabarcıkların içe doğru patlamalarının olduğu bölgelerde lokal sıcaklık ve basınç artışından kaynaklı analitlerin çözünürlüğünü ve çözücülerin penetrasyonunu arttırır. Üçüncüsü ise ultrason tarafından üretilen şok dalgalarının bir sonucu olarak difüzyonun artmasıdır.

Ultrason destekli ekstraksiyon ile bitkisel kaynaklardan fenolik madde ekstraksiyonu ile ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Bunlardan bazılarını aşağıda yer verilmiştir;

Hammi ve diğ. (2015), Tunus *Zizyphus lotus* meyvesinden yanıt yüzey yöntemi ile ultrason destekli antioksidan ekstraksiyonu optimizasyonu gerçekleştirdikleri çalışmada; zaman, etanol konsantrasyonu, sıcaklık ve çözücü: çözünen oranını bağımsız değişkenler olarak belirlemişlerdir. %50 etanol konsantrasyonu, 25 dakika ekstraksiyon süresi, 63 °C sıcaklık, 67 mL/g çözücü katı materyal oranı *Zizyphus lotus* için optimum antioksidan ekstraksiyon koşulu olarak belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile *Aronia melanocarpa* atıklarından antosiyanin eldesi incelenmiştir. D'Alessandro ve diğ. (2014), sıcaklık, etanol konsantrasyonu ve ultrason gücünün farklı sürelerde ekstraksiyon verimi üzerine etkileri incelenmiş ve sıcaklık ve etanol konsantrasyonundaki artışın toplam

polifenol ekstraksiyonu üzerine olumlu etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Polifenollerin ekstraksiyonunda ultrason desteğinin ekstraksiyonun başlangıcında ve düşük sıcaklıkta daha etkili olduğu görülmüştür. Ancak antosiyaninlerin sıcaklık arttıkça degrade olmalarından kaynaklı olarak yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyon koşullarında antosiyanin veriminin azaldığını tespit etmişlerdir.

Corbin ve diğ. (2015), keten tohumundan ultrason destekli lignan ve diğer fenolik maddelerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu metot musilaj oluşumunda azalma sağlamış ve ekstraksiyon verimini arttırmıştır. Optimum ekstraksiyon koşulları 0,2 N sodyum hidroksit solvent ilavesi ile 60 dakikada 25 °C'de 30 kHz frekansta gerçekleştirilen ekstraksiyonda sağlanmıştır. Diğer metotlar ile karşılaştırıldığında ultrason destekli metodun en yüksek fenolik madde ekstraksiyonunu sağladığı tespit edilmiştir.

Virot ve diğ. (2010), elma posasından fenolik maddeleri ekstrakte etmişlerdir. Çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon uygulaması ile klasik ekstraksiyona oranla % 20'den fazla verim artışı sağlandığını tespit etmişlerdir.

Tao ve diğ. (2014) şarap üretiminde durultma prosesi sonrası ayrılan tortudan 40 kHz frekansında, 48 W/L yoğunlukta ultrasonik banyoda antosiyanin ve fenolik madde ekstraksiyonu optimizasyonu ANN ve GN teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullarda toplam fenolik madde miktarı 58.76 mg/g ve toplam antosiyanin miktarı ise 6.69 mg/g olarak bulunmuştur. Çalışmada ayrıca 30 gün sonundaki toplam fenolik ve antosiyanin içeriğindeki değişiklikler incelenmiş ve 30 gün boyunca 4°C tutulması sonunda toplam fenolik madde miktarında %12.5; 20 °C de saklanması durumunda %12.1 oranında azalma meydana gelmiştir. Toplam fenolik madde ekstraksiyonu için 25 dakikada 60 °C'de 60:1 seyreltme oranında %43.9 etanol konsantrasyonu parametreleri; toplam antosiyanin için ise 36.3 dakikada 59.9 °C'de 60:1 seyreltme oranında % 51.5 etanol konsantrasyonu koşullarında optimize edilmiştir.

Hossain ve diğ. (2012) mercanköşkten ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile antioksidan ekstraksiyonunun, katı-sıvı ekstraksiyonuna göre daha verimli olduğunu tespit etmiştir. Bağımsız değişken olarak sonikasyon genliği (24.4–61.0 µm), ekstraksiyon sıcaklığı (15–35 °C) ve uygulama süresi (5–15 dak) seçilmiştir. Yanıt yüzey yöntemi kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmasında 61 µm, 35 °C ve 15

dakika uygulanarak gerçekleştirilen ekstraksiyonda toplam fenolik madde, toplam antioksidan kapasite, rosmarinik asit, luteolin-7-O-glukosit, apigenin-7-O-glukosit, kafeik asit, karnosik asit ve karnosol değerleri en yüksek değerlerdir.

2.3.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Mikrodalgalar 300 MHz ile 300 GHz frekans arasında 1m ile 1 mm arasındaki dalga boylarında (infrared ile radyo dalgaları arasında) iyonize olmayan elektromanyetik dalgalarıdır. Gıda proseslerinde genellikle 2450 MHz frekans uygulanmaktadır.

Mikrodalga ile ısıtmada dielektrik ve iyonik kondüksiyon olmak üzere iki mekanizma gerçekleşir. Dielektrik ısıtmada prensip, dipolar yapıda olan moleküllerin elektrik alandaki değişiklikler neticesinde dönmesi vasıtasıyla yeniden düzenlenmesidir. Dipoller 2450 MHz'de düzenlenerek saniyede 4.9×10^9 defa rastgele dağıtılır. Bu hareket sonucunda oluşan titreşim ile ısı açığa çıkar. İyonik kondüksiyon mekanizmasında ise manyetik alan uygulaması neticesinde iyonların hareket etmesi ile oluşur. Çözücünün iyon akışına direnci sonucu oluşan sürtünme ile çözücü ısınır. Çoğu uygulamalarda iki mekanizma eş zamanlı meydana gelir (Büyüktuncel, 2012; Mitra, 2004).

Gıdaların mikrodalga ile ısıtılmasında frekans, mikrodalga gücü ve ısıtma hızı, sıcaklık, gıdanın kütlesi, su içeriği, yoğunluk, fiziksel geometri, termal özellikler, elektriksel iletkenlik, dielektrik özellikler etkilidir (Konak ve diğ, 2009).

Gıdalarda uzun yıllardır çeşitli uygulamalar için kullanılan mikrodalga, ekstraksiyon verimini arttırmak için de tercih edilen bir yöntem olmuştur (Çizelge 2.5). Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, polar kimyasalların dielektrik sabiti ile bağlantılı olarak mikrodalga enerjiyi absorblama yeteneği prensibi etkindir. Klasik ısıtmanın aksine mikrodalgada ısıtmada örneğin tamamı aynı anda, homojen ve hızlı ısıtılmaktadır. Hücreler, içerisindeki nem sayesinde mikrodalga ışınlar tarafından ısıtılır ve buharlaşma neticesinde hücre duvarına basınç uygulanır. Hücre duvarı bu yüksek basınçla parçalanır ve bileşenlerin çözücüye geçişi sağlanır. Ekstraksiyon prosesinde en önemli parametrelerden biri de çözücü seçimidir. Daha büyük dipol momente sahip çözücüler daha hızlı ısınır. Bitkisel kaynaklardan fenolik madde ekstraksiyonunda en sık kullanılan çözücüler dipol momentlerine göre şu şekilde sıralanabilir; asetonitril>metanol>aseton>etil asetat>su>etil alkol>hekzan. Non polar bir çözücü olan hekzan (dipol moment<0.1) mikrodalga içinde ısınmayacaktır.

Bu gibi durumlarda non polar çözücünün polar çözücü ile karıştırılarak kullanılması önerilmektedir (Li ve diğ, 2011; Mitra, 2004; Büyüktuncel,2012).

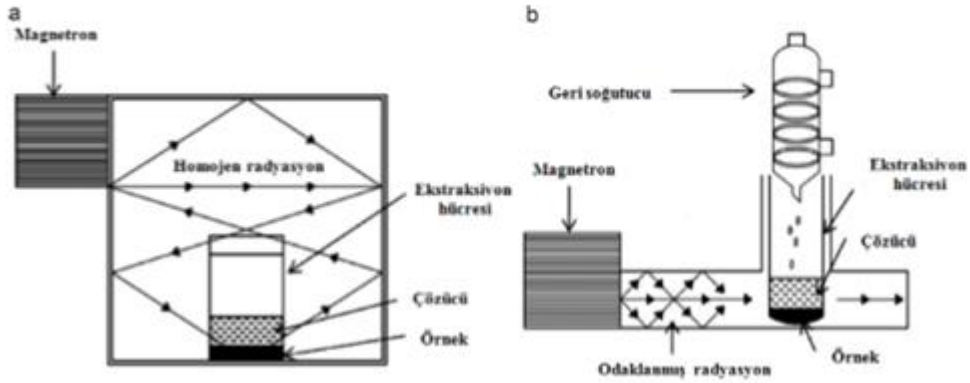
Çizelge 2.5: Gıda alanında mikrodalga kullanım uygulamaları (Fito ve diğ, 2004).

UYGULAMA	AMAÇ	ÜRÜN
Temperleme	Donma derecesinin altında sıcaklığı yükseltme	Et, balık, tereyağı
Vakum kurutma	Nem içeriğini düşürme	Tohumlar, tahıllar, turuncgil suları
Dondurarak kurutma	Nem içeriğini düşürme	Et, sebzeler, meyveler
Kurutma	Nem içeriğini düşürme	Makarna, pirinç, atıştırmalıklar
Piştirme	Aroma ve tektürü düzenleme	Jambon, köfte, patates
Ağartma	Bozulmuş enzimlerin inaktivasyonu	Meyve, mısır, patates
Fırınlama	Isıtma ve kabartıcı ajanların aktivasyonu	Ekmek, hamurışleri, donut
Kavurma	Isıtma ve ısıtma reaksiyonları geliştirmek	Kahve, kakao, yemişler
Pastörizasyon	Vejetatif mikroorganizmanın inaktivasyonu	Süt ürünleri, hazır gıdalar
Sterilizasyon	Mikrobiyel sporların inaktivasyonu	Hamurışleri, peynirler, süt, meyve suları

Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon iki farklı sistemle gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.5). En yaygın sistem, sıcaklık ve basınç kontrol edilebilen kapalı bir kap içerisinde yapılan kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer yöntem ise atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin avantajı, ekstraksiyon süresinin ve kullanılan çözücü miktarının büyük oranda az olmasıdır (Cellat, 2011).

Mikrodalga destekli ekstraksiyonun avantajları; ekstraksiyon süresinin düşmesi, çözücü kullanımının azalması, ekstraksiyon veriminin artması ve yüksek geri kazanım, kullanım kolaylığı ve düşük maliyet, geniş çözücü ve çözücü karışımları seçim imkanıdır. Dezavantajları ise süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile kıyaslandığında katı kısmın ayrılması için ilave olarak filte ya da santrifüj işlemi gerektirmesi, hedeflenen bileşen ya da çözücü apolar ya da uçucu ise mikrodalga'nın etkinliğinin çok zayıf olması ve 110-150 °C gibi yüksek sıcaklıklarda uygulanması

ve bunun ısıdan etkilenen bileşenlerin denatürasyonuna neden olmasıdır (Roy ve diğ, 2012).



Şekil 2.5: Mikrodalga destekli ekstraksiyon sisteminin şematik görünümü (a. kapalı, b. açık sistem) (Chan ve diğ, 2011).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile fenolik maddelerin ekstraksiyonu ile yapılan çalışmalardan örnekler aşağıda verilmiştir;

İnce ve diğ. (2013) yapmış oldukları çalışmada melisa bitkisinden fenolik madde ekstraksiyonu için mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini kullanılmışlardır. Laboratuvar tipi mikrodalga fırın kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonda geri soğutucu kullanarak buharlaşan çözücü geri toplanmıştır. Mikrodalga gücü 400 W olarak sabit tutulmuş, 5-10-15-20 dakika; 1:10, 1:20, 1:30 g/mL olarak farklı çözücü oranları kullanılmıştır. Çözücü olarak su kullanılmıştır. En yüksek toplam fenolik miktarı 5 dakika 1:30 çözücü oranında elde edilmiştir. Ayrıca mikrodalga destekli ekstraksiyon; ultrason destekli ekstraksiyon, klasik ekstraksiyon ve maserasyon yöntemleri ile karşılaştırılmış, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitesi en yüksek mikrodalga destekli ekstraksiyonda sağlanmıştır. Ayrıca bu çalışma ile ekstraksiyon süresinin %83 azaltıldığı tespit edilmiştir.

Karabegovic ve diğ. (2013) *Prunus laurocerasus* yapraklarından mikrodalga destekli ekstraksiyon ile yanıt yüzey yöntemi kullanarak optimum ve ekonomik ekstraksiyon koşullarını incelemişlerdir. Çalışmada klasik mikrodalga fırını elektrikli ve mekanik olarak modifiye edilerek, okside olabilecek biyoaktif bileşenlerin oksidasyonunu engellemek ya da azalmak için sisteme inert gaz olan azot verilmiştir. Bağımsız değişkenler; katı materyal çözücü oranı (0.055-0.1-0.2 g/mL), mikrodalga gücü (300-450-600 W), ekstraksiyon zamanı (10-20-30 dakika) olarak belirlenmiştir. Çalışmada

aynı zamanda 450 W güç altında 0.1 g/mL çözücü oranı ve 10 dakika ekstraksiyon süresi sabit tutularak çözücü seçiminin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Su, metanol ve 2-propanol kullanılmış, en verimli çözücü metanol olarak belirlenmiştir. Optimum koşullar 598 W'ta 0.11 g/cm³ katı materyal çözücü oranı ile 28.62 dakika olarak belirlenmiştir. Ekonomik açıdan değerlendirildiğinde enerji ve çözücü kullanımı açısından optimum koşullar ise 307 W'ta 0.17 g/ cm³ katı materyal çözücü oranı ile 17.1 dakika olarak tespit edilmiştir.

Liaid ve diğ. (2007) yapmış oldukları çalışmada kapalı sistem mikrodalga fırın kullanarak 500 W sabit güçte 22 farklı fenolik madde (benzoik asitleri benzoik aldehytler, sinamik asitler, kateşinler, kumarinler, stilbenler ve flavonoller) ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. 50 ile 175 °C arasında gerçekleştirilen ekstraksiyon neticesinde fenolik maddelere sıcaklığın etkisi araştırılmıştır. Fenolik maddelerin 100 °C' ye kadar stabil kaldıkları ancak 125 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda epikateşin, resveratrol ve mirisetin degradasyona uğramıştır. Fazla hidroksil grubu içeren bileşenlerin sıcaklıktan daha çok etkilendikleri ve bozundukları tespit edilmiştir.

Garofulic ve diğ. (2013), mikrodalga destekli ekstraksiyonla Marasca vişnesinden antosiyanin ve fenolik asit izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. Faktöriyel dizayn kullanarak 50-70 °C sıcaklıkta, 5-12 dakika süre ile, 350-500 W arasında güç uygulanmıştır. Toplam antosiyanin ve toplam fenolik asit için optimum koşullar farklılık göstermiştir. Toplam antosiyanin ekstraksiyonu için optimum koşullar düşük sıcaklık (60 °C) ve kısa süre (6-9 dakika) iken, fenolik asit ekstraksiyonu için optimum koşullar yüksek sıcaklık (70°C) ve uzun süre (10 dakika) olarak bulunmuştur. Mikrodalga gücü için optimum değer 400 W civarında antosiyanin ve fenolik asit ekstraksiyonu için farklılık göstermemiştir. Klasik ekstraksiyon ile yapılan karşılaştırmada mikrodalga destekli ekstraksiyon verimi daha yüksek bulunmuştur.

Li ve diğ. (2012), 20 çeşit domatesten fenolik madde ekstraksiyonu mikrodalga ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiş ve yanıt yüzey yöntemi ve merkezi kompozit dizayn kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite klasik ekstraksiyon ile kıyaslanmış ve mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen ekstraktlardaki değerler klasik ekstraksiyona oranla daha yüksek bulunmuştur. FRAP yöntemi ile gerçekleştirilen antioksidan

aktivite için optimum koşullar 96.5 °C, 2.06 dakika ve % 66.2 etil alkol çözeltisi iken ORAC yöntemi ile gerçekleştirilen antioksidan aktivite için 96.5 °C , 1.66 dakika ve % 61.1 etil alkol çözeltisi olarak bulunmuşlardır.

Baiano ve diğ. (2014) kuşkonmaz, karnabahar, kereviz ve hindiba atıklarından mikrodalga destekli ve konveksiyonel ekstraksiyon yöntemleri ile antioksidan ekstraksiyonu üzerine proses parametrelerinin etkilerini incelemişlerdir. Çözücü olarak suyun kullanıldığı çalışmada mikrodalga destekli ekstraksiyon için bağımsız değişkenler su/örnek oranı, ekstraksiyon süresi; konveksiyonel ekstraksiyon için ise su/örnek oranı, ekstraksiyon süresi ve sıcaklık olarak belirlenmiştir. İki yöntemde de en yüksek fenolik madde içeriği 1:2 çözücü, katı madde oranında elde edilirken, konveksiyonel ekstraksiyonda yüksek sıcaklık-kısa süre kombinasyonunda yüksek verim elde edilmiş, mikrodalga destekli ekstraksiyonda ise 4 dakika muamele sonucunda en yüksek verime ulaşılmıştır. İki yöntem karşılaştırıldığında ise konveksiyonel ekstraksiyon veriminin mikrodalga destekli ekstraksiyon verimine göre yüksek bulunduğu bildirilmiştir.

Bampouli ve diğ. (2014) sakızağacı yapraklarından dört farklı ekstraksiyon metodu (Soxhlet, mikrodalga destekli, ultrason destekli ve süperkritik CO₂ ekstraksiyonu) kullanarak verim ve antioksidan aktivite karşılaştırması gerçekleştirmişlerdir. Örnekler hem taze hem liyolifize olarak analizlenmiştir. Sonuçlar, ekstraksiyon yöntemi ve kurutma prosesinin ekstraksiyon verimi ve antioksidan aktivite üzerine önemli etkisi olduğunu göstermektedir. En yüksek verim taze yapraklardan mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilirken, en yüksek antioksidan aktivitesi yine taze yapraklardan ultrason destekli ekstraksiyon ile sağlanmıştır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun ortam basıncı ve düşük akış hızında gerçekleştirilmesi ile elde edilen verimin yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.4 Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyon

Optimizasyon, prosesin belirlenen hedefler (yanıtlar) doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin hedefe olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemidir (Koç ve Ertekin, 2008).

Matematiksel modellemenin bir uygulama alanı olan yanıt yüzey yönteminde, deneysel tasarım ile birkaç bağımsız değişkenin (girdilerin) etkilediği cevabın (çıktıların) optimize edilmesi amaçlanmaktadır. Yanıt yüzey yöntemi, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin yanıtı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin sistemin yanıtında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir (Koç ve Ertekin 2008; url-1). Gıda sanayinde fazla zaman ve yüksek maliyetlerin bertaraf edilmesini sağlaması nedeniyle yanıt yüzey yönteminin kullanılabilirliği çok yüksektir.

Yanıt yüzey yönteminin çeşitli dizaynları mevcuttur. En çok kullanılan iki dizaynı ise “Central Composite” ve “Box-Behnken” dizaynlarıdır. Central Composite dizaynı, her bir faktörün beş seviyesini kullanırken, Box-Behnken dizaynı her bir faktörün üç seviyesini kullanmaktadır. Box-Behnken tasarımları, tamamlanmamış bir blok tasarımının (incomplete block design) uygun bir şekilde iki düzeyli çok etkenli bir tasarımla birleştirilmesi sonucunda ortaya çıkarlar (Baş, 2010).

Box-Behnken tasarımları için deneme noktasının sayısı (N), $N=2k(k-1)+n_c$ denklemiyle belirlenmektedir. Bu denklemde k etken sayısını n_c merkezi deneme sayısını belirtmektedir (Ferreira ve diğ, 2007). Tasarımda tüm etkenler için alt ve üst sınırlar aynı anda hiçbir zaman kapsamadığı için, uç değerlerin yaratacağı tatmin edici olmayan sonuçlar da engellenmiş olur.

Yanıt yüzey yönteminde, prosese etki edecek faktörlerin (bağımsız değişkenler) ve deneme aralığının belirlenmesinden ve deney tasarımı yapıp, analizlerin gerçekleştirilmesinden sonra regresyon analizi yöntemi ile yanıt ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişki incelenir. Regresyon modeli tahminlendikten sonra bu denklemin ilişkiyi ne derece açıkladığının ve bu denklemi kullanarak yapılacak tahminlerin ne derece hassas olacağının araştırılması gerekmektedir. Yapılan varsayımlardan biri olan, seçilen modelin matematiksel formunun uygun olduğu, dolayısıyla gerçek ortalama yanıtı temsil edebildiği de test edilmelidir (Koç ve Ertekin, 2010). Bu amaçla varyans analizi gerçekleştirilir (ANOVA) ve model, model uygunsuzluğu testi yapılır. Uygun bir dizayn elde edildikten sonra, bu model optimum noktanın araştırılmasında kullanılır.

3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan adaçayı (*Salvia officinalis* L.) örnekleri, Türkiye'de bulunan yerel bir marketten temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan ekipmanlar; Sartorius TE2145 marka hassas terazi, Universal 32R marka santrifüj, Shimadzu UV-1700 spektrofotometre, Memmert marka çalkalayıcılı su banyosu, Azaklı ultrasonik banyo, IKA A11 marka öğütücü, Memmert marka etüv, Samsung marka mikrodalga fırın, Hevdolph MR3001 marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, Biohit proline marka otomatik pipet, IKA MSI marka vortektir.

Analizlerde kullanılan kimyasallar; gallik asit ($\geq 98\%$), etanol ($\geq 99.8\%$), (+)-catechin ($\geq 98\%$), Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), sodyum karbonat (Na_2CO_3), sodyum nitrit (NaNO_2), sodyum hidroksit (NaOH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks) ve alüminyum klorür (AlCl_3), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany) ve Merck KGaA (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir. Tüm analizlerde distile su cihazından elde edilen distile su kullanılmıştır (TKA GenPure).

3.2 Metotlar

3.2.1 Örneklerin hazırlanması

Adaçayları 35 °C etüvde sabit tartıma gelene kadar kurutulmuşlardır. Kurutulan adaçayları hemen yüksek hızlı öğütücüde öğütülmüş (Şekil 3.1), 1-2 mm boyut aralığında olacak şekilde elekten geçirilerek ekstraksiyon işlemine kadar hava almayacak şekilde kapatılarak ortam koşullarında bekletilmiştir.



Şekil 3.1: IKA A11 marka öğütücü.

3.2.2 Deney tasarımı

Yanıt yüzey yöntemi ile gerçekleştirilen optimizasyon çalışmasında Box-Behnken deneysel tasarımı kullanılmıştır. Box-Behnken, 2^3 faktöriyel bir tasarımda tüm değişkenlerin orta değerlerinin alındığı merkez noktada 3 tekrarla birlikte toplamda 15 adet deney noktası içermektedir (Çizelge 3.1).

Klasik ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyonun her biri için 3 adet bağımsız değişken belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerin seçiminde daha önce yapılmış olan çalışmalar dikkate alınmıştır (Bachir Bey ve diğ, 2014; Majeed ve diğ, 2015; Vazquez ve diğ, 2012; Karabegovic ve diğ, 2013; Dahmoune ve diğ, 2015; Morelli ve Prado, 2012; Ghistescu ve diğ, 2015).

Tüm analizler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1: Üç Bağımsız Değişkenli Box-Behnken Deneme Planı.

Deney No	X ₁	X ₂	X ₃
1	0	+1	+1
2	0	-1	+1
3	0	+1	-1
4	0	-1	-1
5	+1	0	+1
6	-1	0	+1
7	+1	0	-1
8	-1	0	-1
9	+1	+1	0
10	-1	-1	0
11	+1	+1	0
12	-1	-1	0
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

3.2.3 Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstraksiyon

3.2.3.1 Klasik çözücü ekstraksiyonu

Klasik çözücü ekstraksiyonunda bağımsız değişkenler etanol konsantrasyonu (X₁) (%60-70-80); sıcaklık (X₂) (40-50-60 °C); ekstraksiyon süresi (X₃) (60-90-120 dakika) olarak seçilmiştir. 15 ayrı deney noktasında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 g adaçayı 20 mL çözücü ile su banyosunda ekstrakte edilmiştir (Şekil 3.2). Ekstraksiyon işlemi sonrasında ekstraktlar 2500 rpm de 20 dakika santrifüj edilmiştir, (Şekil 3.2). Üst faz ayrılarak analizler gerçekleştirilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2: (a)Universal 32R marka santrifüj; (b) Memmert marka çalkalayıcılı su banyosu.

3.2.3.2 Ultrason destekli ekstraksiyon

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenler etanol konsantrasyonu (X_1) (%60-70-80); sıcaklık (X_2) (40-50-60 °C); ekstraksiyon süresi (X_3) (15-30-45 dakika) olarak seçilmiştir. 60 KHz sabit frekansta ultrasonik banyoda (Şekil 3.3) gerçekleştirilen ekstraksiyonda 1 g adaçayı 20 mL çözücü ile muamele edilmiştir. 15 ayrı deney noktasında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonrasında ekstraktlar 2500 rpm de 20 dakika santrifüj edilmiş, üst faz alınarak analizler gerçekleştirilene kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3: VWR marka ultrasonik banyo.

3.2.3.3 Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon ev tipi mikrodalga fırın ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Bağımsız değişkenler etanol konsantrasyonu (X_1) (%60-70-80); mikrodalga gücü (X_2) (300-450-600 Watt); ekstraksiyon süresi (X_3) (30-60-90 saniye) olarak belirlenmiş, 15 ayrı deney noktasında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 2 g örnek üzerine 40 mL çözücü ilavesi ile ekstraksiyon sağlanmıştır. Ekstraksiyon işleminden sonra ekstraktlar 2500 rpm de 20 dakika santrifüj edilmiş, üst faz alınarak analizler gerçekleştirilene kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4: Ev tipi mikrodalga fırın.

