T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE ELDE EDİLEN MANDALİNA KABUK VE YAPRAK EKSTRAKTLARININ İNCELENMESİ

Fadime ATEŞ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ

Aralık, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma, 15.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Temel İşlemler ve Termodinamik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. İsmail İNCİ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Doç. Dr. Metin ÖZER
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. İ. Metin HASDEMİR
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakülte

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

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 41685 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans danışmanlığımı üstlenerek, çalışmalarım sırasında her türlü yardım, tecrübe ve desteğini benden esirgemeyen Sayın Hocam Prof.Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel desteğini yüksek lisans eğitimim boyunca hiç eksik etmeyen ve engin bilimsel tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren, çok değerli yardımcı danışman hocam Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bugünlere gelmemi sağlayıp gelişimime maddi ve manevi destekte bulunan aileme, manevi desteğini daima hissettiren sevgili eşim Şahin ATEŞ'e ve çalışmamı destekleyen İstanbul Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

Aralık 2017 Fadime ATEŞ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **xii**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **xvii**
SUMMARY ..... **xix**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1. MANDALİNA 3
2.2. ANTİOKSİDANLAR 6
2.3. FENOLİK BİLEŞİKLER 7
2.3.1. Flavonoidler 8
2.3.1.1. Flavonoller 8
2.3.1.2. Flavonlar 9
2.3.1.3. Flavanonlar 9
2.2.1.4. İzoflavonlar 10
2.3.1.5. Antosiyanidinler/Antosiyaninler 10
2.3.1.6. Flavan-3-oller 10
2.2.1.7. Proantosiyanidinler 11
2.3.2. Flavanoid Olmayan Bileşikler 11
2.3.2.1. Fenolik Asitler 11
2.3.2.2. Hidroksisinnamik Asitler 13
2.3.2.3. Stilbenler 14
2.4. BİTKİSEL KAYNAKLARDAN FENOLİK MADDELERİN EKSTRAKSİYONU 14
2.4.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon 15
2.4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu 18
2.4.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 23
2.4.4. Yanıt Yüzey Metodolojisi 26

3. MALZEME VE YÖNTEM 28
3.1. MALZEMELER 28
3.1.1. Bitki Materyali 28
3.1.2. Kimyasallar ve Reaktifler 28
3.1.3. Deney Düzeneğinde Kullanılan Ekipman ve Cihazlar 28
3.2. YÖNTEMLER 29
3.2.1. Örneklerin Ekstraksiyona Hazırlanması 29
3.2.2. Deneysel Tasarım 29
3.2.3. Fenolik Maddelerin Farklı Yöntemlerle Ekstraksiyonu 29
3.2.3.1. Ultrason destekli ekstraksiyon 29
3.2.3.2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu 30
3.2.3.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon 31
3.2.4. Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi 32
3.2.4.1. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi 32
3.2.4.2. Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi 33
3.2.5. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi 33
3.2.5.1. DPPH serbest radikalini indirgeme aktivitesi 33
3.2.5.2. ABTS serbest radikalini indirgeme aktivitesi 34
3.2.5.3. Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite 34
3.2.6. İstatistiksel Analizler 34
4. BULGULAR 36
4.1. UDE ile Su için Mandalina Kabuk ve Yapraklarından Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi 37
4.1.1. UDE ile Su için Mandalina Kabuk ve Yapraklarından CUPRAC, DPPH ve ABTS Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi 51
4.2. UDE ile Metanol için Mandalina Kabuk ve Yapraklarından Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi 53
4.2.1. UDE ile Metanol için Mandalina Kabuk ve Yapraklarından CUPRAC, DPPH ve ABTS Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi 65
4.3. MDE ile Mandalina Yapraklarından Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi 67
4.3.1. MDE ile Mandalina Yapraklarından CUPRAC, DPPH ve ABTS Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi 75
4.4. SAE ile Mandalina Yapraklarından Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi 77

4.4.1. SAE ile Mandalina Yapraklarından CUPRAC, DPPH ve ABTS Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi 84
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 86
KAYNAKLAR.....89
ÖZGEÇMİŞ 98

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Satsuma türü mandalinanın genel görünümü. 6

Şekil 2.2: Türkiye'de illere göre mandalina üretimi (AKİB). 6

Şekil 2.3: Antioksidanların serbest radikal temizleme mekanizması. 7

Şekil 2.4: Naringin[c] ve Naringenin[c] 9

Şekil 2.5: Hesperidin[c] ve Hesperidin[b]. 10

Şekil 2.6: Flavan-3-ol (D-Kateşin). 11

Şekil 2.7: Fenolik asitlerin temel yapısı [35]. 11

Şekil 2.8: Ellagik asit [39] 13

Şekil 2.9: Hidroksisinnamik asitler [35]. 13

Şekil 2.10: Hidroksisinnamik asit türlerinden klorojenik asit ve rosmarinik asit. 14