3.2.4 Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Toplam fenolik (TP) analizi Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Spanos ve Wrolstad (1990) 'ın uyguladığı yöntemde bazı modifikasyon yapılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Uygun olarak seyreltilmiş 100 µl ekstrakt çözeltisi 900 µl su ile karıştırılmıştır. 0.75 ml 0.2 N Folin- Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve 5 dakika sonra 0.75 ml %7.5(w/v) Na₂CO₃ çözeltisi eklenmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 90 dakika bekletildikten sonra UV-Vis spektrometrede (Şekil 3.5) 765 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak gallik asit cinsinden mg GAE/100 g kuru madde olarak verilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir, sonuçların ortalaması alınmıştır. Kalibrasyon eğrileri Ekler A, Şekil A.1-2-3'de verilmiştir.



Şekil 3.5 : UV-Vis spektrofotometre.

3.2.5 Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi

Örneklerin toplam flavonoid (TF) miktarının belirlenmesi Dewanto ve diğ. (2002) 'nin yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Standart olarak kateşin kullanılmıştır. Bu yöntemde 0,25 ml örnek tüpe konularak üzerine 1,25 ml saf su eklenmiştir. 75 µL %5'lik NaNO₂ örnek üzerine eklenmiştir. 6 dk sonra 150 µL %10'luk AlCl₃.6H₂O tüplere ilave edilmiştir. Bundan 5 dk sonra 0,5 ml 1M NaOH örnek tüplerine konulmuş ve 0,275 ml saf su ilave edilerek tüpler 2.5 ml hacme tamamlanmıştır. Tüpler 10 saniye vortekste karıştırılmış, 510 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Sonuçlar, kateşin kalibrasyon eğrisi kullanılarak kateşin eşdeğer cinsinden hesaplanarak belirlenmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak

gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması alınarak rapor edilmiştir. Kalibrasyon eğrileri Ekler A, Şekil A.4-5-6'de verilmiştir.

3.2.6 Antioksidan aktivitenin belirlenmesi

Tıbbi aromatik bitkilerde başarılı sonuçlar verdiği bilinen DPPH serbest radikalini indirgeme kapasitesi analizi ile örneklerin antioksidan aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve sonuçların ortalaması alınarak rapor edilmiştir. Sonuçlar, Troloks eşdeğeri cinsinden verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Ekler A, Şekil A.7-8-9'da verilmiştir.

3.2.6.1 DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil)radikal yakalama yöntemi

DPPH radikal yakalama yöntemi Kumaran ve diğ. (2006) 'nin metoduna göre yapılmıştır. Bu yöntemde göre 100 µl örnek üzerine 2 ml 0.1 mM DPPH radikali eklenmiş vorteks ile 10 saniye karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika bekletilmiştir. Absorbans değerleri 517 nm'de okunmuştur.

3.2.7 İstatistiksel analizler

Klasik çözücü, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sonuçlarında; regresyon analizi, istatistiksel analizler, yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon MiniTab 17.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu modelde, Çizelge 3.1' de verilen deneme dizaynına göre, ikinci derece polinomial denklem kullanılarak her bir faktör değerlendirilmiştir. Modele ait eşitlik 3.1 'de verilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1, j \neq i}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} sabit ve modelin regresyon katsayılarıdır. X_i ve X_j bağımsız değişkenlerin seviyeleridir. Üç değişkenli, ikinci derece bir modelin bu denemeye uyumu yapıp sonuçta lineer, kuadratik ve ikili kombinasyonların interaksiyon etkileri ve önemlilik dereceleri belirlenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Daha önce yapılmış olan çalışmalarda *Salvia officinalis* örneklerinde fenolik madde ekstraksiyonunda birçok değişik çözücü kullanılmıştır. Bunların arasında değişik konsantrasyonlarda metanol (Perez ve diğ, 2011), dietileter, hekzan (Roby ve diğ, 2013), aseton (Salem ve diğ, 2013), etanol (Generalic ve diğ, 2011) ve su (Martins ve diğ, 2015) vardır. Çözücülerin polaritelerine bağlı olarak ekstraksiyon verimi değişiklik göstermektedir. Roby ve diğ. (2013) yapmış oldukları çalışmada metanol, etanol, dietileter ve hekzan çözücüleri adaçayından elde edilen ekstraktlardaki antioksidan aktivite, toplam fenolik ve fenolik madde profili üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada en etkili çözücülerin azalan sıra ile metanol, etanol, dietileter ve hekzan oldukları raporlanmıştır.

Yapılmış olan çalışmalar doğrultusunda, bu çalışmada adaçayından elde edilecek olan antioksidanların doğal antioksidan olarak gıdalarda kullanım olanağı için optimizasyon gerçekleştirileceğinden çözücü olarak düşük toksisitesi nedeniyle etanol tercih edilmiştir.

4.1 Klasik Çözücü Ekstraksiyonda Adaçayından Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyonu

Klasik çözücü ekstraksiyonunda optimizasyon çalışmaları için 3 farklı bağımsız değişken, literatür bilgileri doğrultusunda, etanol konsantrasyonu (X_1) (%60-80), sıcaklık (X_2) (40-60°C) ve süre (X_3) (60-120 dakika) olarak belirlenmiştir. Optimizasyonda, bağımsız değişkenlerin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve antioksidan kapasitesi miktarı üzerine etkileri incelenmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyonu için Box Behnken deneme planı ile elde edilen deneysel değerler ve tahminlenen değerler Çizelge 4.1 'de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Klasik çözücü ekstraksiyon için Box- Benhken deneme planı ile deneysel ve tahminlenen değerler.

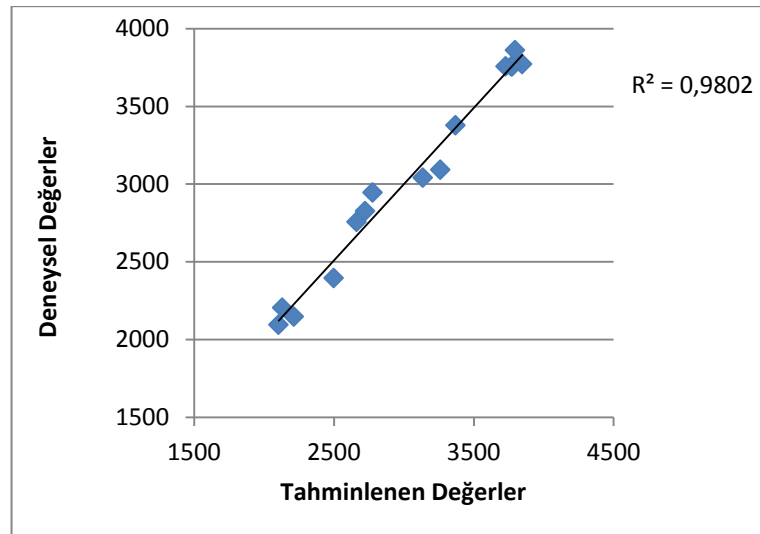
Deney No	Etanol Konsantrasyonu (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/100 g kuru madde)		Toplam Flavonoid Madde (mg CE/100 g kuru madde)		DPPH (mg TEAC/100 g kuru madde)	
	X ₁	X ₂	X ₃	Deneysel	Tahminlenen	Deneysel	Tahminlenen	Deneysel	Tahminlenen
1	70	60	120	3846.14	3771.88	2384.13	2391.57	466.49	465.86
2	70	40	120	2498.93	2395.77	1549.76	1491.24	468.48	469.08
3	70	60	60	2723.32	2826.48	1803.09	1861.61	467.52	466.92
4	70	40	60	2130.87	2205.13	1343.48	1336.04	470.06	470.69
5	80	50	120	2776.93	2945.83	1958.35	2034.89	443.29	441.87
6	60	50	120	3369.54	3378.07	2815.16	2789.71	508.18	507.30
7	80	50	60	2104.10	2095.57	1633.85	1659.31	444.37	445.16
8	60	50	60	3261.18	3092.28	2556.66	2480.13	509.84	509.01
9	80	60	90	3135.90	3041.26	2566.60	2482.63	439.77	439.58
10	60	60	90	3795.37	3861.10	3060.02	3078.04	500.51	501.93
11	80	40	90	2213.63	2147.90	1595.29	1577.27	443.29	441.87
12	60	40	90	2662.37	2757.01	2473.53	2557.50	506.44	506.63
13	70	50	90	3768.09	3757.00	2800.16	2857.88	468.16	470.78
14	70	50	90	3774.74	3757.00	2859.43	2857.88	468.32	470.78
15	70	50	90	3728.18	3757.00	2914.05	2857.88	475.85	470.78

4.1.1 Toplam fenolik madde sonuçları

Yanıt yüzey yöntemi uygulaması sonucunda, toplam fenolik madde ve test değişkenleri arasındaki empirik ilişkiyi ortaya koyan aşağıdaki regresyon denklemi elde edilmiştir (Eşitlik 4.1).

$$Y = -26635 + 457X_1 + 471.9X_2 + 48.2X_3 - 3.635X_1*X_1 - 4.417X_2*X_2 - 0.5728X_3*X_3 - 0.527X_1*X_2 + 0.470X_1*X_3 + 0.629X_2*X_3 \quad (4.1)$$

Regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomiyal model ile elde edilen tahminsel değerler ve deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.1'de verilmiştir. Korelasyon katsayısı (R^2), 0.9802 olup modelin, deneysel veriler ile tutarlı olduğunu göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda, *Berberis amurensis* (Wu ve diğ., 2015), *Coptis chinensis* Franch. (Teng ve Choi, 2014), *Nelumbo nucifera* yaprağı (Zhang ve diğ., 2015), *Lycium barbarum* (Liu ve diğ., 2014), *Origanum vulgare* yaprağı (Majeed ve diğ., 2015), *fructus sophorae* (Xu ve diğ., 2013) için R^2 ; 0.9250 ile 0.9957 arasında değişen değerlerde rapor edilmiştir.



Şekil 4.1: Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam fenolik madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Her bir bağımsız değişkenin toplam fenolik madde üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Her bir katsayının önemini gösteren P değerleri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. P değeri 0.05'ten büyük olan etkiler önemsiz kabul edilmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen toplam fenolik madde miktarı üzerine, etanol konsantrasyonu ve sıcaklık lineer ve kuadratik terimlerde istatistiksel olarak

önemlidir ($P<0.05$). Süre ise istatistiksel olarak önemli bir faktör olarak bulunmamıştır. Sürenin kuadrarik terimlerde önemli olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2: Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam fenolik madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	-26635	5683	-4.69	0.005
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	457	120	3.8	0.013
Sıcaklık (X_2)	471.9	98.9	4.77	0.005
Süre (X_3)	48.2	27.2	1.77	0.137
$X_1 * X_1$	-3.635	0.797	-4.56	0.006
$X_2 * X_2$	-4.417	0.797	-5.54	0.003
$X_3 * X_3$	-0.5728	0.0886	-6.47	0.001
$X_1 * X_2$	-0.527	0.766	-0.69	0.522
$X_1 * X_3$	0.47	0.255	1.84	0.125
$X_2 * X_3$	0.629	0.255	2.46	0.057

ANOVA testinin sonuçları Çizelge 4.3'de gösterilmektedir. Ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarı için elde edilen modelin ve model uygunsuzluğunun önemli bulunduğu görülmüştür ($P<0.05$). İstatistiksel analiz verileri lineer ve kuadratik terimlerin önemli olduğunu göstermekle birlikte, interaksiyon teriminin önemsiz olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.3: Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam fenolik maddde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	P Değeri
Model	9	27.47	0.001
Lineer	3	10.32	0.014
Kare	3	27.09	0.002
İnteraksiyon	3	3.310	0.115
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	61.01	0.016
Net Hata	2		
Toplam	14		

Toplam fenolik madde miktarı için çizilen üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, etanol konsantrasyonu arttıkça ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının yaklaşık %65 etanol konsantrasyonuna kadar arttığı, bu noktadan sonra düşüşe geçtiği görülmektedir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.4). Literatürde adaçayından

fenolik madde ekstraksiyonuna ilişkin bir optimizasyon çalışması bulunmamaktadır. Fakat, diğer bitkisel kaynaklar kullanılarak yapılan çalışmalarda, benzer sonuçlar bildirilmiştir (Amyrgialaki ve diğ., 2014; Liyana-Pathirana ve Shahidi, 2005; Gong ve diğ., 2012; Sun ve diğ., 2011; Cacace ve Mazza, 2003; Prasad ve diğ., 2011). Prasad ve diğ. (2011), yapmış oldukları çalışmada *Magifera pajang* kabuklarından fenolik madde ekstraksiyonunda, etanol konsantrasyonu %32'den %68'e doğru yükseldikçe ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının 9.27'den 12.9 mg GAE/g'a kadar arttığını raporlamıştır. Gong ve diğ. (2012), *Tagetes erecta* L. atıkları ile gerçekleştirmiş oldukları çalışmada %34.8 ile %70 etanol konsantrasyonları arasında fenolik madde ekstraksiyonunun etanol konsantrasyonu ile arasında önemli pozitif doğrusal bir ilişki olduğu görülmüştür. %70 üzeri yüksek etanol konsantrasyonlarında ise toplam fenolik madde miktarında artış görülmemiştir. Sun ve diğ. (2011), *Ilex kudingcha* C.J. Tseng ile yapılmış kudingcha içeceği ile yapmış oldukları çalışmada yine benzer şekilde, toplam fenolik madde %70 etanol konsantrasyonuna kadar artış göstererek, maksimum seviyeye ulaşmış 219.28 mg klorojenik asit/g olarak tespit edilmiştir, bu değerden sonra toplam fenolik madde içeriği düşüşe geçmiştir. %50 ile %90 etanol seviyesinde tespit edilen toplam fenolik madde içeriği istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

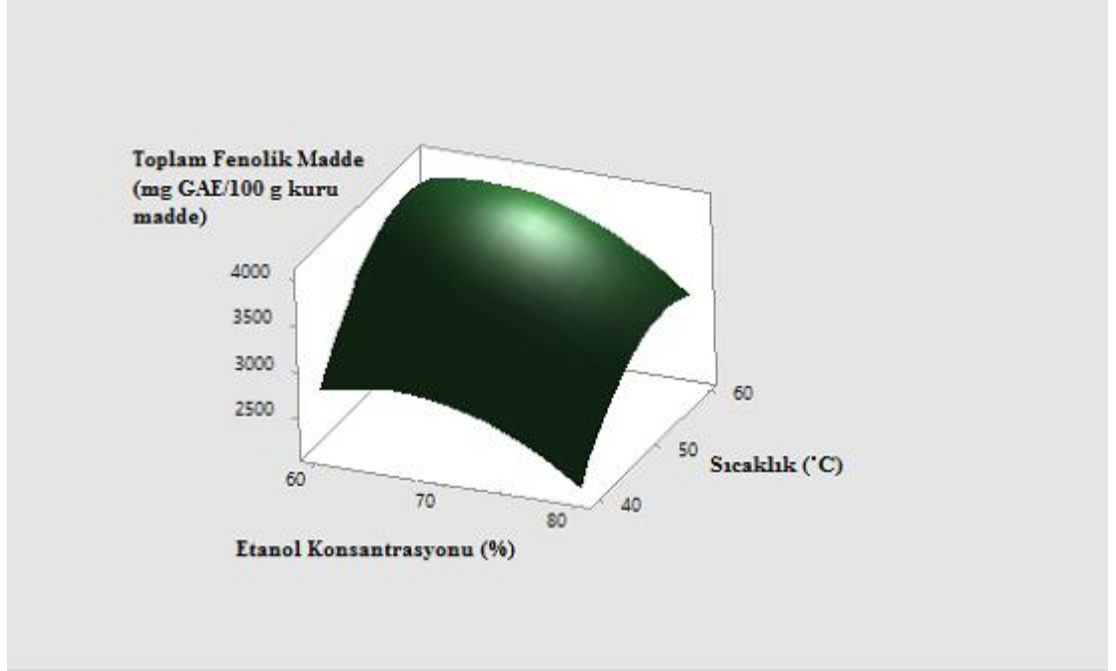
Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam fenolik madde miktarının etanol konsantrasyonu arttıkça önce artması, belirli bir konsantrasyonun sonrası azalmasının nedeni Khiari ve diğ. (2009) tarafından şu şekilde açıklanmıştır; çözücü konsantrasyonu, yoğunluk ve dinamik viskozite gibi fiziksel özellikler üzerine etkilidir. Bu parametreler de difüzyonu ve ekstraksiyon hızını etkilemektedir. Ayrıca, dielektrik sabiti de çözücü konsantrasyonu ile değişmektedir. Bu nedenle dielektrik sabiti düşürmek için su gibi polar bir çözücü içerisine etanol gibi polaritesi daha düşük olan bir çözücü eklenmesi ile, basınç ve sıcaklık değerleri ayarlanarak antosiyanin ekstraksiyonun arttırılabileceğini raporlamışlardır. Ayrıca %60 etanol konsantrasyonunda katı soğan atıklarından orta polaritedeki fenolik maddelerin efektif bir biçimde ekstrakte edilebileceğini, daha yüksek konsantrasyonlarda ise glikozit gibi polar bileşenlerin çözünürlüğünün azalmasından dolayı iyi bir sonuç alınamayacağını bildirmişlerdir. Galvan d'Alessandro ve diğ. (2012) yapmış oldukları çalışmada çözücü olarak su ve farklı konsantrasyonlarda etanol: su kullanmış, %50 etanol konsantrasyonunda en yüksek toplam fenolik madde

ekstraksiyonuna ulaşmıştır. Galvan d'Alessandro ve diğ. (2012), bunun nedenini benzer şekilde etanolün kütle transferini arttırmasına ve bu doğrultuda daha fazla fenolik madde ekstrakte edilmesine bağlamışlar, çözünür fenolik maddelerin genellikle hücre kofullarında bulunurken, flavonoid ve lignin ve çözünmeyen polifenollerin hücre zarında protein ve polisakkaritlere bağlı olarak bulunması, su ve düşük konsantrasyondaki etanolün hücrelere ulaşması ancak yüksek konsantrasyonlardaki etanolün protein denatürasyonuna yol açarak fenolik madde ekstraksiyonunu önlemesi olarak göstermiştir.

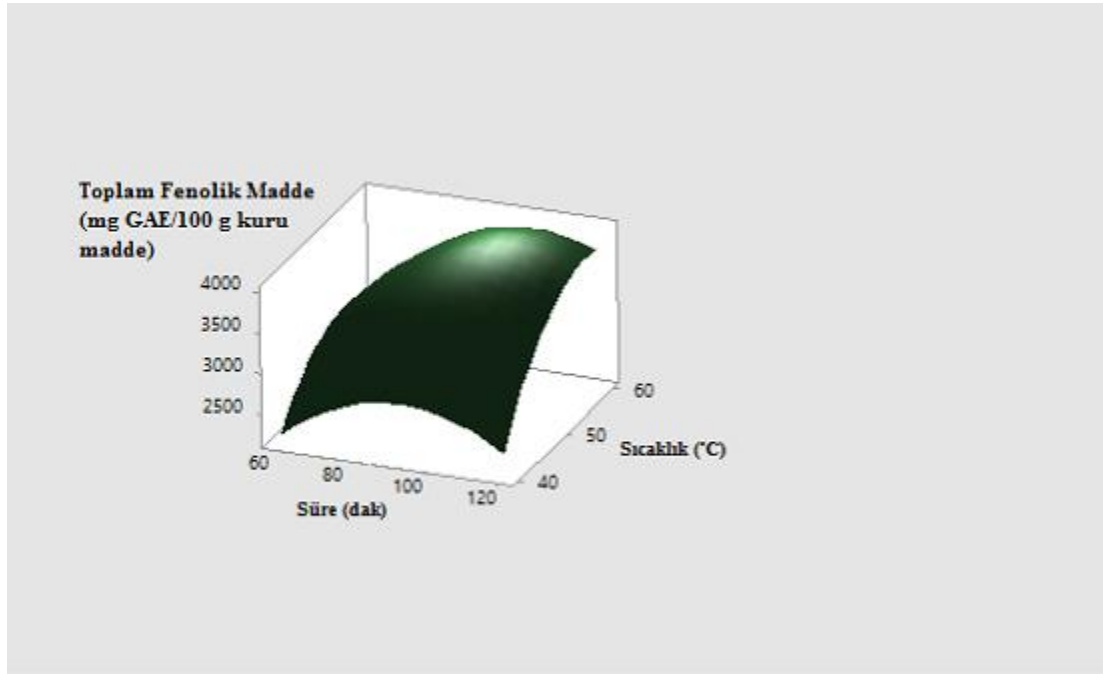
Yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, ekstraksiyon süresi arttıkça ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının 100. dakikaya kadar hızlı bir şekilde attığı, ancak bu noktadan sonra düşüşe geçtiği görülmektedir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Daha önce yapılan çalışmalarda (Bachir bey ve diğ.,2014; Zuorro ve diğ., 2015 ve Wang ve diğ., 2013) benzer sonuçlar elde edilmiştir. Zuorro ve diğ. (2015), *Cynara scolimus* L. atıklarından ekstrakte ettikleri toplam fenolik madde miktarı, çalışılan en uzun süre olan 110.4 dakikaya kadar hızlı bir artış göstermiştir. Bachir bey ve diğ. (2014) *Ficus carica* L., var. *Azenjar* ile yapmış oldukları çalışmada toplam fenolik madde ekstraksiyonu için optimum ekstraksiyon süresini 115.14 dakika olarak bulmuş, bu dakikadan sonra ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarında düşüş meydana geldiğini bildirmişlerdir. Toplam fenolik madde ekstraksiyonu, maksimum ekstrakt elde edilene kadar kütle transferinin artmasına bağlı olarak zamanla arttığını bildirmişlerdir.

Şekil 4.2 ve 4.3 incelendiğinde, ekstraksiyon sıcaklığının toplam fenolik madde ekstraksiyonunda belirleyici bir faktör olduğu görülmektedir. Adaçayından ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarı yaklaşık 56°C' ye kadar hızlı bir artış göstermiş, bu dereceden sonra düşüş görülmüştür. Bu sonuçlar daha önceki literatür çalışmalarını desteklemektedir (Silva ve diğ., 2007; Prasad ve diğ., 2011; Zuorro ve diğ., 2015). Bunun nedeni Prasad ve diğ. (2011) tarafından şu şekilde açıklanmıştır; yüksek sıcaklıkta suyun dielektrik sabiti azalmakta ve çözücü özelliğinde değişiklik meydana gelmekte ve fenolik maddelerin daha iyi ekstrakte edilebilmelerini sağlamaktadır. Yüksek sıcaklık aynı zamanda fenolik maddelerin çözünürlüğünü, difüzyon hızını, ekstraksiyon hızını arttırmakta, çözücü viskozitesini ve yüzey gerilimini azaltmaktadır. Ancak ekstraksiyon sıcaklığındaki fazla artış, kimyasal ve enzimatik degradasyona bağlı olarak fenolik maddelerin degradasyonu ya da diğer

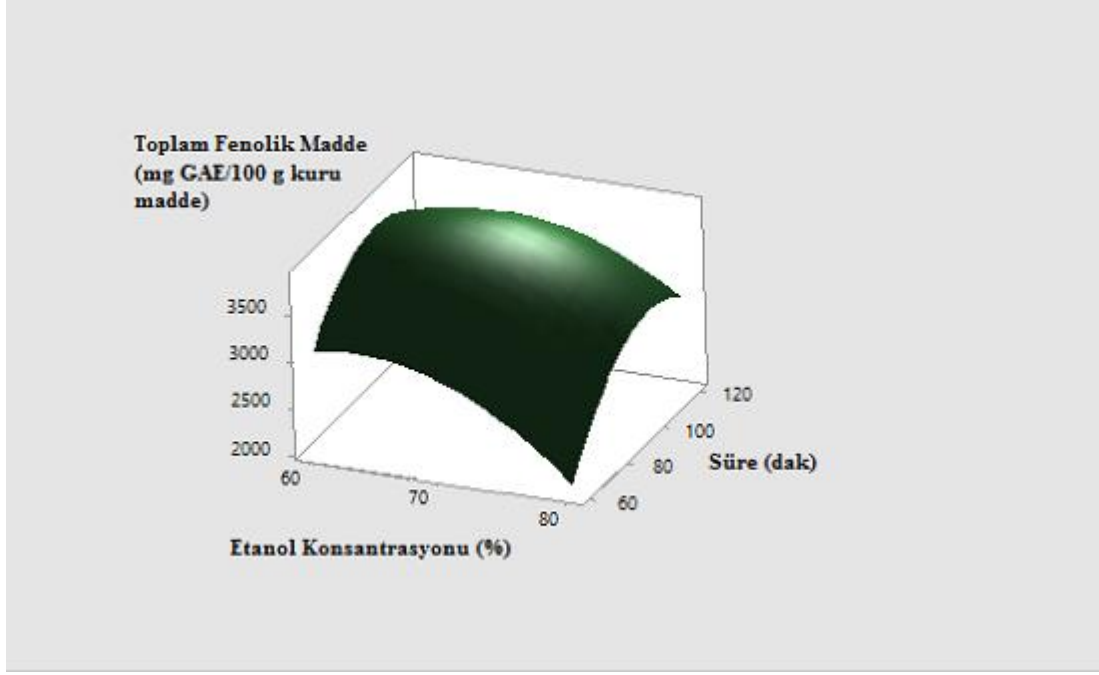
bileşenlerle reaksiyona girmesi sonucu bileşenlerin stabilitesinin engellenmesi nedeniyle toplam fenolik madde miktarında azalma görülmektedir.



Şekil 4.2 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon süresinde (90 dakika), toplam fenolik madde miktarı için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.3 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam fenolik madde miktarı için yanıt yüzey grafiği.



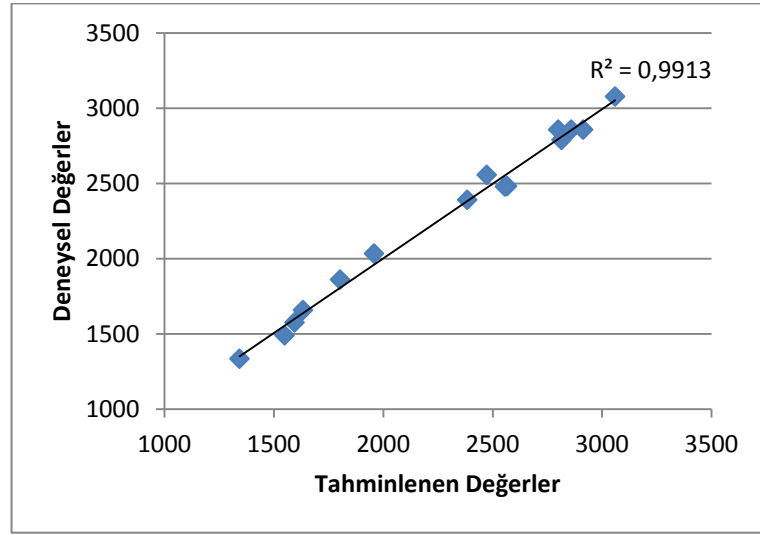
Şekil 4.4 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam fenolik madde miktarı için yanıt yüzey grafiği.

4.1.2 Toplam flavonoid miktarı sonuçları

Adaçayından klasik ekstraksiyon ile elde edilen toplam flavonoid miktarının istatistiksel analizi sonucunda kodlanmış değişkenler ile elde edilen model eşitlik Eşitlik 4.2' de gösterilmiştir.

$$Y = -7688 - 118.3X_1 + 392.7X_2 + 113.3X_3 + 0.184X_1 * X_1 - 4.525X_2 * X_2 - 0.7059X_3 * X_3 + 0.962X_1 * X_2 + 0.055X_1 * X_3 + 0.312X_2 * X_3 \quad (4.2)$$

Regresyon analizi sonucunda, R^2 değeri 0.9913 olarak elde edilmiştir. Bu değer uygulanan modelin doğruluğunu desteklemektedir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.5' te gösterilmiştir.



Şekil 4.5 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam flavonoid madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Varyans analizi ile belirlenen regresyon katsayıları, standart hata, T değeri ve P değeri Çizelge 4.4' te listelenmiştir. Buna göre, klasik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen toplam flavonoid miktarı üzerine, etanol konsantrasyonunun etkisi önemsiz olarak bulunmuştur ($P>0.05$). Sıcaklık ve süre değişkenleri ise lineer ve kuadratik terimlerde istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 4.4: Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam flavonoid madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	-7688	3368	-2.28	0.071
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	-118.3	71.3	-1.66	0.158
Sıcaklık (X_2)	392.7	58.6	6.7	0.001
Süre (X_3)	113.3	16.1	7.03	0.001
$X_1 * X_1$	0.184	0.472	0.39	0.712
$X_2 * X_2$	-4.525	0.472	-9.58	0.000
$X_3 * X_3$	-0.7059	0.0525	-13.45	0.000
$X_1 * X_2$	0.962	0.454	2.12	0.088
$X_1 * X_3$	0.055	0.151	0.36	0.731
$X_2 * X_3$	0.312	0.151	2.06	0.094

ANOVA testinin sonuçları Çizelge 4.5' te gösterilmektedir. Toplam flavonoid miktarı için elde edilen modelin çok önemli olduğu ($P<0.001$), model uygunsuzluğunun ise önemsiz olduğu bulunmuştur ($P>0.05$). İstatistiksel analiz

verileri lineer ve kuadratik terimlerin önemli olduğunu göstermekle birlikte, interaksyon teriminin önemsiz olduğu görülmüştür.

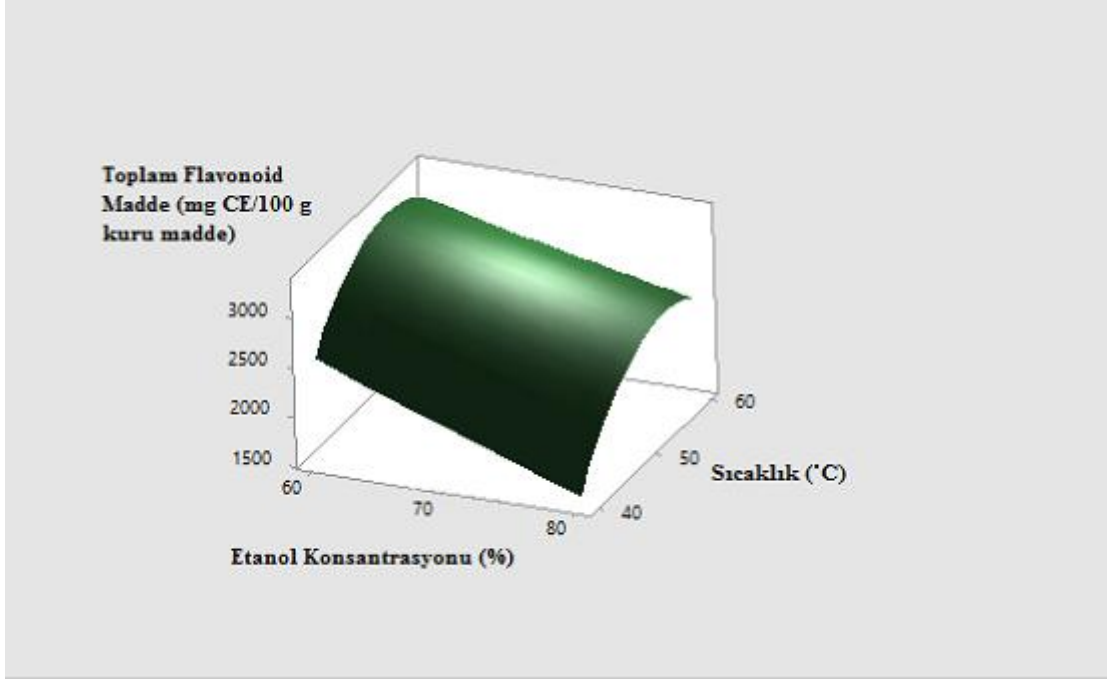
Çizelge 4.5: Klasik çözücü ekstraksiyonunda toplam flavonoid maddde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	63.30	0.000
Lineer	3	33.25	0.001
Kare	3	86.13	0.000
İnteraksiyon	3	2.960	0.136
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	3.570	0.227
Net Hata	2		
Toplam	14		

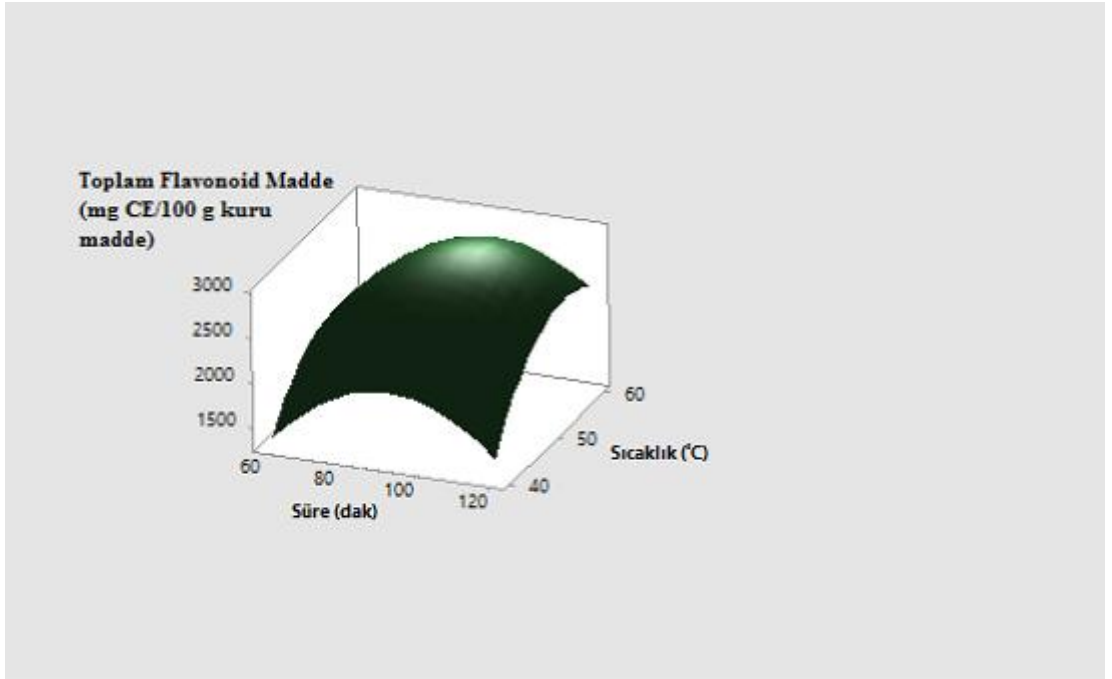
Şekil 4.6 ve Şekil 4.8 incelendiğinde, etanol konsantrasyonu azaldıkça, ekstrakte edilen toplam flavonoid miktarının arttığı görülmektedir. Xie ve diğ. (2015) yapmış oldukları çalışmada, benzer bir sonuç elde edilmiş; *Cyclocarya paliurus*'tann ekstrakte edilen toplam flavonoid miktarının etanol konsantrasyonu arttıkça azaldığı, en yüksek verimin düşük seviyede etanol konsantrasyonunda elde edildiği bildirmiştir. Yapılan bu çalışmada en yüksek toplam flavonoid miktarı %63.2 etanol konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam flavonoid miktarının ekstraksiyon sıcaklığına ve süresine göre değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.7' deki gibidir. Ekstraksiyon süresi arttıkça, yaklaşık 94. dakikaya kadar toplam flavonoid miktarı artmakta, bu dakikadan sonra ekstrakte edilen miktar azalmaktadır.

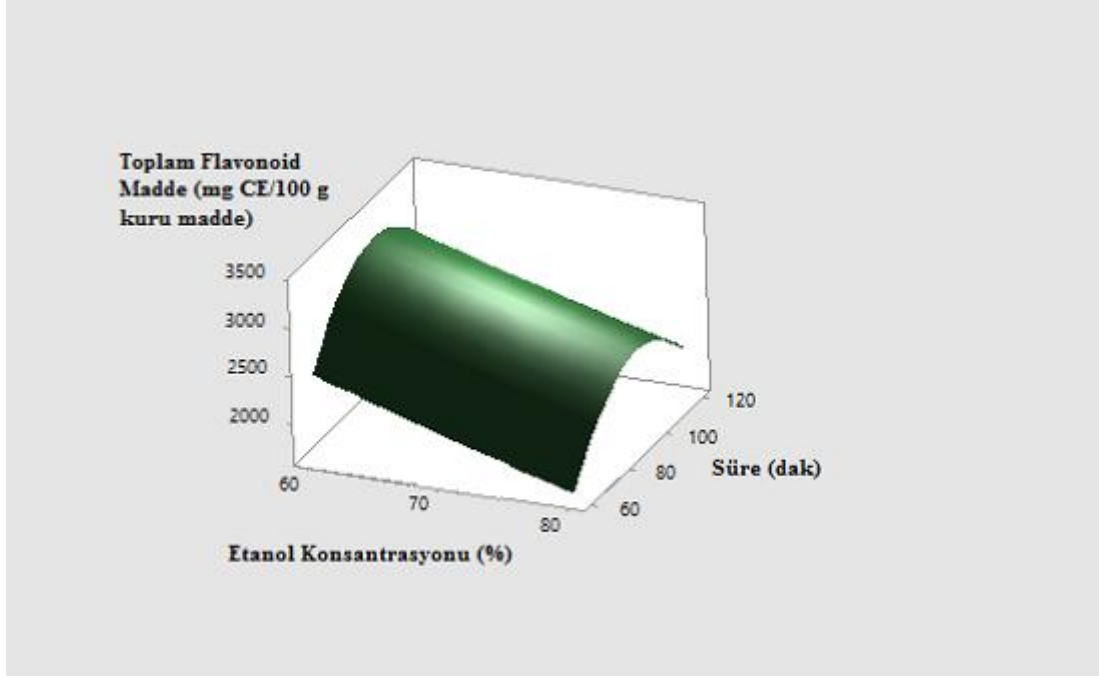
Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, ekstrakte edilen toplam flavonoid madde miktarının yaklaşık 53 °C' ye kadar hızla arttığı, bu noktadan sonra ise düşüşe geçtiği görülmektedir.



Şekil 4.6 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon süresinde (90 dakika), toplam flavonoid miktarı için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.7 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam flavonoid miktarı için yanıt yüzey grafiği.



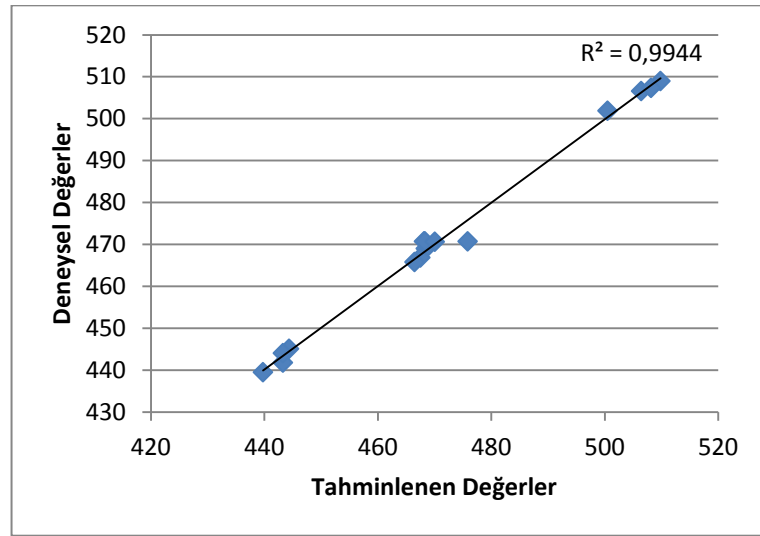
Şekil 4.8 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam flavonoid miktarı için yanıt yüzey grafiği.

4.1.3 Antioksidan kapasite sonuçları

DPPH yöntemi ile elde edilen antioksidan kapasitesi ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan regresyon denklemi Eşitlik 4.3' te verilmiştir.

$$Y = 899 - 10.53X_1 + 2.64X_2 - 0.207X_3 + 0.0500 X_1 * X_1 - 0.0328 X_2 * X_2 + 0.00071X_3 * X_3 + 0.0060 X_1 * X_2 + 0.00048 X_1 * X_3 + 0.00046 X_2 * X_3 \quad (4.3)$$

Regresyon analizi sonucunda R^2 , 0.9944 olarak elde edilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.9' da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda DPPH için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Varyans analizi ile belirlenen antioksidan kapasite üzerine, bağımsız değişkenlerin etkisi Çizelge 4.6' da verilmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen antioksidan miktarı üzerine, etanol konsantrasyonunun etkisi lineer ve kuadratik terimlerde önemli bulunurken ($P < 0.05$), sıcaklık ve süre değişkenlerinin etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$).

Çizelge 4.6: Klasik çözücü ekstraksiyonunda DPPH analiz sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	899	114	7.92	0.001
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	-10.53	2.41	-4.38	0.007
Sıcaklık (X_2)	2.64	1.98	1.34	0.239
Süre (X_3)	-0.207	0.544	-0.38	0.719
$X_1 * X_1$	0.0500	0.0159	3.14	0.026
$X_2 * X_2$	-0.0328	0.0159	-2.06	0.095
$X_3 * X_3$	0.00071	0.00177	0.4	0.705
$X_1 * X_2$	0.0060	0.0153	0.39	0.710
$X_1 * X_3$	0.00048	0.00510	0.09	0.928
$X_2 * X_3$	0.00046	0.00510	0.09	0.932

ANOVA testinin sonuçları Çizelge 4.7' de gösterilmektedir. Antioksidan kapasite için elde edilen modelin önemli bulunduğu görülmüştür ($P < 0.05$). Model uygunsuzluğu ise önemsiz bir terim olarak tespit edilmiş olup bu da modeli

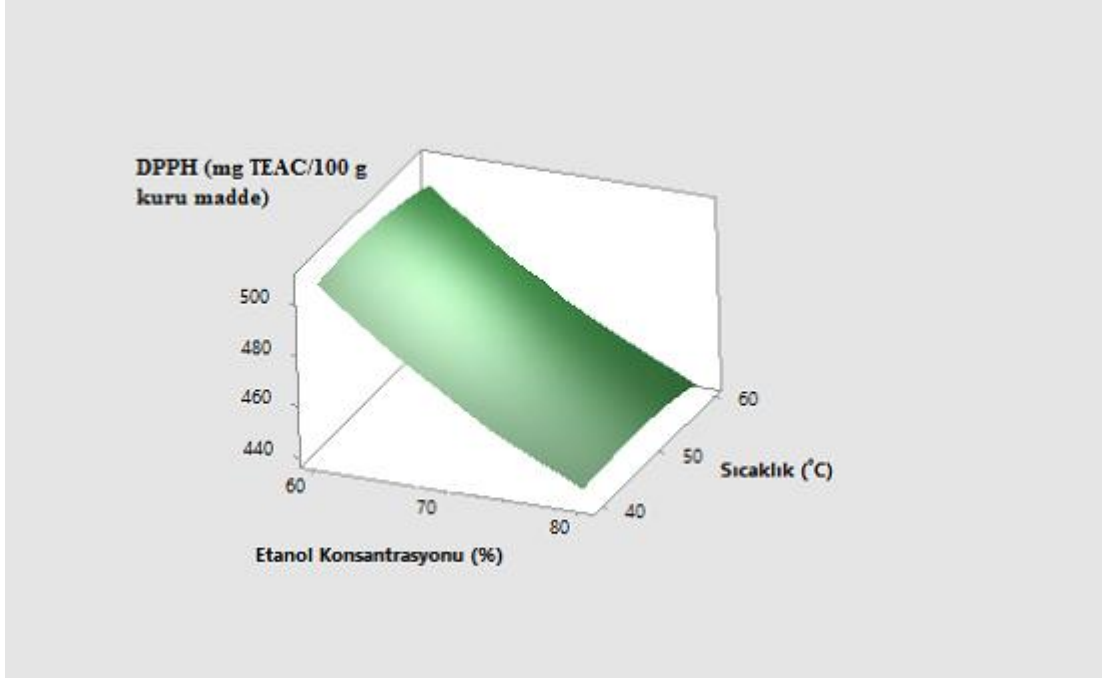
doğrulamaktadır ($P>0.05$). İstatistiksel analiz verileri lineer terimlerin önemli olduğunu göstermekle birlikte, kuadrarik ve interaksiyon teriminin önemsiz olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.7: Klasik çözücü ekstraksiyonunda DPPH için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

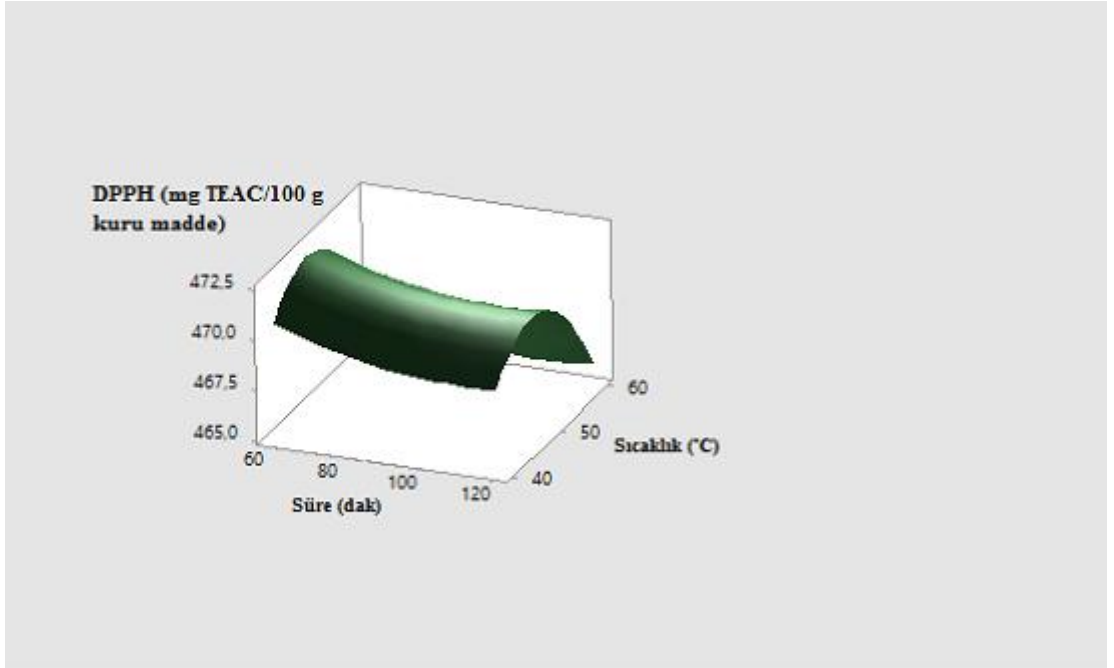
Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	97.8	0.000
Lineer	3	8.32	0.022
Kare	3	5.09	0.056
İnteraksiyon	3	0.06	0.980
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	0.14	0.926
Net Hata	2		
Toplam	14		

Yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, artan etanol konsantrasyonunun, antioksidan kapasite miktarı üzerine ters etkisi olduğu görülmektedir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.12). Etanol konsantrasyonundaki artış, tayin edilen antioksidan miktarında belirgin bir şekilde düşüşe neden olmaktadır.

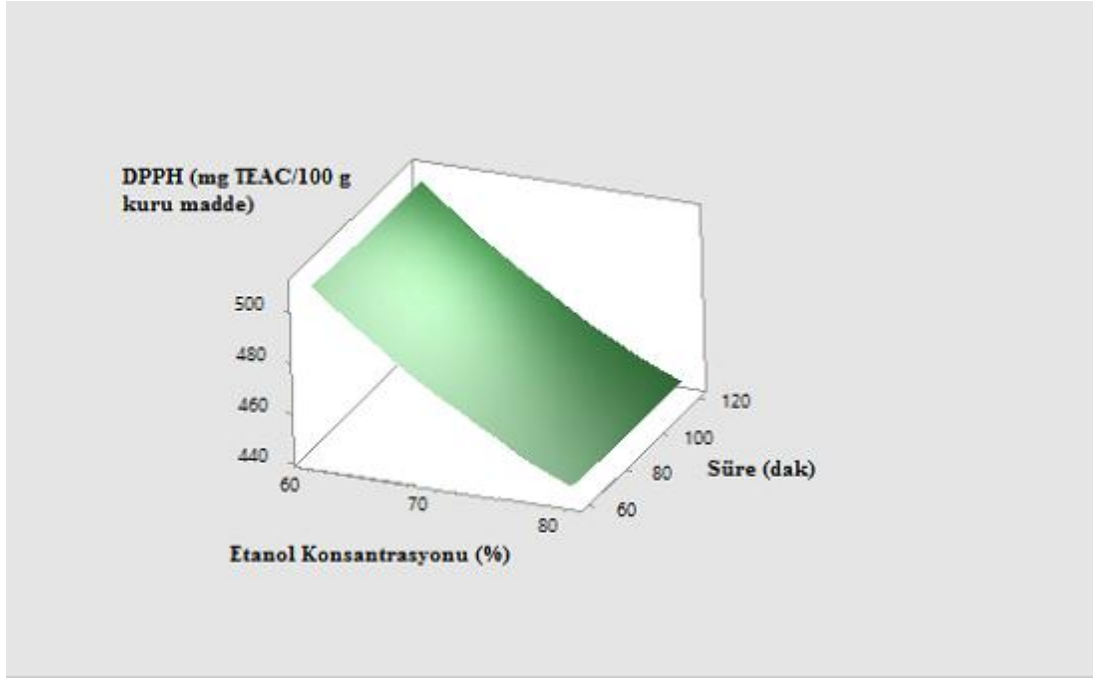
Sabit ekstraksiyon konsantrasyonunda (%70), DPPH için sıcaklık-süre grafiği incelendiğinde (Şekil 4.11), sürenin ekstrakte edilen miktara bir etkisi olmadığı görülmektedir. Çalışılan en kısa süre olan 60 dakikada, elde edilecek maksimum antioksidan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş, bu dakikadan sonra antioksidan kapasitede bir artış görülmemiştir. Sai-Ut ve diğ. (2015), mango kabuklarından antioksidan ekstraksiyonu gerçekleştirdikleri çalışmada, 19.09-220.9 dakika arasında optimizasyon gerçekleştirilmiş, en yüksek antioksidan aktivite %70 etanol konsantrasyonunda, 65 °C' de yaklaşık 60 dakikada elde edilmiştir.



Şekil 4.10 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon süresinde (90 dakika), DPPH için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.11 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), DPPH için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.12 : Klasik çözücü ekstraksiyonunda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), DPPH için yanıt yüzey grafiği.

Antioksidan kapasite üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde, yaklaşık 46 °C' ye kadar artış görülmüş, bu noktadan sonra ekstraksiyon sıcaklığının artırılması antioksidan kapasitede düşüşe neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11). Bunun nedeni Bachir bey ve diğ. (2014) tarafından uzun süreli ekstraksiyon koşullarında, ekstraksiyon gerçekleştirilen üründe bulunan antioksidanların yüksek sıcaklıkta termal degradasyona uğraması olarak açıklanmıştır.

4.2 Ultrason Destekli Ekstraksiyonda Adaçayından Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyonu

Ultrason destekli ekstraksiyonda gerçekleştirilecek olan toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite (DPPH) yanıtlarının optimizasyonu için gerçekleştirilen çalışmada, bağımsız değişkenler daha önceki literatür bilgileri doğrultusunda etanol konsantrasyonu (X_1) (%60-80), sıcaklık (X_2) (40-60°C) ve süre (X_3) (15-45 dakika) olarak belirlenmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyon için Box Behnken deneme planı ile elde edilen deneysel değerler ve tahminlenen değerler Çizelge 4.8 'de verilmiştir.