Şekil 2.11: m-Kumarik asit [41] 14

Şekil 2.12: Ses dalgası tipleri [46]. 15

Şekil 2.13: Ultrason destekli ekstraksiyon sistemi [50]. 16

Şekil 2.14: Karbondioksitin sıcaklık-basınç faz diyagramı [57]. 19

Şekil 2.15: Süperkritik akışkan ekstraktörünün şematik gösterimi [50]. 19

Şekil 2.16: Mikrodalga destekli ekstraksiyon sisteminin şematik görünümü (a. Kapalı sistem, b. Açık sistem) [71]. 24

Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan ultrason destekli ekstraksiyon cihazının şematik gösterimi 30

Şekil 3.2: Süperkritik akışkan ekstraksiyon cihazının şematik gösterimi. 31

Şekil 3.3: Çalışmada kullanılan mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı. 32

Şekil 4.1: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 43

Şekil 4.2: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 44

Şekil 4.3: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 44

Şekil 4.4: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 45

Şekil 4.5: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 46

Şekil 4.6: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 46

Şekil 4.7: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 48

Şekil 4.8: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 48

Şekil 4.9: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 49

Şekil 4.10: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 49

Şekil 4.11: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 50

Şekil 4.12: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 50

Şekil 4.13: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 59

Şekil 4.14: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 59

Şekil 4.15: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 60

Şekil 4.16: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 60

Şekil 4.17: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 61

Şekil 4.18: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 61

Şekil 4.19: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 62

Şekil 4.20: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 62

Şekil 4.21: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 63

Şekil 4.22: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 63

Şekil 4.23: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 64

Şekil 4.24: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 64

Şekil 4.25: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit kuru malzeme miktarında (2 g) kullanılan süreye bağlı olarak mikrodalga gücünün ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 71

Şekil 4.26: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit kuru malzeme miktarında (2 g) kullanılan süreye bağlı olarak mikrodalga gücünün ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 72

Şekil 4.27: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit mikrodalga gücünde (275 W) kullanılan süreye bağlı olarak kuru yaprak miktarının ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 73

Şekil 4.28: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit mikrodalga gücünde (275 W) kullanılan süreye bağlı olarak kuru yaprak miktarının ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 73

Şekil 4.29: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit ekstraksiyon süresinde (45 s) kullanılan mikrodalga gücüne bağlı olarak kuru yaprak miktarının ektrakte edilen TPM miktarına etkisi. 74

Şekil 4.30: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit ekstraksiyon süresinde (45 s) kullanılan mikrodalga gücüne bağlı olarak kuru yaprak miktarının ektrakte edilen TFM miktarına etkisi. 74

Şekil 4.31: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit etanol debisinde (0.50 mL/dk) kullanılan sıcaklığa bağlı olarak basıncın ektrakte edilen TPM miktarına etkisi. 80

Şekil 4.32: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit etanol debisinde (0.50 mL/dk) kullanılan sıcaklığa bağlı olarak basıncın ektrakte edilen TFM miktarına etkisi. 81

Şekil 4.33: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit sıcaklıkta (75 ºC) kullanılan basınca bağlı olarak etanol debisinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 81

Şekil 4.34: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit basınçta (150 bar) kullanılan sıcaklığa bağlı olarak etanol debisinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi. 83

Şekil 4.35: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit basınçta (150 bar) kullanılan etanol debisine bağlı olarak sıcaklığın ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi. 83

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Mandalinanın bilimsel sınıflandırılması. 3

Tablo 2.2: Dünya'da mandalina üretimi. 4

Tablo 2.3: Türkiye'de mandalina üretimi. 5

Tablo 2.4: Gaz, süperkritik akışkan ve sıvıların fiziksel özellikleri [50]. 18

Tablo 2.5: Süperkritik akışkan olarak kullanılan bazı çözücülerin özellikleri. 20

Tablo 2.6: Etil alkol ilavesiyle CO_2' nin kritik özelliklerinde meydana gelen değişim [62]. 21

Tablo 4.1: Mandalina kabuk ve yapraklarının su ile yapılan UDE için belirlenen bağımsız değişkenlerin seviye ve sembolleri. 37

Tablo 4.2: UDE ile elde edilen TPM ve TFM için FCCD deneme planı ve sonuçları.....38