Çizelge 4.8: Ultrason destekli ekstraksiyon için Box- Benhken deneme planı ile deneysel ve tahminlenen değerler.

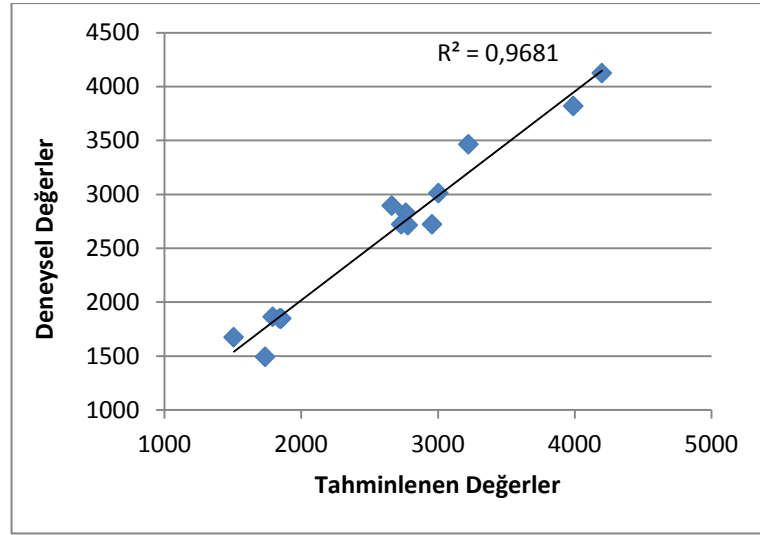
Deney No	Etanol Konsantrasyonu (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (Dakika)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/100 g kuru madde)		Toplam Flavonoid Madde (mg CE/100 g kuru madde)		DPPH (mg TEAC/100 g kuru madde)	
	X ₁	X ₂	X ₃	Deneysel	Tahminlenen	Deneysel	Tahminlenen	Deneysel	Tahminlenen
1	70	60	45	4199.12	4125.91	2721.14	2737.33	468.89	467.00
2	70	40	45	2957.46	2723.40	1647.37	1556.78	463.00	463.75
3	70	60	15	2663.01	2897.07	1870.49	1961.07	469.82	469.07
4	70	40	15	1792.51	1865.72	768.830	752.640	465.14	467.03
5	80	50	45	2765.88	2830.67	1684.78	1633.23	444.60	443.46
6	60	50	45	3223.16	3465.64	3119.13	3245.07	487.16	489.44
7	80	50	15	1736.84	1494.36	1405.39	1279.45	441.68	439.40
8	60	50	15	2780.23	2715.44	1966.92	2018.47	497.71	498.85
9	80	60	30	3004.29	3012.71	2162.07	2197.43	443.22	446.26
10	60	60	30	3990.22	3820.95	3424.39	3282.26	499.89	499.50
11	80	40	30	1506.74	1676.01	770.210	912.340	443.75	444.14
12	60	40	30	2732.23	2723.81	2213.73	2178.37	499.37	496.34
13	70	50	30	1855.34	1850.11	950.120	960.950	467.05	464.75
14	70	50	30	1842.40	1850.11	966.390	960.950	464.83	464.75
15	70	50	30	1852.60	1850.11	966.360	960.950	462.37	464.75

4.2.1 Toplam fenolik madde sonuçları

Yanıt yüzey yöntemi uygulaması sonucunda, toplam fenolik madde ve test değişkenleri arasındaki empirik ilişkiyi ortaya koyan aşağıdaki regresyon denklemi elde edilmiştir (Eşitlik 4.4).

$$Y = 39968 - 583X_1 - 617X_2 - 180.7X_3 + 3.41X_1 * X_1 + 6.17X_2 * X_2 + 1.936X_3 * X_3 + 0.60X_1 * X_2 + 0.977X_1 * X_3 + 0.619X_2 * X_3 \quad (4.4)$$

Regresyon analizi sonucunda, R^2 değeri, 0.9681 olarak elde edilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.13' te gösterilmiştir.



Şekil 4.13 : Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Varyans analizi ile belirlenen model ve bağımsız değişkenlere ait lineer, kuadratik ve interaksiyon terimleri için regresyon katsayısı, standart hata, T değeri ve P değeri Çizelge 4.9' da listelenmiştir. Çizelge incelendiğinde, ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen toplam fenolik madde üzerine, etanol konsantrasyonu ve sıcaklık parametreleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Süre ise istatistiksel olarak önemsizdir ($P > 0.05$). Toplam fenolik madde üzerine sıcaklığın etkisi lineer ve kuadratik terimlerde en önemli parametredir.

Çizelge 4.9: Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	39968	8721	4.58	0.006
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	-583	192	-3.04	0.029
Sıcaklık (X_2)	-617	157	-3.94	0.011
Süre (X_3)	-180.7	78.7	-2.29	0.070
$X_1 * X_1$	3.41	1.28	2.66	0.045
$X_2 * X_2$	6.17	1.28	4.81	0.005
$X_3 * X_3$	1.936	0.570	3.40	0.019
$X_1 * X_2$	0.60	1.23	0.49	0.648
$X_1 * X_3$	0.977	0.822	1.19	0.288
$X_2 * X_3$	0.619	0.822	0.75	0.485

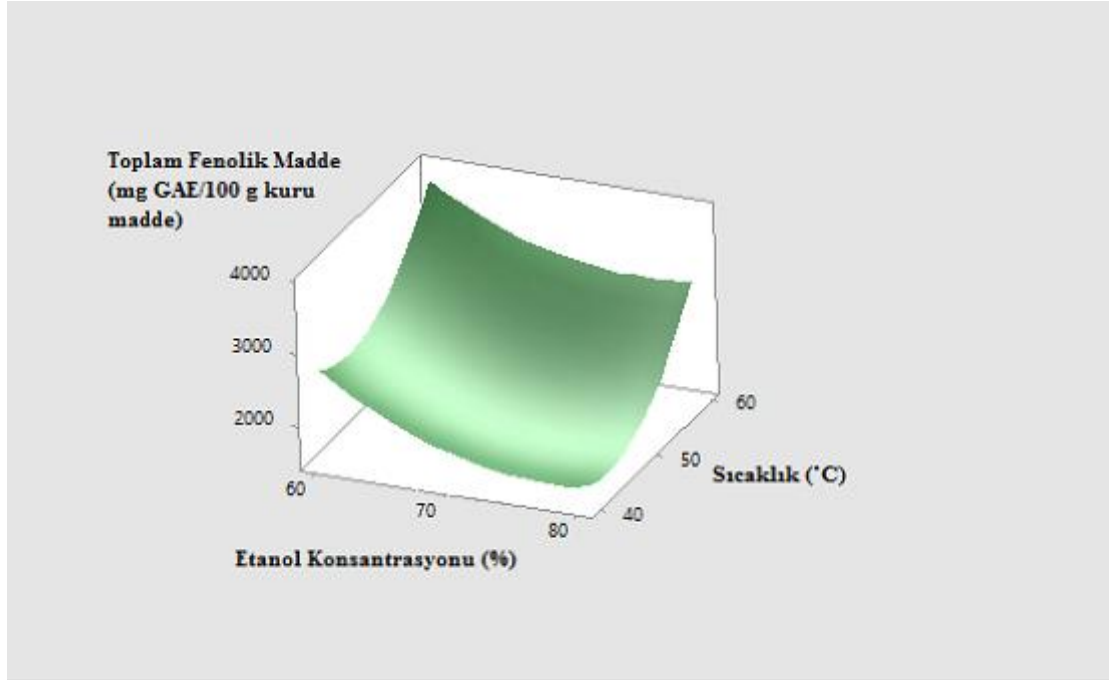
Toplam fenolik madde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi Çizelge 4.10' da verilmiştir. Elde edilen modelin ve model uygunsuzluğunun istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). İstatistiksel analiz verileri lineer ve kuadratik terimlerinin önemli olduğunu göstermekle birlikte, interaksiyon teriminin önemsiz olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.10: Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	16.87	0.003
Lineer	3	7.66	0.026
Kare	3	12.23	0.010
İnteraksiyon	3	0.74	0.573
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	2177.28	0.000
Net Hata	2		
Toplam	14		

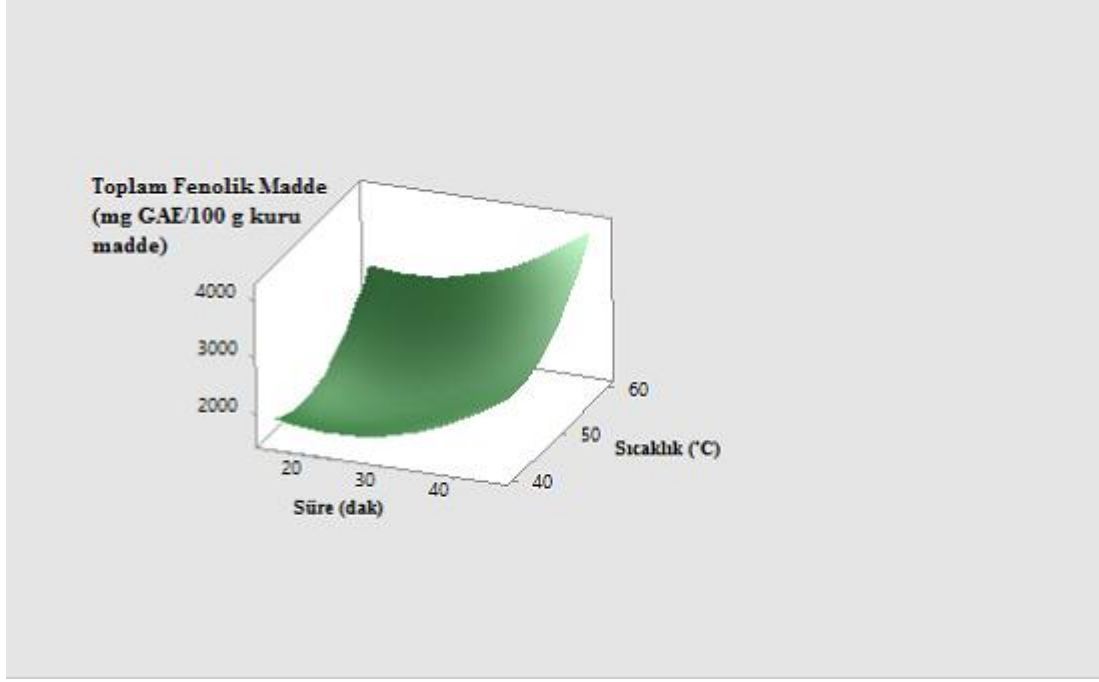
Toplam fenolik madde yanıtı için elde edilen yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, etanol konsantrasyonu arttıkça ekstrakte edilen fenolik madde miktarının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.14 ve Şekil 4.16). Benzer sonuçlar ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile fenolik madde ekstraksiyonu gerçekleştirilen literatür çalışmalarında da elde edilmiştir (Wang ve diğ., 2008; Feng ve diğ., 2015; Fang ve diğ., 2014; Hammi ve diğ., 2015; Dahmoune ve diğ., 2013). Dahmoune ve diğ.

(2013), limon kabukları ile yapmış oldukları çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon ile %30 ile 70 etanol konsantrasyonu aralığında çalışmış olup; %30 etanol konsantrasyonundan ile %63.93 etanol konsantrasyonuna kadar ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarı artmış, optimum noktada 15.08 mg GAE/g olarak bildirilmiştir. Bu konsantrasyondan sonra ekstrakte edilen miktarda azalma görülmüştür. Wang ve diğ. (2008) buğday kepeğinden ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte ettikleri fenolik madde optimizasyonu çalışmasında, artan etanol konsantrasyonu ile ekstrakte edilen fenolik madde miktarında yavaş bir artış olduğu rapor edilmiş, %60 etanol konsantrasyonunda gerçekleştirilen ekstraksiyonda, optimum değer olan 2.99 mg GAE/g değerine ulaşmış, artan etanol konsantrasyonu ile ekstrakte edilen miktar azalarak %95 etanol konsantrasyonunda en düşük seviye olan 1.48 mg GAE/g değerine düşmüştür.

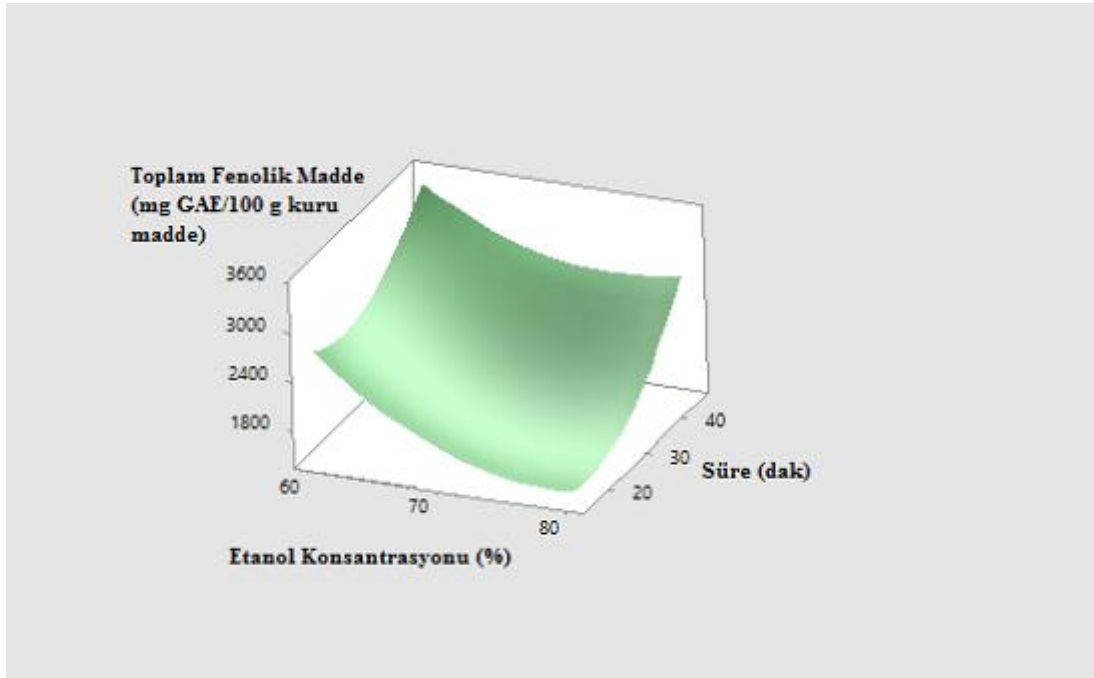


Şekil 4.14: Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (30 dakika), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.

Yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, süre arttıkça ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarında artış görülmektedir (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). Yaklaşık 30. dakikaya kadar toplam fenolik madde miktarında yavaş bir artış gerçekleşmiş, bu dakikadan sonra ekstrakte edilen miktar hızlı bir artış göstermiştir.



Şekil 4.15 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.16 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.

Sabit ekstraksiyon süresinde (30 dakika), toplam fenolik madde değerlerinin ekstraksiyon sıcaklığına ve ekstraksiyon süresine göre değişimini veren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.14' teki gibidir. Şekilden de görüldüğü gibi, ekstraksiyon süresi ve

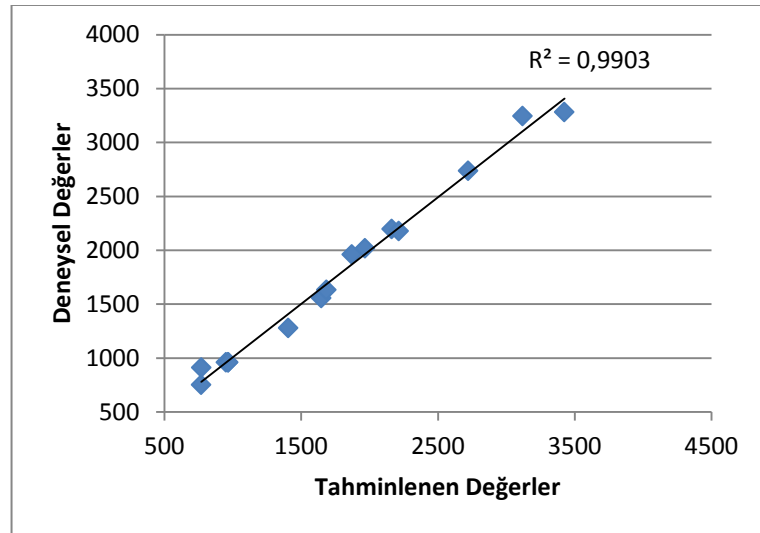
sıcaklık arttıkça toplam fenolik madde miktarı artmaktadır. Benzer sonuçlar önceki çalışmalarda da raporlanmıştır (Tao ve diğ., 2014; Wang ve diğ., 2013).

4.2.2 Toplam flavonoid miktarı sonuçları

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde toplam flavonoid miktarı ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan regresyon denklemi Eşitlik 4.5' te verilmiştir.

$$Y = 48371 - 1069X_1 - 415.4X_2 + 38.2X_3 + 7.369X_1*X_1 + 4.448X_2*X_2 + 1.539X_3*X_3 + 0.453X_1*X_2 - 1.455X_1*X_3 - 0.046X_2*X_3 \quad (4.5)$$

Regresyon analizi sonucunda, R^2 0.9903 olarak elde edilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.17' de gösterilmiştir.



Şekil 4.17 : Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Her bir bağımsız değişkenin toplam flavonoid madde üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Her bir katsayının önemini gösteren P değerleri Çizelge 4.11' de gösterilmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen toplam flavonoid madde miktarı üzerine, etanol konsantrasyonu en önemli değişken olarak belirlenmiştir ($P < 0.001$). Sıcaklık değişkeninin de toplam flavonoid madde ekstraksiyonunda önemli bir parametre olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Etanol konsantrasyonu kuadratik terimlerde de istatistiksel olarak en önemli faktör olarak bulunmuştur. Süre ve sıcaklık, lineer ve kuadratik terimlerde istatistiksel olarak

önemlidir. Etanol konsantrasyonu ile sürenin interaksiyon etkisi istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.05$).

Çizelge 4.11: Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	48371	4929	9.81	0.000
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	-1069	108	-9.87	0.000
Sıcaklık (X_2)	-415.4	88.6	-4.69	0.005
Süre (X_3)	38.2	44.5	0.86	0.430
$X_1 * X_1$	7.369	0.725	10.16	0.000
$X_2 * X_2$	4.448	0.725	6.13	0.002
$X_3 * X_3$	1.539	0.322	4.78	0.005
$X_1 * X_2$	0.453	0.697	0.65	0.544
$X_1 * X_3$	-1.455	0.464	-3.13	0.026
$X_2 * X_3$	-0.046	0.464	-0.10	0.924

Varyans analizi tablosu Çizelge 4.12' de gösterilmektedir. Toplam flavonoid madde için elde edilen model ($P<0.001$) ve model uygunsuzluğunun ($P<0.05$) istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. İstatistiksel analiz verileri lineer terimlerin önemli olduğunu göstermekle birlikte ($P<0.05$), kuadrarik terimlerin istatistiksel olarak en önemli faktör olduğu ($P<0.001$) ve interaksiyon teriminin ise önemsiz olduğu görülmüştür ($P>0.05$).

Çizelge 4.12: Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

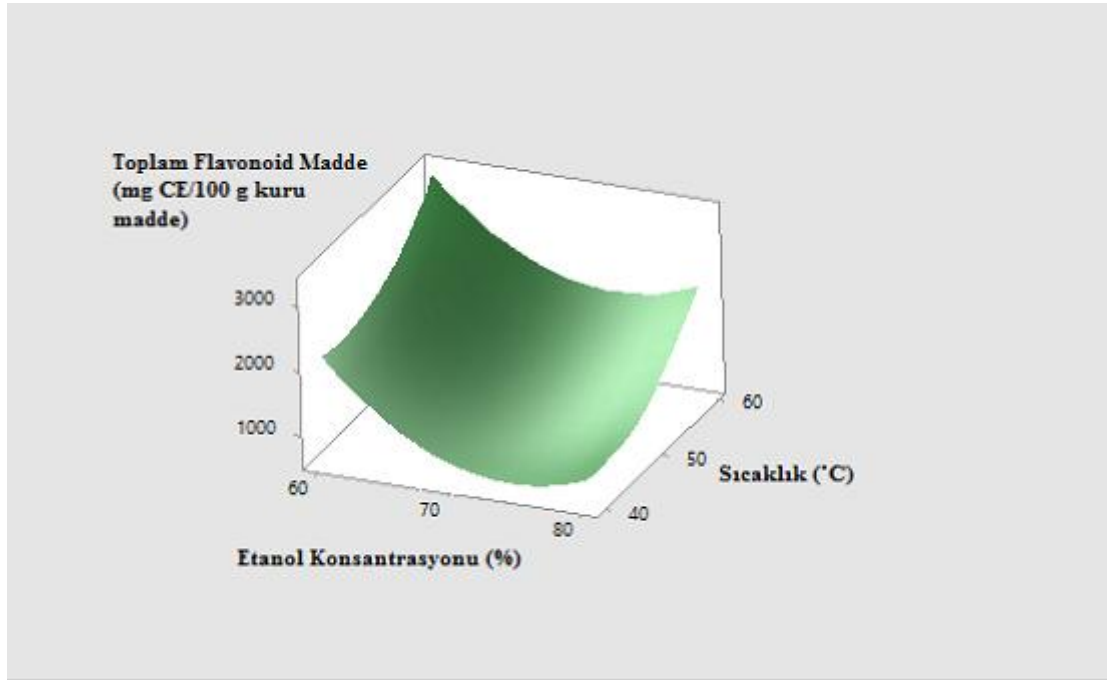
Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	56.58	0.000
Lineer	3	36.24	0.001
Kare	3	48.43	0.000
İnteraksiyon	3	3.41	0.110
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	367.32	0.003
Net Hata	2		
Toplam	14		

Sabit ekstraksiyon süresinde (30 dakika), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği incelendiğinde (Şekil 4.18), görülmektedir ki ekstrakste edilen flavonoid

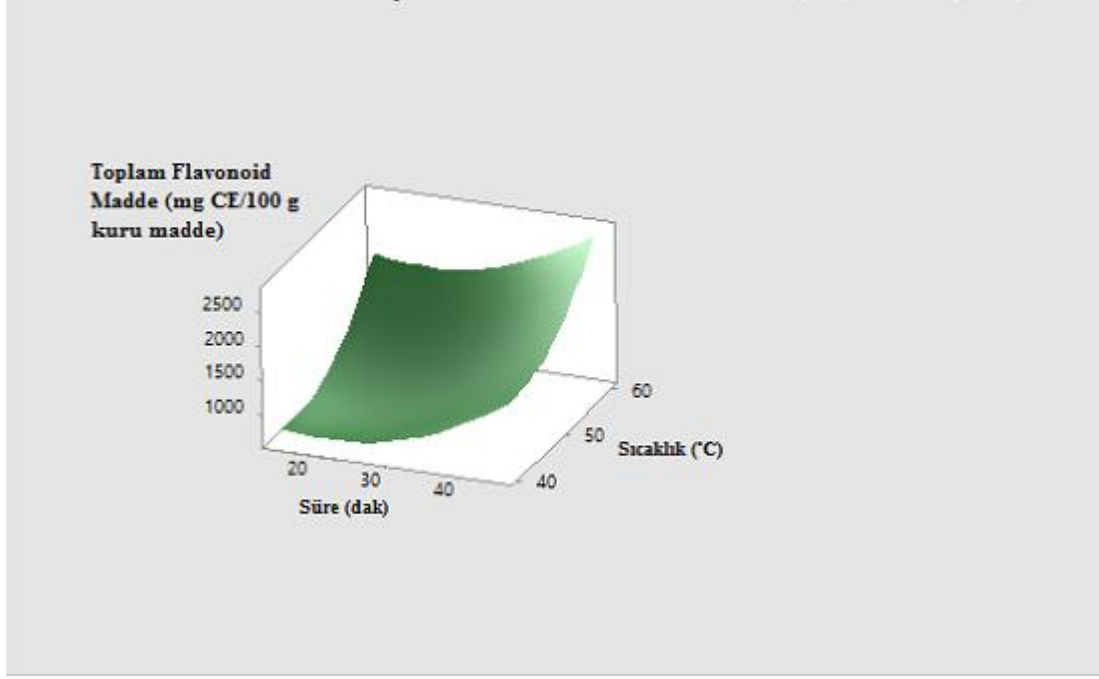
madde; yaklaşık %75 etanol konsantrasyonuna kadar düşüş göstermekte, daha sonra az miktarda artış göstermektedir. En yüksek flavonoid miktarı çalışılan en düşük değer olan %60 etanol konsantrasyonunda elde edilmiştir.

Şekil 4.19 ve Şekil 4.20 incelendiğinde ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde değişkenlerin toplam flavonoid ekstraksiyon sonuçları üzerine etkisinin, toplam fenolik madde ekstraksiyon sonucu üzeri etkisi ile benzer olduğu görülmektedir. Toplam flavonoid madde miktarı yaklaşık 30. dakikaya kadar yavaş bir biçimde artış göstermiş, bu dakikadan sonra artış hızlanmış ve 40. dakikada maksimum seviyeye ulaşmıştır.

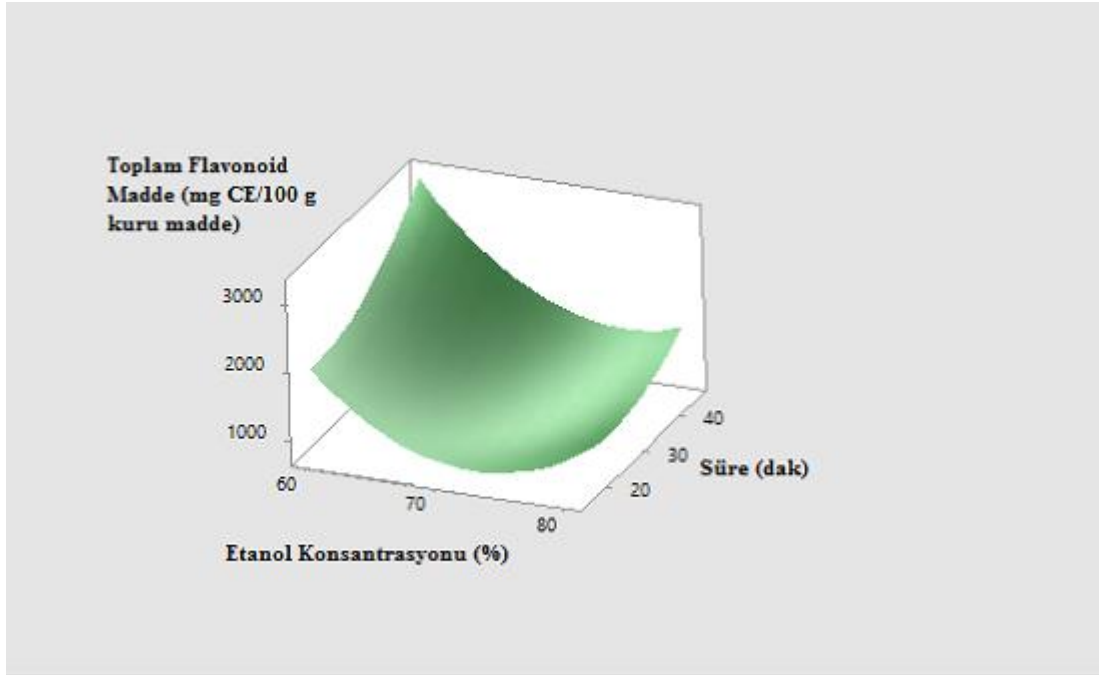
Ultrason destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde (Şekil 4.18 ve Şekil 4.19), sıcaklığın flavonoid madde ekstraksiyonu üzerinde etkisi olduğu görülmektedir. Ultrason banyosunun sıcaklığı arttırıldıkça, ekstrakte edilen toplam flavonoid madde miktarı artmıştır.



Şekil 4.18 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (30 dakika), toplam flavonoid miktarı için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.19 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam flavonoid miktarı için yanıt yüzey grafiği.



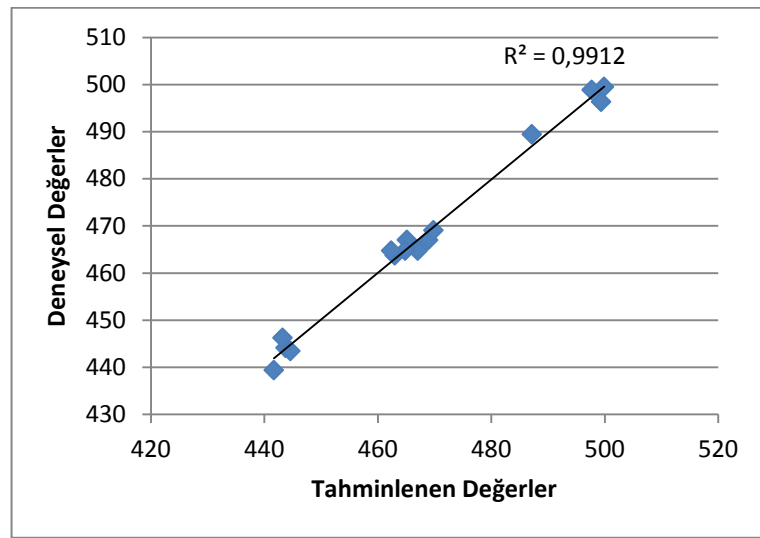
Şekil 4.20 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam flavonoid miktarı için yanıt yüzey grafiği.

4.2.3 Antioksidan kapasite sonuçları

Ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde antioksidan kapasite miktarı ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan regresyon denklemi Eşitlik 4.6' da verilmiştir.

$$Y = 947 - 8.70X_1 - 2.61X_2 - 1.52X_3 + 0.0394X_1*X_1 + 0.0287X_2*X_2 - 0.00402X_3*X_3 - 0.0026X_1*X_2 + 0.0224X_1*X_3 + 0.0020X_2*X_3 \quad (4.6)$$

Regresyon analizi sonucunda, R^2 , 0.9912 olarak elde edilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.21' de gösterilmiştir.



Şekil 4.21 : Ultrason destekli ekstraksiyonda DPPH için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Varyans analizi ile belirlenen antioksidan kapasite üzerine, bağımsız değişkenlerin etkisi Çizelge 4.13' te verilmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyon ile ekstrakte edilen antioksidan miktarı üzerine, etanol konsantrasyonunun etkisi lineer ve kuadratik terimlerde önemli bulunurken ($P < 0.05$), sıcaklık ve süre değişkenlerinin etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). İnteraksiyon etkileri incelendiğinde, etanol konsantrasyonu ile sürenin interaksiyon etkisi, en önemli interaksiyon terimi olarak görülmektedir.

Çizelge 4.13: Ultrason destekli ekstraksiyonda DPPH analiz sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	947	113	8.38	0.000
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	-8.70	2.48	-3.5	0.017
Sıcaklık (X_2)	-2.61	2.03	-1.29	0.255
Süre (X_3)	-1.52	1.02	-1.49	0.196
$X_1 * X_1$	0.0394	0.0166	2.37	0.064
$X_2 * X_2$	0.0287	0.0166	1.72	0.145
$X_3 * X_3$	-0.00402	0.00739	-0.54	0.610
$X_1 * X_2$	-0.0026	0.0160	-0.16	0.876
$X_1 * X_3$	0.0224	0.0106	2.11	0.089
$X_2 * X_3$	0.0020	0.0106	0.19	0.857

DPPH için varyans analiz tablosu Çizelge 4.14' te verilmiştir. Antioksidan kapasite için elde edilen model önemli bulunduğu görülmüştür ($P < 0.001$). Model uygunsuzluğunun önemsiz olduğu tespit edilmiştir ($P > 0.05$). İstatistiksel analiz verileri lineer terimlerin önemli olduğunu göstermekle birlikte, kuadrarik ve interaksiyon teriminin önemsiz olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.14: Ultrason destekli ekstraksiyonda DPPH için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

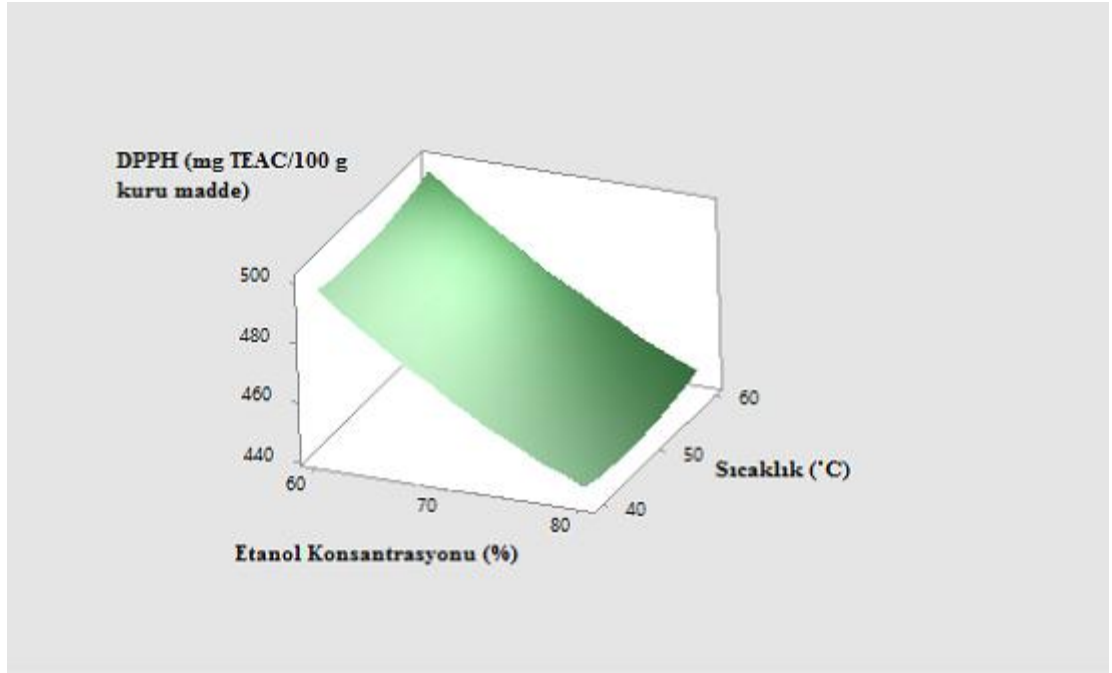
Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	62.32	0.000
Lineer	3	4.51	0.069
Kare	3	2.91	0.140
İnteraksiyon	3	1.5	0.322
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	2.44	0.304
Net Hata	2		
Toplam	14		

Yanıt yüzey yöntemi grafikleri incelendiğinde, toplam antioksidan kapasite üzerine etanol konsantrasyonunun önemli bir etkisi olduğu görülmekte ve artan etanol konsantrasyonunun ekstrakte edilen antioksidan miktarında azalmaya neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.22 ve Şekil 4.24). Hammi ve diğ.(2015) yapmış oldukları çalışmada *Zizyphus lotus* meyvesinden ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile antioksidan ekstraksiyonun gerçekleştirmişlerdir. %0-100 etanol konsantrasyonu

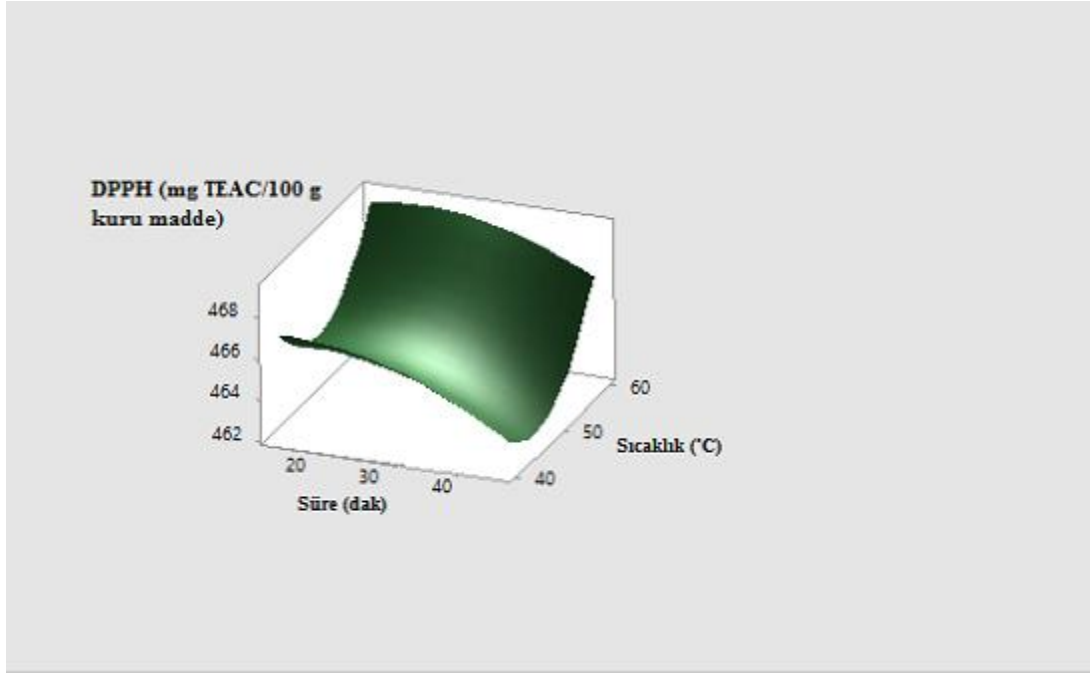
aralığında gerçekleştirilen çalışmada etanol konsantrasyonunun 100'den 50'ye giderken ekstrakte edilen antioksidan madde miktarının hızla arttığı, bu değerden sonra azalmaya geçtiği görülmektedir. %50 etanol konsantrasyonunda EC_{50} değeri 67 ml/g olarak rapor edilmiştir.

DPPH analiz sonuçları üzerine ekstraksiyon süresinin etkisi Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'te görülmektedir. Sıcaklık artışı antioksidan kapasite üzerine etkisinin önemsiz olduğu grafiklerden de görülmektedir. Ekstraksiyon süresi uzadıkça, antioksidan değerlerinde düşüş olduğu görülmüştür.

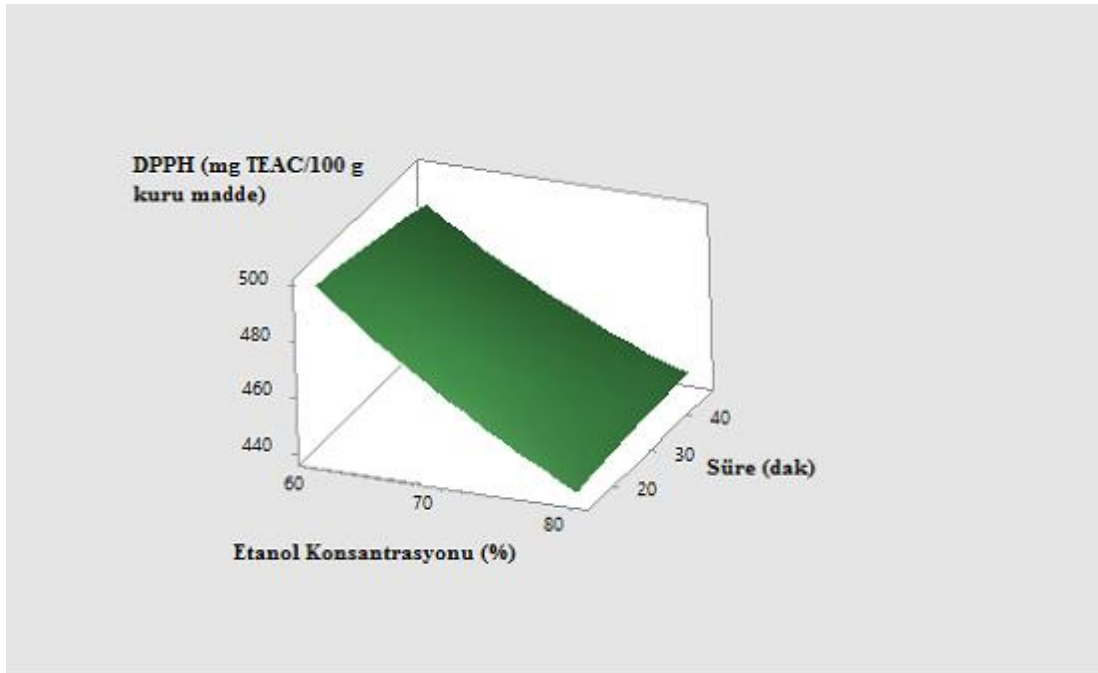
Sabit ekstraksiyon konsantrasyonunda (%70), antioksidan kapasite değerlerinin ekstraksiyon sıcaklığına ve ekstraksiyon süresine göre değişimini veren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.23'deki gibidir. İki faktör de istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur. Grafik incelendiğinde, sürenin uzaması ile antioksidan ekstraksiyonu arasında ters ilişki olduğu görülürken, artan sıcaklıkta antioksidan kapasite miktarında artış görülmüştür.



Şekil 4.22 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (30 dakika), DPPH için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.23 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), DPPH için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.24 : Ultrason destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50°C), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.

4.3 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonda Adaçayından Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonunun Yanıt Yüzey Yöntemi İle Optimizasyonu

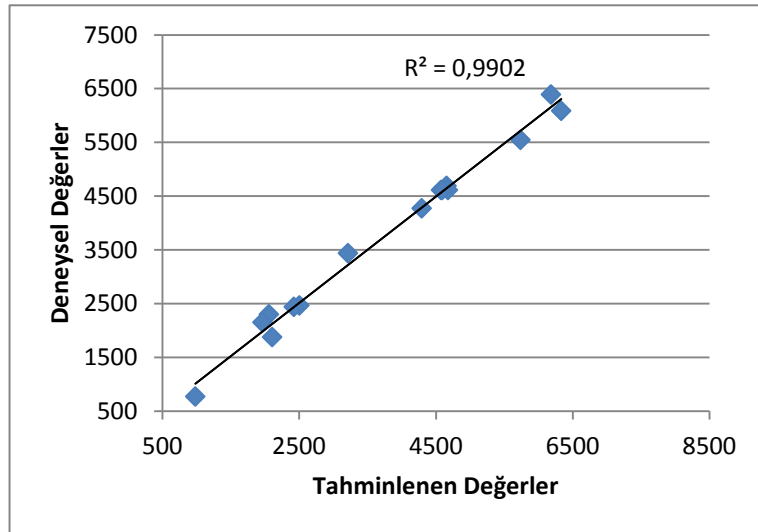
Mikrodalga destekli ekstraksiyonda gerçekleştirilecek olan optimizasyon çalışması için 3 farklı bağımsız değişken, literatür bilgileri doğrultusunda, etanol konsantrasyonu (X_1) (%60-80 etanol), mikrodalga gücü (X_2) (300-600 Watt) ve süre (X_3) (30-90 saniye) olarak belirlenmiştir. Optimizasyonda, bağımsız değişkenlerin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve DPPH metodu ile antioksidan kapasitesi miktarı üzerine etkileri incelenmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için Box Behnken deneme planı ile elde edilen deneysel değerler ve tahminlenen değerler Çizelge 4.15 'te verilmiştir.

4.3.1 Toplam fenolik madde sonuçları

Yanıt yüzey yöntemi uygulaması sonucunda, mikrodalga destekli ekstraksiyon için toplam fenolik madde ve test değişkenleri arasındaki empirik ilişkiyi ortaya koyan aşağıdaki regresyon denklemi elde edilmiştir (Eşitlik 4.7).

$$Y = -20372 + 229X_1 + 46.75X_2 + 116.5X_3 - 1.22X_1*X_1 - 0.04550X_2*X_2 - 0.522X_3*X_3 - 0.0740X_1*X_2 - 0.575X_1*X_3 + 0.1025X_2*X_3 \quad (4.7)$$

Regresyon analizi sonucunda, R^2 , 0,9902 olarak elde edilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.25' te gösterilmiştir.



Şekil 4.25 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Çizelge 4.15: Mikrodalga destekli ekstraksiyon için Box- Benhken deneme planı ile deneysel ve tahminlenen değerler.

Deney No	Etanol Konsantrasyonu (%)	Güç (Watt)	Süre (Dakika)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/100 g kuru madde)		Toplam Flavonoid Madde (mg CE/100 g kuru madde)		DPPH (mg TEAC/100 g kuru madde)	
				Deneysel	Tahminlenen	Deneysel	Tahminlenen	Deneysel	Tahminlenen
1	70	600	90	6184.00	6392.18	4334.12	4862.08	431.80	435.97
2	70	300	90	3214.66	3440.78	1775.20	1897.91	475.22	473.32
3	70	600	30	2106.03	1879.91	973.360	850.650	480.06	481.96
4	70	300	30	982.330	774.150	541.060	4229.00	474.90	470.73
5	80	450	90	5737.95	5548.07	4141.09	3899.36	444.83	441.87
6	60	450	90	6333.22	6088.82	5028.64	4619.71	493.88	494.58
7	80	450	30	2058.99	2303.41	910.630	1319.56	452.57	451.87
8	60	450	30	1964.69	2154.57	1061.53	1303.26	525.02	527.98
9	80	600	60	4293.00	4274.71	3599.77	3313.55	440.10	438.90
10	60	600	60	4656.53	4692.77	4292.11	4173.09	511.15	506.29
11	80	300	60	2504.48	2468.24	1801.19	1920.21	450.08	454.94
12	60	300	60	2423.79	2442.08	1478.50	1764.22	515.16	516.37
13	70	450	60	4575.40	4615.13	2667.68	2656.55	477.20	475.08
14	70	450	60	4677.40	4615.13	2651.51	2656.55	474.82	475.08
15	70	450	60	4592.60	4615.13	2650.45	2656.55	473.23	475.08

Her bir bağımsız değişkenin, lineer, kuadratik ve interaksiyon düzeyinde, toplam fenolik madde üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. Her bir katsayının önemini gösteren P değerleri Çizelge 4.16' da gösterilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktlardaki toplam fenolik madde üzerine mikrodalga gücü ve süre değişkenleri önemli bulunurken ($P<0.05$), etanol konsantrasyonu önemsiz bulunmuştur ($P>0.05$). En önemli bağımsız değişken ise mikrodalga gücüdür. Güç değişkeninin kuadratik düzeyde de önemli olduğu görülmekle birlikte, süre ile mikrodalga gücünün interaksiyonunun da önemli olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Sürenin de kuadratik terimlerde istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Güç süre interaksiyon teriminin, diğer interaksiyonlara göre en önemli terim olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.16: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde analiz sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	-20372	8189	-2.49	0.055
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	229	210	1.09	0.326
Güç (X_2)	46.75	8.95	5.22	0.003
Süre (X_3)	116.5	40.5	2.88	0.035
$X_1 * X_1$	-1.22	1.45	-0.84	0.440
$X_2 * X_2$	-0.0455	0.00646	-7.05	0.001
$X_3 * X_3$	-0.522	0.161	-3.23	0.023
$X_1 * X_2$	-0.074	0.093	-0.8	0.462
$X_1 * X_3$	-0.575	0.465	-1.23	0.272
$X_2 * X_3$	0.1025	0.0310	3.31	0.021

Varyans analizi (ANOVA) tablosu Çizelge 4.17' de gösterilmiştir. Toplam fenolik madde için uygulanan modelin istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.001$). Model uygunsuzluğunun da önemli olduğu görülmektedir ($P<0.05$). İstatistiksel analiz verileri lineer, kuadratik teriminin önemli olduğu ($P<0.05$), interaksiyonun ise önemsiz olduğunu göstermiştir ($P>0.05$).

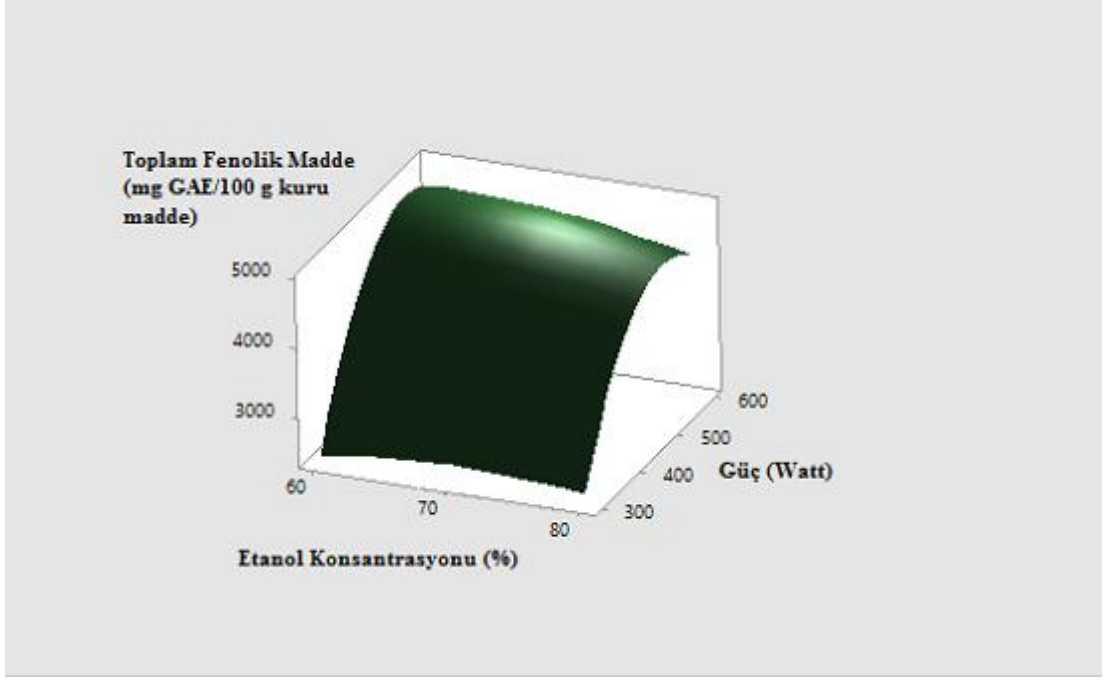
Çizelge 4.17: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	56.35	0.000
Lineer	3	11.01	0.012
Kare	3	18.98	0.004
İnteraksiyon	3	4.36	0.073
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	42.91	0.023
Net Hata	2		
Toplam	14		

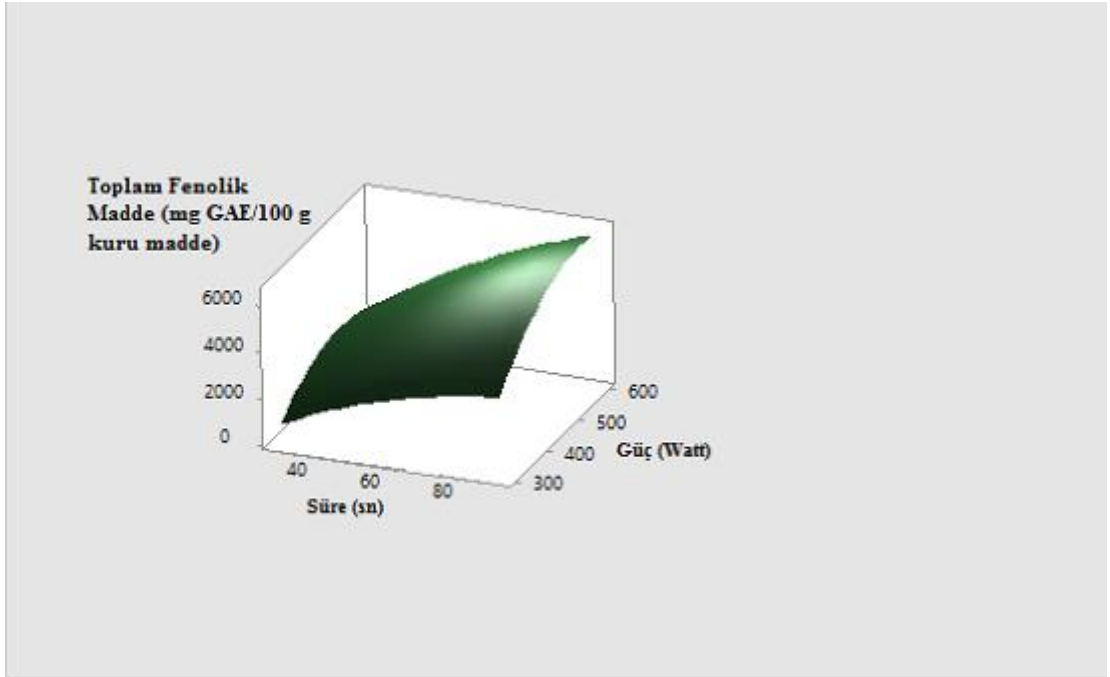
Toplam fenolik madde yanıtına karşılık çizilen yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28' de verilmiştir. Grafikler incelendiğinde etanol konsantrasyonunun %60' dan %80'e doğru arttıkça, ekstrakte edilen fenolik madde miktarında azalma olduğu görülmektedir. Benzer sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir (Xiao ve diğ., 2008; Wu ve diğ., 2012; Li ve diğ., 2012; Hayat ve diğ., 2009; Song ve diğ., 2011). Wu ve diğ. (2012), patates atıkları ile gerçekleştirdikleri çalışmada %60 etanol konsantrasyonu, 2 dakika ekstraksiyon süresi, 80 °C sıcaklık ve 1:40 katı: çözücü oranı ile optimum fenolik madde ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Bu noktada, patates atıklarının üst fazından elde ettikleri maksimum toplam fenolik madde miktarını 11 mg GAE/g kuru madde olarak rapor etmişlerdir.

Sabit etanol konsantrasyonunda (%70) süre-güç grafiği incelendiğinde (Şekil 4.27), güçteki artışın toplam fenolik madde miktarında artış sağladığı görülmektedir. Mikrodalga gücünün 300 Watt' tan 566 Watt' a çıkarılması, toplam fenolik madde miktarında artış sağlamış, bu değerden sonra ekstrakte edilen fenolik madde miktarında yavaş bir azalma görülmüştür. Bhuyan ve diğ.(2015) tarafından yapılan 480 W ile 720 W arasında gerçekleştirilen çalışmada ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının 600 W değerine kadar arttığı bu noktadan sonra düşüşe geçtiği görülmektedir. Hayat ve diğ. (2009), mikrodalga gücünün artması ile ani sıcaklık artışının ve buna bağlı olarak hücre içi basıncın artması dolayısıyla hücre yüzeyinin parçalanması ile çözücü ile hücre arasındaki komponent geçişlerinin hızlanması şeklinde açıklamıştır.

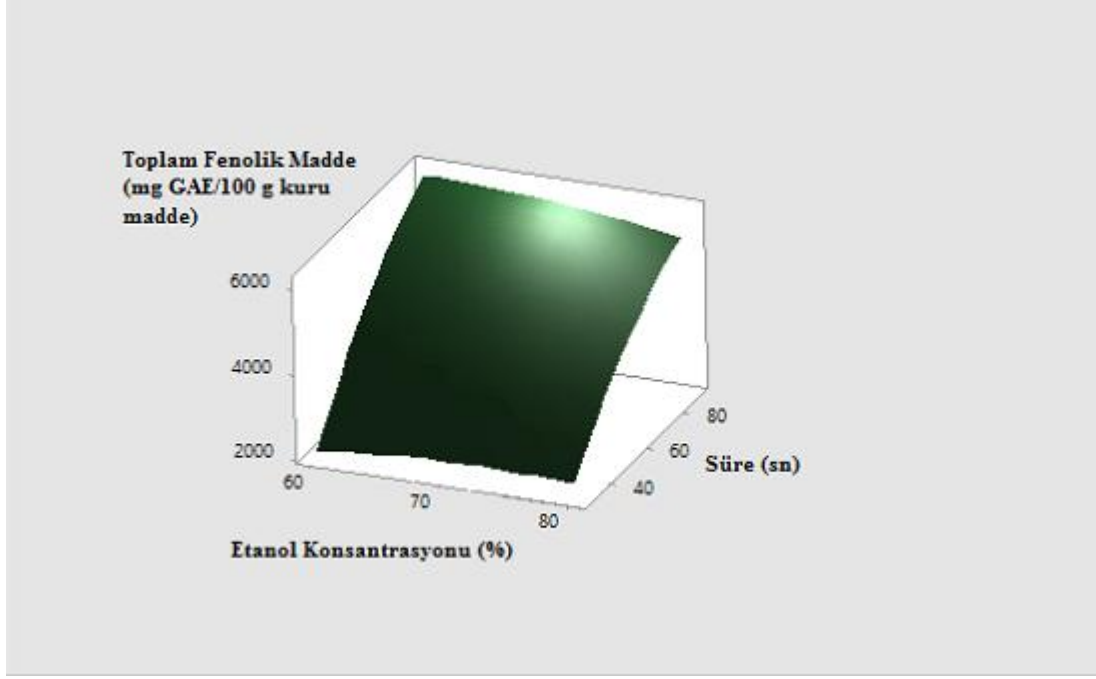
Sürenin, mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam fenolik madde üzerine etkisi incelendiğinde, grafiklerde de görüldüğü gibi (Şekil 4.27 ve Şekil 4.28), sürenin uzamasıyla ekstakte edilen fenolik madde miktarı artmıştır. Benzer sonuçlar, Hayat ve diğ. (2015), Dahmoune ve diğ. (2015), Dahmoune ve diğ. (2013), Bhuyan ve diğ. (2015) ve Setyaningsih ve diğ. (2015) tarafından da bildirilmiştir.



Şekil 4.26 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (60 saniye), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.27 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.28 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit güçte (450 Watt), toplam fenolik madde için yanıt yüzey grafiği.

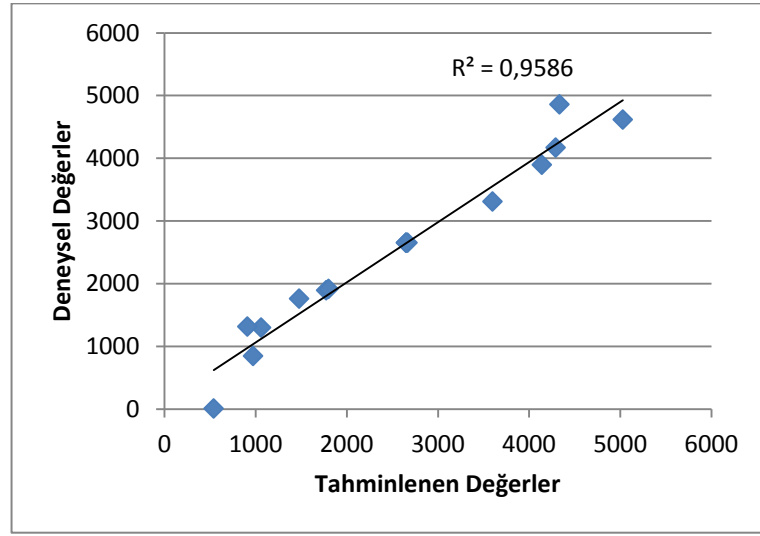
4.3.2. Toplam flavonoid madde sonuçları

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde toplam flavonoid madde miktarı ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan regresyon denklemi Eşitlik 4.8' de verilmiştir.

$$Y = 13401 - 616X_1 + 26.0X_2 + 89.5X_3 + 5.08X_1 \cdot X_1 - 0.0165X_2 \cdot X_2 - 0.421X_3 \cdot X_3 - 0.169X_1 \cdot X_2 - 0.614X_1 \cdot X_3 + 0.1181X_2 \cdot X_3 \quad (4.8)$$

Regresyon analizi sonucunda, R^2 , 0.9586 olarak elde edilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.29' da gösterilmiştir.

Her bir katsayının önemini gösteren P değerleri ile birlikte regresyon katsayıları, standart hata ve T değerleri Çizelge 4.18' de gösterilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktlardaki toplam flavonoid madde üzerine tüm değişkenler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$). En önemli terimler etanol konsantrasyonu ve güçtür. Güç ve sürenin interaksiyonunun, interaksiyon terimlerinin arasında en önemli parametre olduğu görülmektedir.



Şekil 4.29 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Varyans analizi (ANOVA) tablosu Çizelge 4.19' da gösterilmiştir. Toplam fenolik madde için uygulanan model ($P < 0.05$) ve model uygunsuzluğu ($P > 0.001$) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Lineer, kuadrarik ve interaksiyon terimleri istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$).

Çizelge 4.18: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde analiz sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

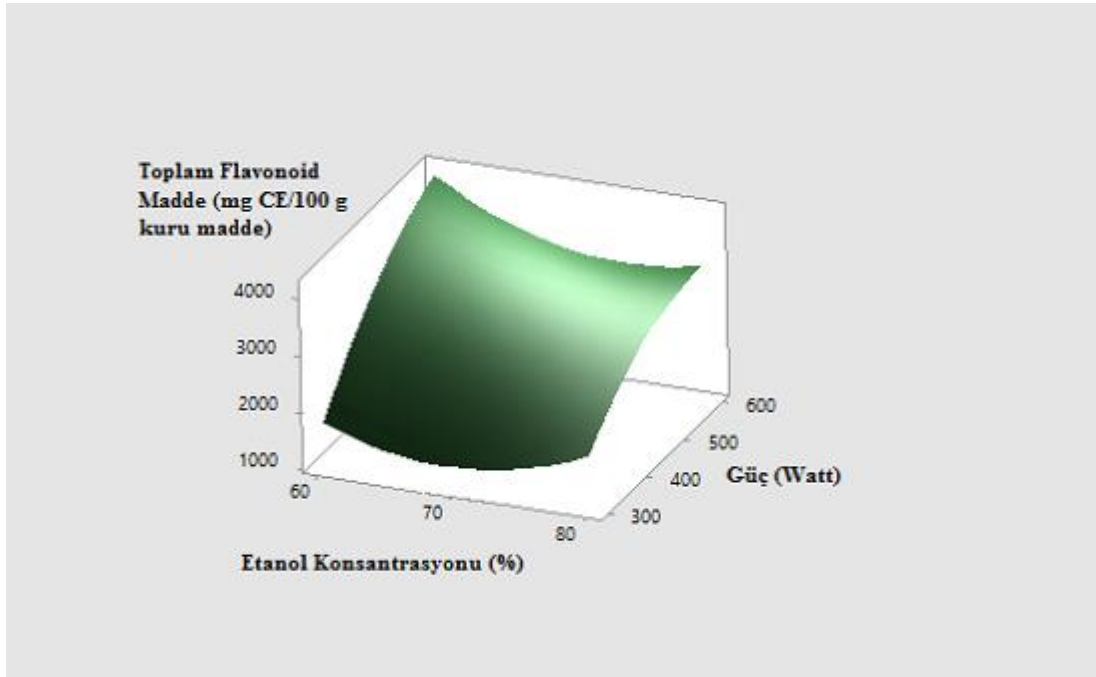
Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	13401	14555	0.92	0.399
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	-616	373	-1.65	0.160
Güç (X_2)	26	15.9	1.63	0.164
Süre (X_3)	89.5	72	1.24	0.269
$X_1 * X_1$	5.08	2.58	1.97	0.106
$X_2 * X_2$	-0.0165	0.0115	-1.44	0.210
$X_3 * X_3$	-0.421	0.287	-1.47	0.202
$X_1 * X_2$	-0.169	0.165	-1.02	0.353
$X_1 * X_3$	-0.614	0.827	-0.74	0.491
$X_2 * X_3$	0.1181	0.0551	2.14	0.085

Çizelge 4.19: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	12,87	0,006
Lineer	3	2,84	0,145
Kare	3	2,90	0,141
İnteraksiyon	3	2,06	0,224
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	4400,96	0,000
Net Hata	2		
Toplam	14		

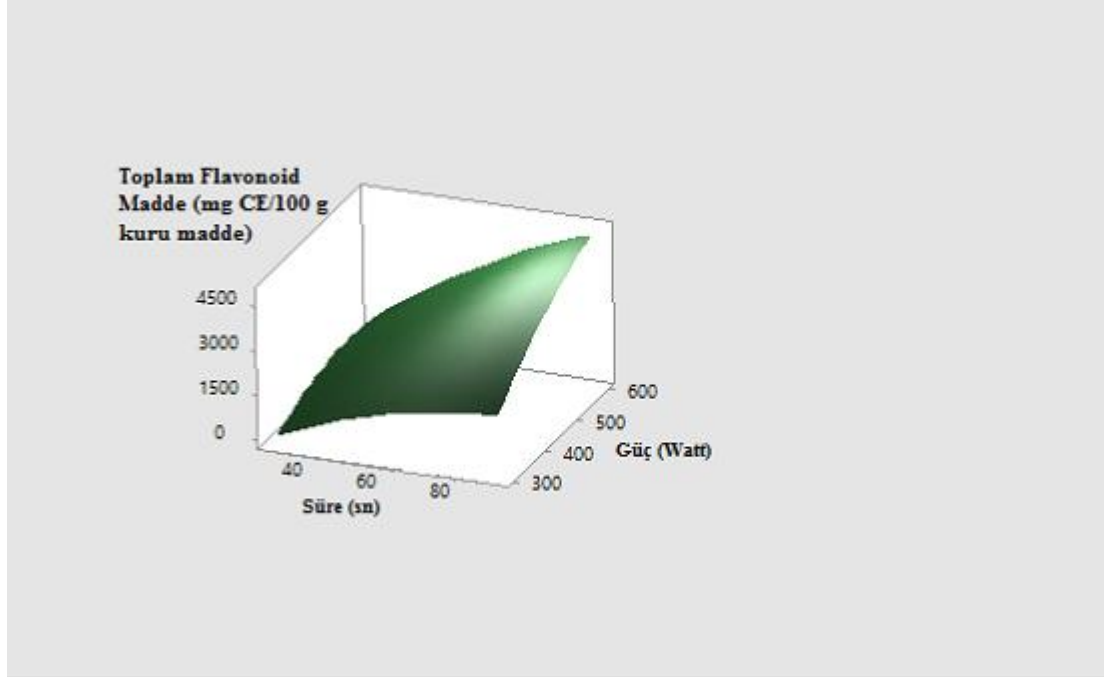
Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam flavonoid madde miktarı için yüzey yanıt grafikleri incelendiğinde etanol konsantrasyonundaki artışın, toplam flavonoid madde miktarında azalmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.30 ve Şekil 4.32). En yüksek değer %60 etanol konsantrasyonunda elde edilmiş, %60-70 etanol konsantrasyonunda azalmış ve bu değerden sonra tekrar artmaya başlamıştır.

Sabit etil alkol konsantrasyonunda (% 70), toplam flavonoid değerinin ekstraksiyon süresi ve güce göre değişimini veren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.31’ da verilmiştir. Görüldüğü gibi, ekstraksiyon süresi ve güç arttıkça toplam flavonoid miktarı artmaktadır.

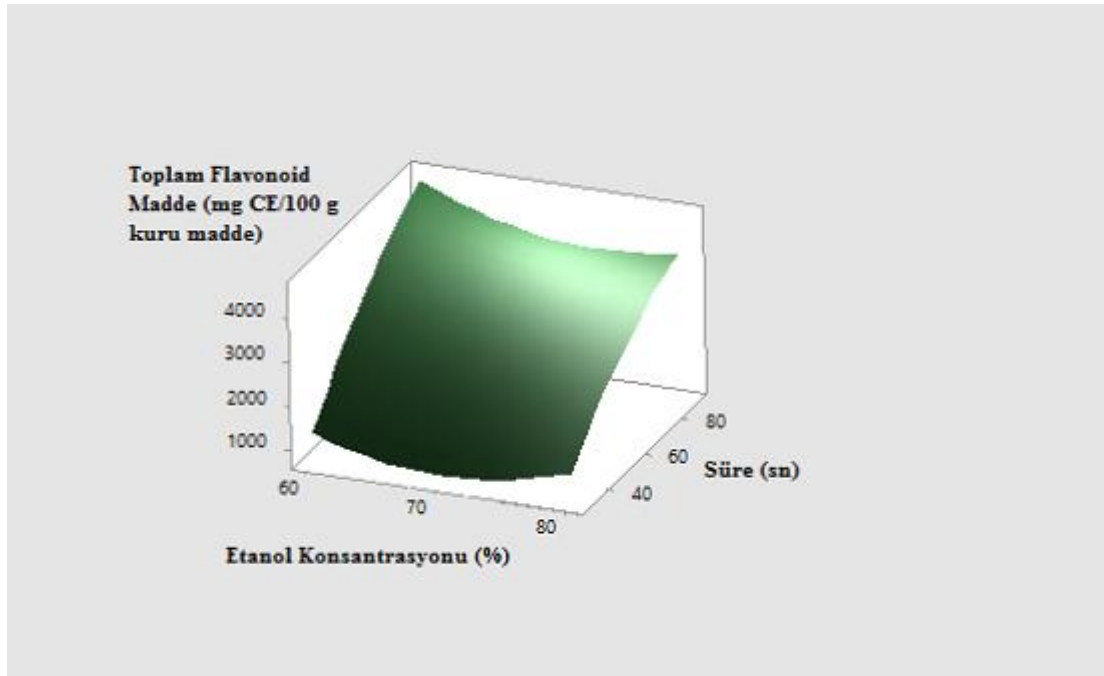


Şekil 4.30 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (60 saniye), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.

Sabit güçte (450 Watt), toplam flavonoid madde değerinin ekstraksiyon süresine ve etanol konsantrasyonuna göre değişimini veren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.32' de verilmiştir. Toplam flavonoid değeri ekstraksiyon süresi arttıkça yükselmiştir.



Şekil 4.31 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.



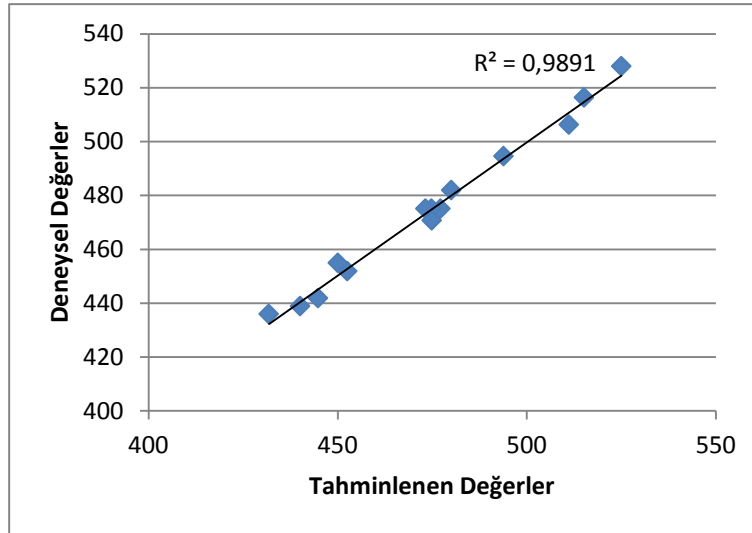
Şekil 4.32 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit güçte (450 Watt), toplam flavonoid madde için yanıt yüzey grafiği.

4.3.3 Antioksidan kapasite sonuçları

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde DPPH metodu ile elde edilen antioksidan kapasite miktarı ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan regresyon denklemi Eşitlik 4.9' da verilmiştir.

$$Y = 1089 - 16.28X_1 + 0.379X_2 + 0.130X_3 + 0.0881X_1*X_1 - 0.000212X_2*X_2 - 0.00535X_3*X_3 - 0.00100X_1*X_2 + 0.01950X_1*X_3 - 0.002699X_2*X_3 \quad (4.9)$$

Regresyon analizi sonucunda, R^2 , 0.9891 olarak elde edilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.33' de gösterilmiştir.



Şekil 4.33 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda DPPH için deneysel ve tahminlenen değerler grafiği.

Her bir katsayının önemini gösteren P değerleri ile birlikte regresyon katsayıları, standart hata ve T değerleri Çizelge 4.20' de gösterilmiştir. Etanol konsantrasyonu, istatistiksel olarak önemlidir ($P < 0.05$). Etanol konsantrasyonunun kuadratik terimlerde de önemli olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Varyans analizinde güç ve sürenin interaksiyon etkisi de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çizelge 4.20: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda DPPH analiz sonuçlarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

Değişkenler	Regresyon Katsayıları	Standart Hata	T Değeri	P Değeri
Sabit	1089	143	7.62	0.001
Etanol Konsantrasyonu (X_1)	-16.28	3.66	-4.45	0.007
Güç (X_2)	0.379	0.156	2.43	0.060
Süre (X_3)	0.130	0.707	0.18	0.861
$X_1 * X_1$	0.0881	0.0253	4.38	0.018
$X_2 * X_2$	-0.000212	0.000113	-1.88	0.119
$X_3 * X_3$	-0.00535	0.00282	-1.90	0.116
$X_1 * X_2$	-0.00100	0.00162	-0.61	0.567
$X_1 * X_3$	0.0195	0.00812	2.40	0.061
$X_2 * X_3$	-0.002699	0.000541	-4.99	0.004

DPPH için uygulanan modele ait varyans analizi (ANOVA) tablosu Çizelge 4.21' de gösterilmiştir. Toplam fenolik madde için uygulanan model ($P < 0.001$) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Model uygunsuzluğu ise önemsizdir ($P > 0.05$). Lineer, kuadratik ve interaksiyon terimleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

Çizelge 4.21: Mikrodalga destekli ekstraksiyonda DPPH için bağımsız değişkenlerin varyans analizi (ANOVA).

Kaynak	Serbestlik Derecesi	F Değeri	Olasılık
Model	9	50.63	0,000
Lineer	3	10.45	0.014
Kare	3	6.94	0.031
İnteraksiyon	3	10.34	0.014
Kalıntı Hatası	5		
Uyum Eksikliği	3	9.24	0.099
Net Hata	2		
Toplam	14		

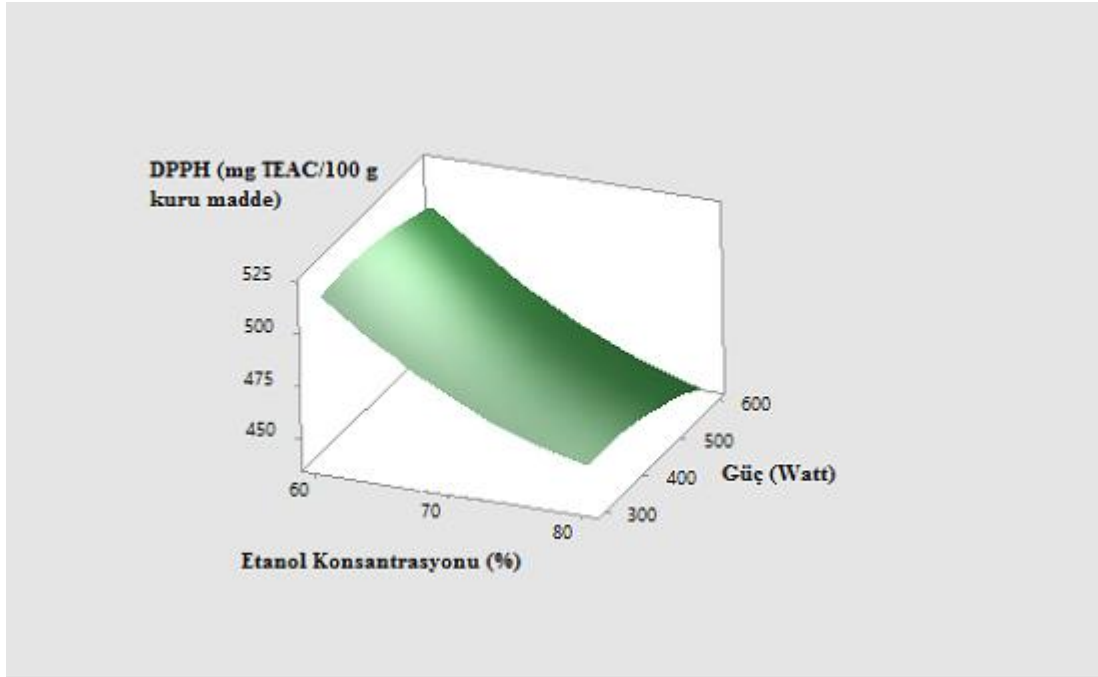
Yanıt yüzey yöntemi grafikleri incelendiğinde, artan etanol konsantrasyonunun ekstrakte edilen antioksidan miktarında azalmaya neden olduğu görülmektedir (Şekil 4.34 ve Şekil 4.36).

Antioksidan kapasite sonuçları üzerine gücün etkisi Şekil 4.35 ve Şekil 4.36' da görülmektedir. Mikrodalga gücünün yaklaşık 560 Watt' a kadar artması, antioksidan

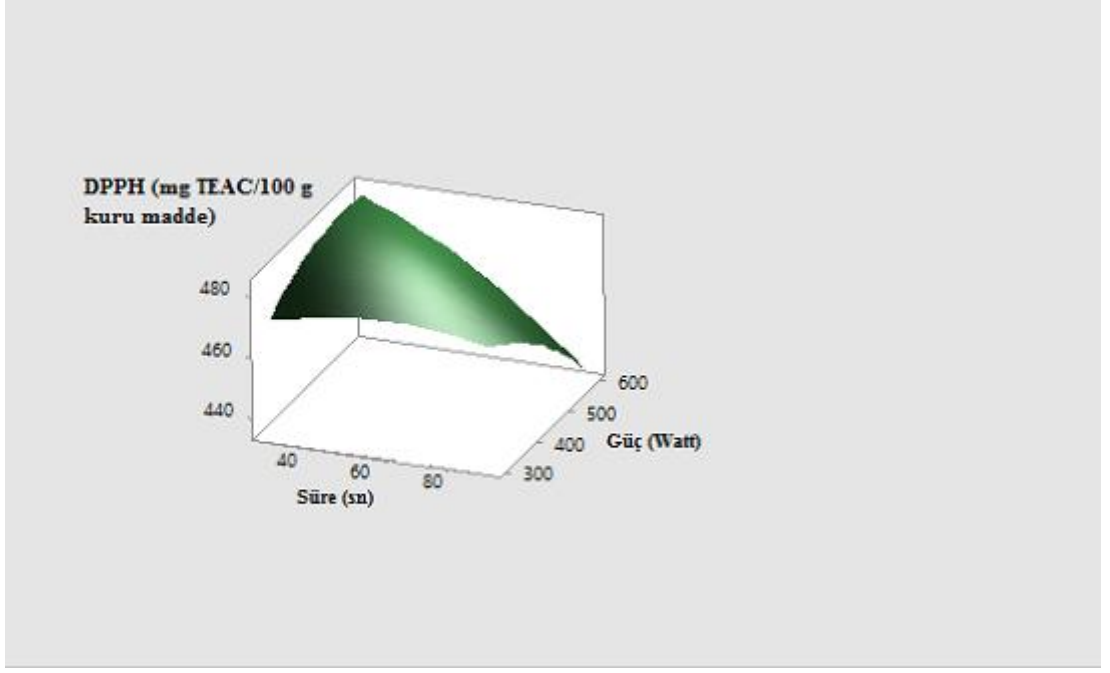
miktarında artış sağlamış, ancak bu değerden sonra 600 Watt' a kadar tekrar düşüş görülmüştür.

Sabit etanol konsantrasyonunda (%70), antioksidan değerlerinin güce ve ekstraksiyon süresine göre değişimini veren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.35' te verilmiştir. Grafik incelendiğinde, sürenin uzaması ile antioksidan ekstraksiyonu arasında ters ilişki olduğu görülmektedir.

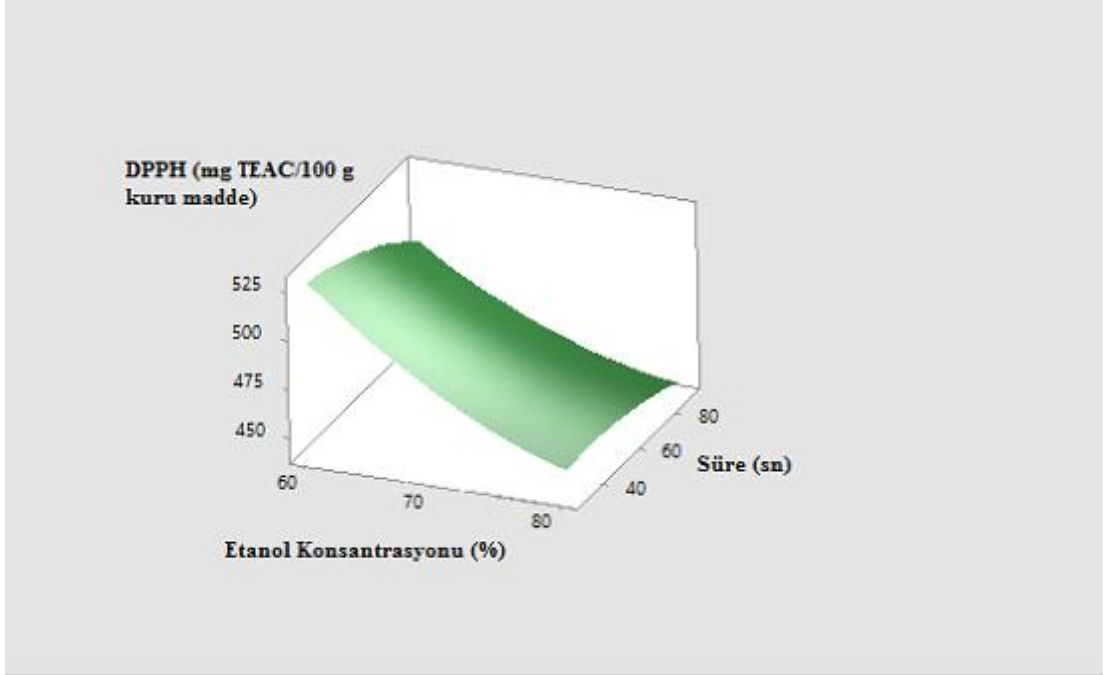
Toplam fenolik madde, toplam flavonoid miktarı ve DPPH miktarları değerlendirildiğinde, fenolik ve flavonoid madde miktarının süre arttıkça arttığı gözlenirken, DPPH miktarında düşüş olduğu görülmektedir. Benzer sonuçlar Majd ve diğ. (2014), Xu ve diğ. (2015), Gong ve diğ. (2012) yapmış olduğu çalışmalarda da elde edilmiştir. Bunun nedeni, Gong ve diğ. (2012) ve Büyüktuncel (2013) 'in açıkladığı gibi, DPPH' in karalı organik asit radikali olması nedeniyle peroksil radikalleriyle hızlı reaksiyon veren çoğu antioksidanın DPPH ile yavaş reaksiyona girmesi veya sterik engel nedeniyle DPPH'a karşı inert olabilmesi ve DPPH' in sulu ortamlarda çözünememesinden kaynaklı koagüle olması nedeniyle hidrofilik antioksidanların yeterli ekstrakte edilememesi şeklinde açıklanabilir.



Şekil 4.34 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit ekstraksiyon süresinde (60 saniye), DPPH için yanıt yüzey grafiği.



Şekil 4.35 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit etanol konsantrasyonunda (%70), DPPH için yanıt yüzey grafiği.



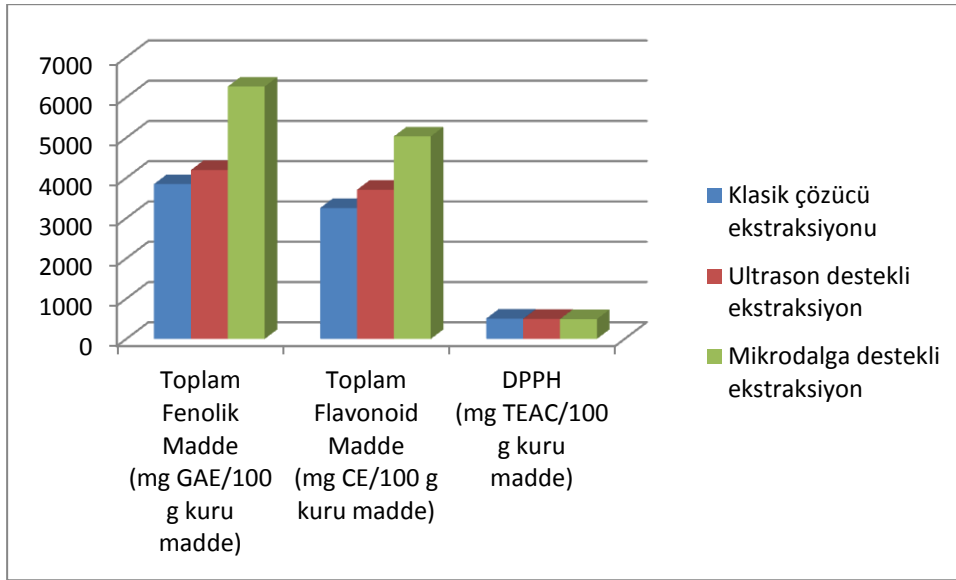
Şekil 4.36 : Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, sabit güçte (450 Watt), DPPH için yanıt yüzey grafiği.

4.4 Ekstraksiyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Yöntemler karşılaştırılırken, klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda tespit edilen optimum noktalarda ulaşılan değerler ele alınmıştır (Çizelge 4.22).

Çizelge 4.22: Yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen optimum noktalardaki toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve DPPH miktarları.

Ekstraksiyon Yöntemi	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/100 g kuru madde)	Toplam Flavonoid Madde (mg CE/100 g kuru madde)	DPPH (mg TEAC/100 g kuru madde)
Klasik çözücü ekstraksiyonu	3847.10	3250.90	506.28
Ultrason destekli ekstraksiyon	4196.00	3706.00	496.88
Mikrodalga destekli ekstraksiyon	6271.00	5033.00	493.22



Şekil 4.37 : Yanıt yüzey yöntemi ile elde edilen optimum noktalardaki toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve DPPH miktarları.

Toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde miktarı sonuçları; mikrodalga destekli ekstraksiyon> ultrason destekli ekstraksiyon>klasik çözücü ekstraksiyonu şeklinde elde edilmiştir (Şekil 4.37). Optimum noktalarda analizlenen toplam fenolik

madde miktarı 3847.10-6271.00 mg GAE/100 g kuru madde; toplam flavonoid miktarı 3250.90-5033.00 mg CE/100 g kuru madde şeklindedir. Antioksidan kapasite miktarında ise en yüksek değer klasik çözücü ekstraksiyonda elde edilirken, en düşük değer ise mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiştir. Bulunan sonuçlar 493.22-506.28 mg TEAC/100 g kuru madde aralığındadır. Elde edilen sonuçlar literatür bilgileri ile uyumludur (Roby ve diğ., 2013; Arıduru ve Arabacı, 2013; Durling ve diğ., 2007) . Roby ve diğ., (2013) kekik, adaçayı ve mercanköşk bitkileri ile gerçekleştirmiş oldukları çalışmada farklı çözücülerin ekstraksiyon etkisini incelemişler ve 72 saat oda sıcaklığında; adaçayı için etanol ile gerçekleştirmiş oldukları denemede 5.95 mg GAE/g kuru madde sonucunu elde etmişlerdir. Bu sonuç etanol ile yapılan ekstraksiyonda 5.80 mg GAE/g kuru madde olarak farklılık göstermiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada, klasik çözücü ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri ile adaçayıdan antioksidan madde ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve antioksidan kapasite sonuçları yanıt yüzey yönteminde yanıt olarak seçilmiş ve optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

Klasik çözücü ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen toplam fenolik madde miktarları; 2104.10-3846.14 mg GAE/100 g kuru madde, toplam flavonoid miktarı 1343.48-3060.02 mg CE/100 g kuru madde, antioksidan kapasite 439.77-509.84 mg TEAC/100 g kuru madde aralığında bulunmuştur. Varyans analizi ile toplam fenolik madde miktarı üzerine sıcaklık ve etanol konsantrasyonun önemli parametreler olduğu tespit edilmiştir. Toplam flavonoid madde miktarı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi incelendiğinde, sıcaklık ve sürenin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. DPPH methodu ile gerçekleştirilen toplam antioksidan kapasite üzerine etanol konsantrasyonu en önemli parametre olarak tespit edilmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyon yönteminde optimum ekstraksiyon koşulları; %60 etanol konsantrasyonu, 53.93 °C sıcaklık, 84.84 dakika ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir.

Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen toplam fenolik madde miktarı 1506.74-4199.12 mg GAE/100 g kuru madde, toplam flavonoid miktarı 768.83-3424.39 mg CE/100 g kuru madde, DPPH miktarı 441.68-499.89 mg TEAC/100 g kuru madde aralığında bulunmuştur. Varyans analizi ile toplam fenolik madde miktarı üzerine sıcaklık ve etanol konsantrasyonun, klasik ekstraksiyon methodunda olduğu gibi önemli parametreler olduğu tespit edilmiştir. Toplam flavonoid madde miktarı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi incelendiğinde, etanol konsantrasyonu ve ekstraksiyon sıcaklığının istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. DPPH methodu ile gerçekleştirilen toplam antioksidan kapasite üzerine etanol konsantrasyonu en önemli parametre olarak tespit edilmiştir. Ultrason destekli

ektstaksiyon yönteminde optimum ekstraksiyon koşulları; %60 etanol konsantrasyonu, 60 °C sıcaklık, 38.03 dakika ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen toplam fenolik madde miktarı 982.33-6333.22 mg GAE/100 g kuru madde, toplam flavonoid miktarı 541.06-5028.64 mg CE/100 g kuru madde, DPPH miktarı 431.8-525.02 mg TEAC/100 g kuru madde aralığında bulunmuştur. Varyans analizi ile toplam fenolik madde miktarı üzerine güç ve ekstraksiyon süresinin önemli parametreler olduğu tespit edilmiştir. Toplam flavonoid madde miktarı üzerine bağımsız değişkenlerin etkisi incelendiğinde, etanol konsantrasyonu ve gücün en önemli parametreler olduğu görülmektedir. DPPH methodu ile gerçekleştirilen toplam antioksidan kapasite üzerine etanol konsantrasyonu en önemli parametre olarak tespit edilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde optimum ekstraksiyon koşulları; %60 etanol konsantrasyonu, 518.18 W mikrodalga gücü, 82.72 saniye ekstraksiyon süresi olarak tespit edilmiştir.

Optimum yanıtların alındığı noktalarda, etanol konsantrasyonunun tüm ekstraksiyon yöntemlerinde birbirine yakın olduğu görülmüştür. Klasik ekstraksiyon yönteminde ultrason destekli ekstraksiyona göre kısmen daha düşük sıcaklıklarda optimum fenolik madde elde edilmiş, ancak bu değer, ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen fenolik madde miktarının altında kalmıştır.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi incelendiğinde, güçteki artışın fenolik madde miktarını olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Diğer yöntemler ile kıyaslandığında çok daha kısa sürede, daha yüksek miktarda fenolik madde ve flavonoid madde elde edildiğinden, ekonomik ve verim açısından değerlendirildiğinde, adaçayından antioksidan madde ekstraksiyonunda en etkili yöntemin mikrodalga destekli ekstraksiyon olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aguleira, J. M.** (2003). Solid–Liquid Extraction. In: Extraction optimization in food engineering. CRC Press, pp: 35-55.
- Alberti, A., Zielinski, A. A. F., Zardo, D. M., Demiate, I. V., Nogueira, A. ve Mafra, L. I.** (2014). Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. *Food Chemistry*, 149: 151- 158.
- Amyrgialaki, E., Makris, D.P., Mauromoustakos, A., Keafalas, P.** (2014). Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 59: 216-222.
- Ariduru, R., ve Arabacı, G.** (2013). Ciğercizade otu (*salvia officinalis*) bitkisinin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. *SAÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 17(2): 241-246.
- Bachir, M., Meziant, L., Benchikh, Y. Ve Louaileche, H.** (2014). Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. *Azenjar*) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 162: 277-282.
- Baiano, A., Bevilacqua, L., Terracone, C., Conto, F. Ve Nobile, M. A.** (2014). Single and interactive effects of process variables on microwave-assisted and conventional extractions of antioxidants from vegetable solid wastes. *Journal of Food Engineering*, 120: 135-145.
- Bampouli, A., Kyriakopoulou K., Papaefstathiou, G., Louli V., Krokida, M. Ve Magoulas, K.** (2014). Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* ,1 (3): 81-91.
- Bernardo-Gil, G., Casquilho, M., Esquivel, M. M. Ve Ribeiro M. A.** (2009). Supercritical fluid extraction of fig leaf gourd seeds oil: Fatty acids composition and extraction kinetics. *Journal of Supercritical Fluids The Impact Factor & Information*.
- Bhuyan, D. J., Vounq, Q. V., Chalmers, A. C., Altena, I. A., Bowyer, M. C., Scarlett, C. J.** (2015). Microwave-assisted extraction of *Eucalyptus robusta* leaf for the optimal yield of total phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 69: 290-299.
- Biesaga, M.** (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1218(18): 2505-2512.

- Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E.** (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L.) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:7879–7885.
- Büyükkaya, F.** (2002). *Sideritis trojana* (tüylü çay, sarıkız çayı, adaçayı, dağ çayı) bitkisinin kimyasal analizi ve bileşenlerinin yapılarının aydınlatılması. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi, Çanakkale.
- Büyüktuncel, E.** (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 209-242.
- Büyüktuncel, E.** (2013). Toplam fenolik içeriği ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17: 93-103.
- Cacace, J. E., Mazza, G.** (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4): 379-389.
- Cem Baş.** (2010). *Cevap Yüzeyi Tasarımları ve Sinir Ağları Yaklaşımı*. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Chalchat, J. C., Michet, A., Pasquier, B.** (1998). Study of clones of *Salvia officinalis* L. yields and chemical composition of essential oil. *Flavor and Fragrance Journal*, 13 (1), 68-70.
- Chemat, F., Tomao, V. Ve Viro, M.** (2008). Ultrasound assisted extraction in food analyses. In: *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press, pp:85-99.
- Cindric, I. J., Zeiner, M., Glamuzina, E. Ve Stingeder, G.** (2013). Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. *Microchemical Journal*, 107:185-189.
- Cocero M.J., Gonzalez S., Perez S. and Alonso E.** (2000). Supercritical extraction of unsaturated products: Degradation of β - carotene in supercritical extraction processes. *Journal of Supercritical Fluids*, 19:39-44.
- Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguieres, A., Renouard, S., Blondeau, J. P., Ferroud, C., Doussot, J., Laine, E. Ve Hano, C.** (2015). Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonic Sonochemistry*, 26: 176-185.
- D'Alessandro, L. G. Ve Dimitrov, K.** (2014). Kinetics of ultrasound assisted extraction of anthocyanins from *Aronia melanocarpa* (black chokeberry) wastes. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(10):1818-1826.
- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., Madani, K.** (2013). Valorization of *Citrus limon* residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50: 77-87.

- 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.
- Deans, G. S. ve Simpson, E. J.** (2000). Antioxidant from *Salvia officinalis*. In: Sage. CRC Press. pp: 185-192.
- Decker, E. A.** (2002). Antioxidant Mechanism. In: Food Lipids. CRC Press.
- Devres, Y. O. ve Pala, M.** (1993). Gıda Sanaiinde Matematiksel Modellemenin Önemi ve Uygulama Alanları. *Gıda*, 18,3: 173-181.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., Liu, R. H.** (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3010–3014.
- Doane-Weidemanand, T., ve Liescheskii, P. B.** (2004). Analytical supercritical fluid extraction for food applications. In: Oil Extraction and Analysis. CRC Press.
- Dobbs, J. M., Wong, J. M., Lahiere, R. J., Johnston, K. P.** (1987). Modification of supercritical fluid phase behavior using polar cosolvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 26, 56-65.
- Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y., Perry, N. B.** (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry*, 101(4): 1417-1424.
- Eidi, A. Ve Eidi, M.** (2009). Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes&Metabolic Syndromes:Clinical Research&Reviews*, 3(1):40-44.
- Ekren, S.** (2007). Farklı Biçim Yüksekliklerinin Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) Genotiplerinde Agronomik ve Teknolojik Özelliklere Etkisinin Belirlenmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 44(1):55-70.
- Eskin, N. A. M. Ve Przybylski, R.** (2000). Antioxidants and Shelf Life of Foods. In: Food Shelf Life Stability. CRC Press.
- Fang, X., Wang, J., Wang, Y., Li, X., Zhou, H., Zhu, L.** (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of wedelolactone and antioxidant polyphenols from *Eclipta prostrate* L using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 138: 55-64.
- Farhat, M. B., Chaouch-Hamada, R., Sotomayor, J. A., Landoulsi, A. Ve Jordon M. J.** (2014). Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. *Industrial Crops and Products*, 54: 78-85.
- Farzaneh, V. Ve Carvalho I.** (2015). A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. *Industrial Crops and Products*, 65: 247-258.
- Feng, S., Luo, Z., Tao, B., Chen, C.** (2015). Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum*

officinarum L.) rinds. LWT-Food Science and Technology, 60(2): 970-976.

- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., dos Santos, W. N. L.,** (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica Chimica Acta*, 597, 179-186.
- Fito, P., Chiralt, A. Ve Martin, M. E.** (2004). Current state of microwave applications to food processing. In: *Novel food processing technologies*. CRC Press, pp:525-537.
- Gafoor, K., Park, J. Ve Choi Y.** (2010). Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3): 485-490.
- Galvan d'Alessandrro, L., Kriaa, K., Nikov, I., Dimitrov, K.** (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Seperation and Purification Technology*, 93(1): 42-47.
- Generalic, I., Skroza, D., Ljubenkov, I., Katalinic, A., Burcul, F., Katalinic, V.** (2011). Influence of the phenophase on the phenolic profile and antioxidant proterties of Dalmatian sage. *Food Chemistry*, 127, 427-433.
- Ghitescu, R. E., Volf, I., Carausu, C., Bühlmann, A., Gilca, I. A. Ve Popa, V.** (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 535-541.
- Gliszczynska-Swigło, A. Ve Oszmianski, J.** (2015). Antioxidant and Prooxidant Activity of Food Components. In: *Food Oxidants and Antioxidants*. CRC Press, pp: 375:432.
- Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X., Liu, G.** (2012). Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Food and Bioproducts Prosessing*, 90(1): 9-16.
- Gonzalez, R., Serra, F. C., Femenia, A., Rossello, C. Ve Simal, S.** (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compunds and antioxidant activity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506-514.
- Grafoluc, I. E., Uzelac V. D., Jambrak, A. R. Ve Jukic, M.** (2013). The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca). *Journal of Food Engineering*, 117(4): 437-442.
- Hammi, K. M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H. Ve Ksouri, R.** (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food Chemistry*, 184: 80-89.

- Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., Xia, W.** (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acid from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Separation and Purification Technology*, 70(1): 63-70.
- Hossain, M., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana A.B. Ve Barry-Ryan C.** (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana L.*) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(3):582-590.
- Hossain, M. B., Ryan C. B., Diana, A. B. Ve Brunton N. P.** (2011) Optimisation of Accelerated Solvent Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*), Marjoram (*Origanum majorana L.*) and Oregano (*Origanum vulgare L.*) Using Response Surface Methodology. *Food Chemistry*, 126(1): 339-346.
- İhsulu, K.,** (1992). İlaç ve Baharat Bitkileri .Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları Ders Kitabı, S. 16-23, Ankara.
- İnce, A. E., Şahin, S. Ve Şümnü, S. G.** (2012). Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 6-75.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F. and Siebenhandl, S.** (2006). The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 121-133.
- Kamatou, G. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. Ve Viljoen, A. M.** (2008). South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *Journal Of Ethnopharmacology*, 119(3):664-72.
- Karabegovic, I. T., Stojicevic, S. S., Velickovic, D. T., Nikolic, N. C. Ve Lazic, M. L.** (2013). Optimization of microwave-assisted extraction and characterization of phenolic compounds in cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaves. *Separation and Purification Technology*, 120: 429-436.
- Kemal Cellat.** (2011). Bazı endemik bitkisel uçucu yağ bileşenlerinin ekstrakte edilmesi ve içeriklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Khiari, Z., Makris, P. D., Kefalas, P.** (2009). An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems. *Food and Bioprocess Technology*, 2(4): 337-343.
- Khaled-Khodja, N., Makloul, L. Ve Madani, K.** (2014). Phytochemical screening of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae. *Industrial Crops and Products*, 61:41-48.

- Kivilompolo, M. Ve Hyötylainen T.** (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145(1):155-164.
- Koç, B. ve Ertekin, F.** (2008). Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. *Gıda*, 35, 63-70.
- Konak, Ü. İ.** (2009). Gıda sanayisinde mikrodalga uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 20-31.
- Kontogianni, V. S., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Gerothanassis, I. P. ve Tzakos, A. G.** (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136 (1), 120-129.
- Lakhal, H.** (2013). Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Salvia officinalis* from Batna (Algeria). *Der Pharmacia Lettre*, 5(3):310-314.
- Lang, Q. ve Wai, C. M.** (2001). Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies -a practical review. *Talanta*, 53(4):771-782.
- Lee, H.S.** (2004). Phenolic Compounds in Foods. In: Nollet, L.M.L. (eds.) "Handbook of Food Analysis". Marcel Dekker Inc., pp: 657-715.
- Li, B., Zhang, C., Peng, L., Liang, Z., Yan, X., Zhu, Y. Ve Liu, Y.** (2015). Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC-MS and HPLC methods, *Industrial Crops and Products*, 69:329-334.
- Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S. Ve Tsao, S.** (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chemistry*, 130(4): 928-936.
- Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G.M. Ve Taylor, D. K.** (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129(2): 570-576.
- Liu, Y., Gong, G., Zhang, J., Jia, S., Li, F., Wang, Y., Wu, S.** (2014). Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*. *Carbohydrate Polymers*, 110, 278-284.
- Liaqid, A., Palma, M., Brigui, J. Ve Barroso, C. G.** (2007). Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1140(1-2): 29-34.
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F.** (2005). Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93: 47-56.

- Llyod, P. J. Ve Wyk, J.** (2011). Introduction to extraction in food processing. In: Enhancing Extraction Processes in Food Industry. CRC Press, pp:1-24.
- Majd, M. H., Rajaei, A., Bashi, D. S., Mortazavi, S. A., Bolourian, S.** (2014). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from bovine pennyroyal (*Phlomis parviflorum*) leaves using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 57; 195-202.
- Majeed, M., Hussain, A., Chatha S. A. A., Khosa, M. K. K., Kamal, M. K.K., Kamal, M. A., Zhang, X. Ve Liu, M.** (2015). Optimization Protocol for the Extraction of Antioxidant Components from *Origanum vulgare* Leaves Using Response Surface Methodology. *Saudi Journal of Biological Sciences*. In Press.
- Martins, N., Barros, L., Buelga, C., Henriques, M., Silva, S. Ve Ferreirara I.** (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L.. *Food Chemistry*, 170: 378-385.
- Mason, J. Ve Vinatoru, M.** (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwave. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(2):237-247.
- Mayer, B., Baggio, C. H., Freitas C. S., Santos, A. C., Twardowschy, A., Horst, H., Pizzolatti, M. G., Micke, G. A., Heller, M., Santos, E. P., Otuki, M. F. Ve Marques M. C. A.** (2009). Gastroprotective constituents of *Salvia officinalis* L.. *Fitoterapia*, 80(7): 421-426.
- Mitra, S.** (2004). Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, Wiley, New York.
- Morelli, L. L. Ve Prado, M. A.** (2012). Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(6):1144-1149.
- Mukhopadhyay, M.** (2000). Natural extracts using supercritical carbon dioxide. CRC Press.
- Murga, R., Sanz, M. T., Beltran, S. Ve Cabezas J. L.** (2002). Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 23(2): 113-121.
- Nack, M., ve Shahidi F.** (2003). Antioxidant properties of food phenolics. In: Phenolics in Food and Nutraceuticals. CRC Press.
- Nizamlıoğlu, N. M. Ve Nas, S.** (2010). Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 20-35.
- Önenç, S. S. Ve Açıkgöz, Z.** (2005). Aromatik Bitkilerin Hayvansal Ürünlerde Antioksidan Etkileri, *Zooteknikderneği.org*, 50-55.
- Özhatay, N., Koyuncu, M., Atay, S., Byfield, A.** (1997). Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma, İstanbul, 1997.

- Pereira, P., Bernardo-Gil, M. G., Cebola, M. J., Mauricio, E. Ve Romano, A.** (2013). Supercritical fluid extracts with antioxidant and antimicrobial activities from myrtle (*Myrtus communis* L.) leaves. Response surface optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 83: 57-64.
- Pérez-Jiménez, J. Ve Saura-Calixto, F.** (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, 39(7):791-800.
- Perez, M. B., Banek, S. A., Croci, C. A.** (2011). Retention of antioxidant activity in gamma irradiated argentinian sage and oregano. *Food Chemistry*, 126, 121-126.
- Piantino, C., Aquino, F. W. B., Follegatti-Romero, L. A. Ve Cabral F. A.** (2008). Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(2) 209-214.
- Prasad, N. K., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, W. K., Ramanan, N. R., Azlan, A., Ismail, A.** (2011). Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm. peels. *Food Chemistry*, 128(4), 1121-1127.
- Pokorny, J. & Korczak, J.** (2001). Preparation of natural antioxidants. In J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, eds. *Antioxidants in food, Practical applications*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge. pp. 311-330.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A., Khalel, K. I.** (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.) and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831.
- Roserio, L. B., Duarte, L. C., Oliveira, D. L., Roque R., Bernardo-Gil, M. G., Martins, A., Sepulveda, C., Almeida, J., Meireless, M., Girio, F. Ve Rauter A. P.** (2013). Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonia siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity. *Industrial Crops and Products*, 47: 132-138.
- Roy, R., Close, K. Ve Ghosh, D.** (2012). Novel Extraction Technology for Antioxidants and Phytochemicals. In: *Innovation in healthy and functional foods*. CRC Press, pp:343-360.
- Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Delfine, S., Cardile, V., Rosselli, S. Ve Bruno, M.** (2013). Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 55:42-47.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., Kraithong, S., Rawdkuen, S.** (2015). Optimization of antioxidants and tyrosinase inhibitory activity in mango peels using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 64: 742-749.

- Salem, I. B., Fekih, S., Sghaier, H., Bousselmi, M., Saidi, M., Landoulsi, A., Fattouch, S.** (2013). Effect of ionising radiation on polyphenolic content and antioxidant potential of parathion- treated sage (*Salvia officinalis*) leaves. *Food Chemistry*, 141, 1398-1405.
- Setyaningsih, W., Saputro, I. E., Palma, M., Barroso, C. G.** (2015). Optimization and validation of the microwave-assisted extraction of phenolic compounds from rice grains. *Food Chemistry*, 169: 141-149.
- Shan B., Xie, J. H., Zhu, J. H. Ve Peng, Y.** (2012). Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3): 579-587.
- Shi, H.** (1997). Supercritical fluid chromatography with chemiluminescent nitrogen and sulfur detection. Doktora Tezi. Virginia Polytechnic Institute. Virginia.
- Silva, M., Rogez, H., Larondelle, Y.** (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55(3): 381-387.
- Skrovankova, S., Misurcova, L. Ve Machu, L.** (2012). Chapter Three – Antioxidant Activity and Protecting Health Effects of Common Medicinal Plants. *Advances in Food and Nutrition Research*, 67:75-139.
- Song, J., Li, D., Liu, C., Zhang, Y.** (2011). Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3): 282-287.
- Spanos, G.A., R.E. Wrolstad, D.A. Heatherbell.** (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice. *J. Agric. Food Chem.*, 38(7): 1572-1579.
- Sun, Y., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q., Zeng, X.** (2011). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 78(3): 311-320.
- Tada, M., Okuno, K., Chiba, K., Ohnishi, E. Ve Yoshii, T.** (1994). Antiviral diterpenes from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 35(2):539-541.
- Takeuchi, T. M., Pereira, C. G., Braga, M. E. M., Marostica, M. R., Leal, P. F. Ve Meireles M. A. A.** (2008). Low pressure solvent extraction, microwave assisted, and ultrasound from condimentary plant. In: *Extracting Bioactive Compounds for Food Products*. CRC Press, pp: 137-218.
- Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q. Ve Sun D.** (2014). Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: Modeling, optimization and stability of extracts during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(2):706-715.

- Tao, Y., Zhang, Z., Sun, D.** (2014). Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonic Sonochemistry*, 21(4): 1461-1469.
- Tavman, Ş., Kumcuoğlu, S. Ve Akkaya, Z.** (2009). Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu. *Gıda Dergisi*, 34(3):175-182.
- Teng, H., Choi, H, Y.** (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive alkaloid compounds from rhizoma coptidis (*Coptis chinensis* Franch.) using response surface methodology. *Food Chemistry*, 142, 299-305.
- Then, M., Szillösy R., Vasarhelyi-Peredi, K. Ve Szentmihályi, K.** (2004). Polyphenol-, Mineral Element Content and Total Antioxidant Power of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. : XXVI International Horticultural Congress: The Future for Medicinal and Aromatic Plants.
- Torley, P.J. Ve Bhandari, B. R.** (2007). Ultrasound in food processing and preservation. In: Handbook of Food Preservation, Second Edition. CRC Press, pp: 713-732.
- Ulueben, A. ve Topçu, G.** (1997). Chemical and biological investigations of *Salvia* species growing in Turkey. In: Structure and Chemistry (Part F), 20.
- Url-1** <http://www.brad.ac.uk/staff/vtoropov/burgeon/thesis_luis/chapter3.pdf>, alındığı tarih: 15.04.2015.
- Vázquez, G., Agullo, F., Castro C. G., Freire, M. S., Antorrena, G. Ve Alvarez J. G.** (2012). Response surface optimization of antioxidants extraction from chestnut (*Castanea sativa*) bur. *Industrial Crops and Products*, 35(1):126-134.
- Vieira, G. S., Cavalcanti R. N., Meireles M. A. A. Ve Hubinger, M.** (2013). Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*). *Journal of Food Engineering*, 119(2):196-204.
- Vinatoru, M.** (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(3), 303-313.
- Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., Chemat, F.** (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing byproducts with ultrasound-assisted extraction, *Ultrasonics Sonochemistry*, 17, 1066-1074.
- Wang, C., Shi, L., Fan, L., Ding, Y., Zhao, S., Liu, Y., Ma, C.** (2013). Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. *Industrial Crops and Products*, 42: 587-594.

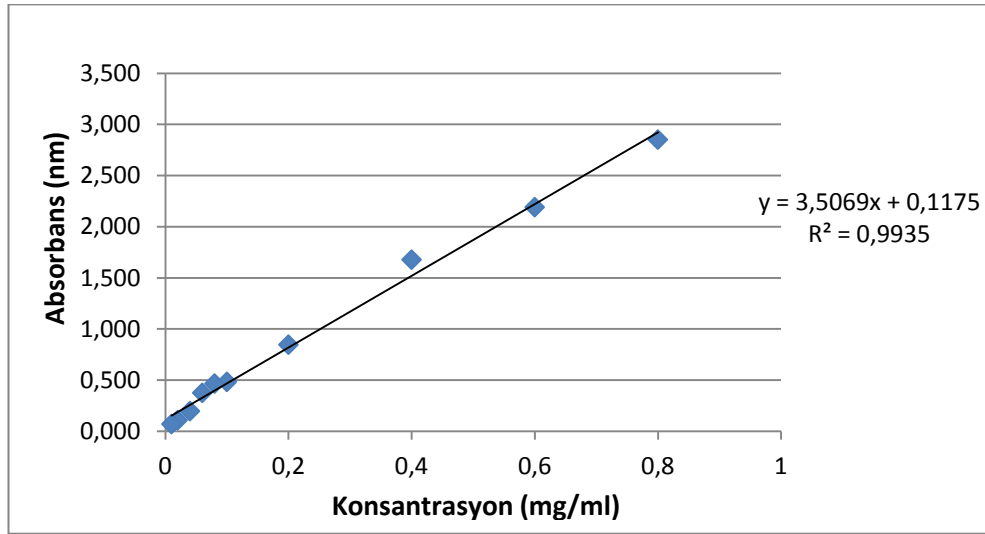
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X.** (2008). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106(2): 804-810.
- Wang, M.** (1998). Isolation and structural elucidation of aroma constituents bound as glycosides from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7): 2509-2511.
- Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Q., Wu, Q.** (2013). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizoma* with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(3): 846-854.
- Wu, H., Zhu, J., Diao, W. Ve Wang, C.** (2014). Ultrasound assisted enzymatic extraction and antioxidant activity of polysaccharides from pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Carbohydrate Polymers*, 113:314–324.
- Wu, J., Yu, D., Sun, H., Zhang, Y., Zhang, W., Meng, F. Ve Du, X.** (2015). Optimizing the extraction of anti-tumor alkaloids from the stem of *Berberis amurensis* by response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 69, 68-75.
- Wu, T., Yan, J., Liu, R., Marccone, M. F., Aisa, H. A., Tsao, R.** (2012). Optimization of microwave-assisted extraction phenolics from potato and its downstream waste using orthogonal array design. *Food Chemistry*, 133(4): 1292-1298.
- Xiao, W., Han, L., Shi, B.** (2008). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of flavonoid from Radix astragali using response surface methodology, *Separation Science and Technology*, 43, 671-681.
- Xie, J., Dong, C., Nie, S., Li, F., Wang, Z., Shen, M., Xie, M.** (2015). Extraction, chemical composition and antioxidant activity of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja leaves. *Food Chemistry*, 186: 97-105.
- Xu, H., Wang, W., Liu, X., Yuan, F., Gao, Y.** (2015). Antioxidative phenolics obtained from spent coffee grounds (*Coffea arabica* L.) by subcritical water extraction. *Industrial Crops and Products*, 76; 946-954.
- Xu, Q., Shen, Y., Wang, H., Zhang, N., Xu, S., Zhang, L.** (2013). Application of response surface methodology to optimise extraction of flavonoids from *fructus sophorae*. *Food Chemistry*, 138(4), 2122-2129.
- Zeybek, U. Ve Zeybek, N.** (2002). Farmasötik Botanik [Kapalı Tohumlu Bitkiler (Angiospermae) Sistematığı ve Önemli Maddeleri]. *Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, S.380.
- Zgórka, G. Ve Glowniak K.** (2001). Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26(1): 79-87.
- Zhang, L., Tu, Z., Wang, H., Kou, Y., Wen, Q., Fu, Z., Chang, H.** (2015). Response surface optimization and physicochemical properties of polysaccharides from *Nelumbo nucifera* leaves. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 103-110.

- Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J. Ve Hu, X.** (2006). Different Effects of Microwave and Ultrasound on the Stability of (*all-E*)-Astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8346-8351.
- Zuorro, A., Maffei, G., Lavecchia, R.** (2015). Reuse potential of artichoke (*Cynara scolimus* L.) waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, In Press.

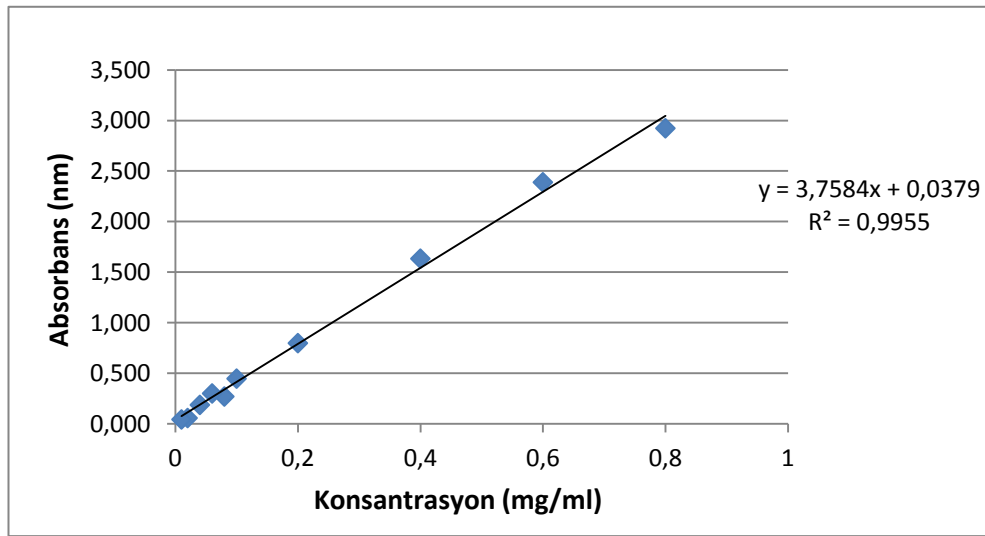
EKLER

EK A: Kalibrasyon Eğrileri

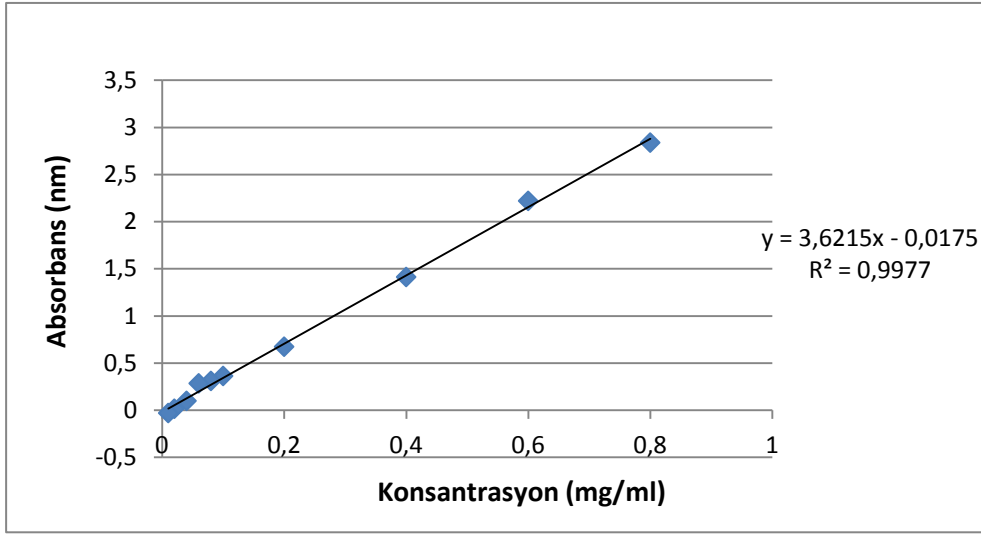
EK A: KALİBRASYON EĞRİLERİ



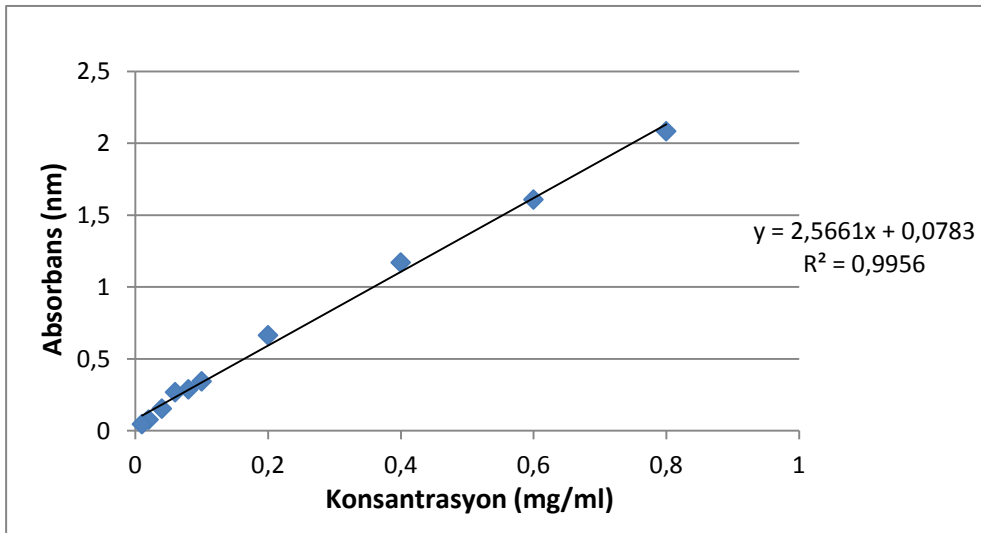
Şekil A.1: %60 etanol ile gallik asit kalibrasyon eğrisi.



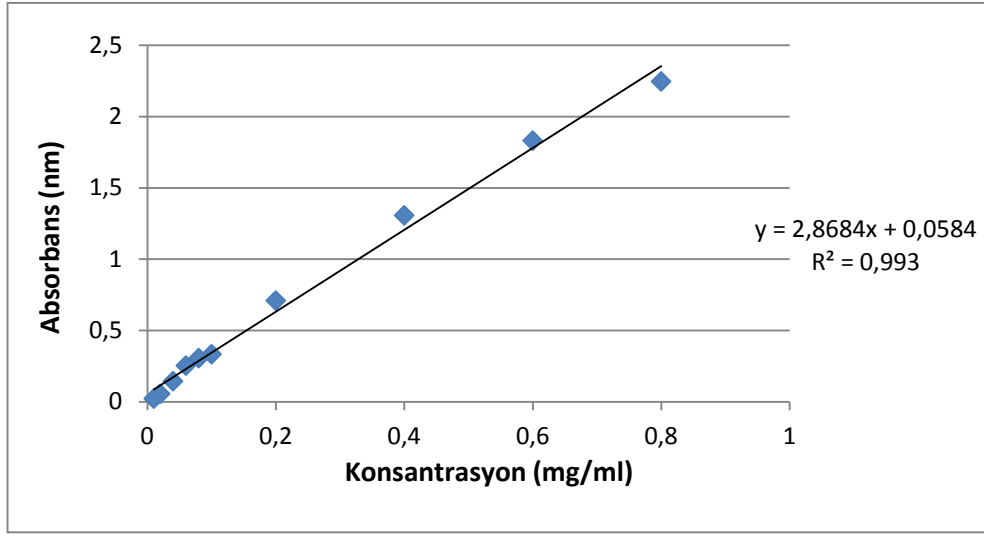
Şekil A.2: %70 etanol ile gallik asit kalibrasyon eğrisi.



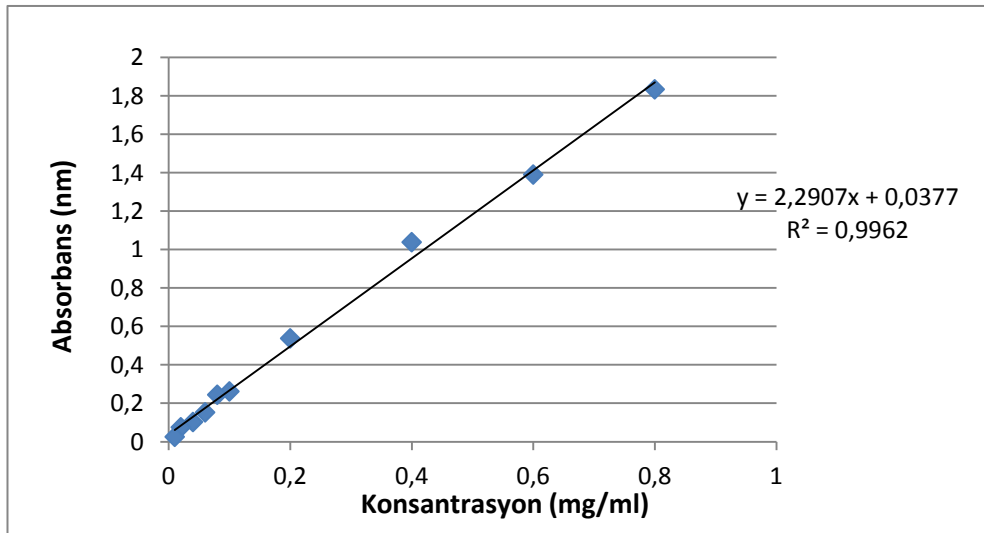
Şekil A.3: %80 etanol ile gallik asit kalibrasyon eğrisi.



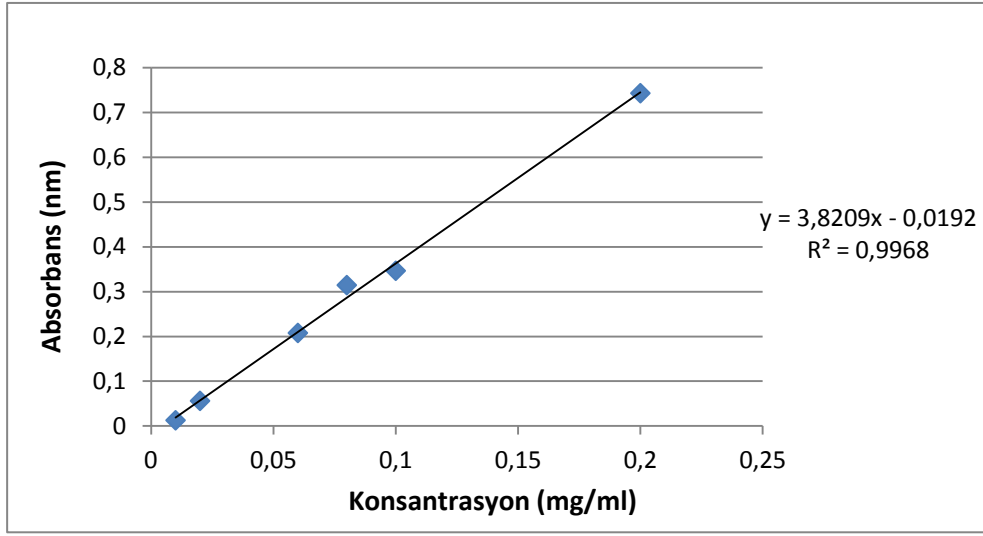
Şekil A.4: %60 etanol ile kateşin kalibrasyon eğrisi.



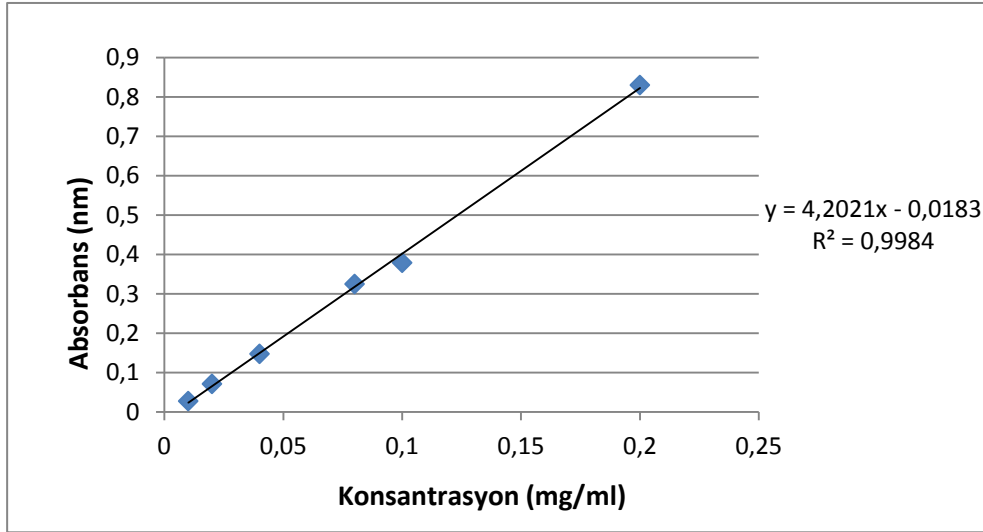
Şekil A.5: %70 etanol ile kateşin kalibrasyon eğrisi.



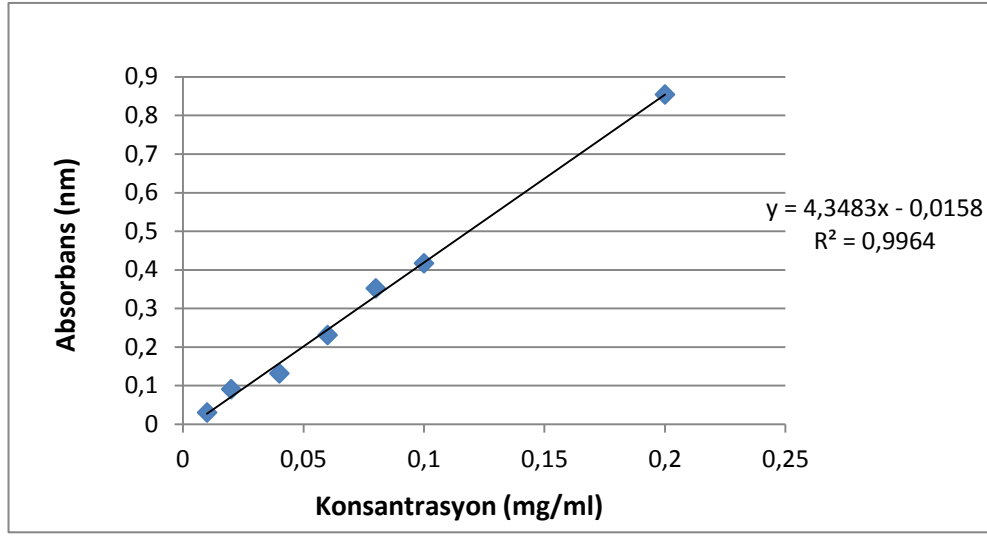
Şekil A.6: %80 etanol ile kateşin kalibrasyon eğrisi.



Şekil A.7: %60 etanol ile trolox kalibrasyon eğrisi.



Şekil A.8: %70 etanol ile trolox kalibrasyon eğrisi.



Şekil A.9: %80 etanol ile trolox kalibrasyon eğrisi

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Pınar YAĞCIOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul / 05.10.1988

Adres: Acıbadem Cad. Yaprak Sok. Üsküdar/İstanbul

E-mail : pinaryagcioglu@hotmail.com

Lisans: Ege Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü (2006-2010)