Tablo 4.3: Mandalina kabuklarına uygulanan UDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....39

Tablo 4.4: Mandalina yapraklarına uygulanan UDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....40

Tablo 4.5: UDE yöntemi kullanılarak mandalina kabuk ve yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler. 41

Tablo 4.6: Mandalina kabukları için UDE ile istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.....51

Tablo 4.7: Mandalina yaprakları için UDE ile istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.....51

Tablo 4.8: Mandalina kabuk ve yapraklarından UDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite analiz sonuçları. 52

Tablo 4.9: Mandalina kabuk ve yapraklarının metanol ile yapılan UDE için belirlenen bağımsız değişkenlerin seviye ve sembolleri. 53

Tablo 4.10: UDE ile elde edilen TPM ve TFM için FCCD deneme planı ve sonuçları.....54

Tablo 4.11: Mandalina kabuklarına uygulanan UDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....55

Tablo 4.12: Mandalina yapraklarına uygulanan UDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....56

Tablo 4.13: UDE yöntemi kullanılarak mandalina kabuk ve yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler. 57

Tablo 4.14: Mandalina kabuklarının UDE için istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.....65

Tablo 4.15: Mandalina yapraklarının UDE için istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.....65

Tablo 4.16: Mandalina kabuk ve yapraklarından UDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite analiz sonuçları. 66

Tablo 4.17: Mandalina yapraklarının MDE için belirlenen bağımsız değişkenlerin seviye ve sembolleri. 67

Tablo 4.18: MDE ile elde edilen TPM ve TFM için FCCD deneme planı ve sonuçları. 68

Tablo 4.19: Mandalina yapraklarına uygulanan MDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....69

Tablo 4.20: MDE yöntemi kullanılarak mandalina yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler. 70

Tablo 4.21: Mandalina yaprakları için MDE'de istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.....75

Tablo 4.22: Mandalina yapraklarından MDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite analiz sonuçları. 76

Tablo 4.23: Mandalina yapraklarının SAE için belirlenen bağımsız değişkenlerin seviye ve sembolleri. 77

Tablo 4.24: SAE ile elde edilen TPM ve TFM için FCCD deneme planı ve sonuçları. 78

Tablo 4.25: Mandalina yapraklarına uygulanan SAE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.....79

Tablo 4.26: SAE yöntemi kullanılarak mandalina yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler. 80

Tablo 4.27: Mandalina yaprakları için SAE için istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.....84

Tablo 4.28: Mandalina yapraklarından SAE yöntemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite analiz sonuçları. 85

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
R^2	: Korelasyon katsayısı
R^2_a	: Ayarlanmış korelasyon katsayısı
R^2_t	: Tahmin edilen korelasyon sayısı
T_k	: Kritik sıcaklık
P_k	: Kritik basınç
W	: Güç
X	: Bağımsız değişken
Y	: Yanıt

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
AKİB	: Akdeniz İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği
AP	: Uygun hassasiyet
ANOVA	: Varyans analizi
CV	: Varyans katsayısı
KE	: (+)- Kateşin Eşdeğeri
CO_2	: Karbondioksit
CUPRAC	: Cu(II) İyonu İndirgen Antioksidan Kapasite
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EtOH	: Etanol
FRAP	: Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü
GAE	: Gallik asit eşdeğer
kHz	: kilo Hertz
KY	: Kuru yaprak
MDE	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
MeOH	: Metanol
MHz	: Mega Hertz
-OH	: Hidroksil grubu
ORAC	: Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi

SAE **:** Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon

SD **:** Standart sapma

TEAK **:** Troloks Eşdeğer Antioksidan Aktivite

TPM **:** Toplam Fenolik Madde

TFM **:** Toplam Flavanoid Madde

UDE **:** Ultrases Destekli Ekstraksiyon

Uv-Vis **:** Ultraviyole ve görünür ışık

YK **:** Yaş kabuk

YYM **:** Yanıt Yüzey Metodolojisi

ÖZET

ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE ELDE EDİLEN MANDALİNA KABUK VE YAPRAK EKSTRAKTLARININ İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fadime ATEŞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR

II. Danışman : Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ

Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapılı ilaçların yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması insanları doğal ürünlerin kullanımına yöneltmiştir. Bu amaçla birçok bitkiye uygulandığı gibi mandalina tüketimi sırasında ortaya çıkan kabuk, yaprak, posa vb. mandalina atıkları antioksidatif bakımından çok yönlü olarak araştırılmaktadır. Ayrıca doğal antioksidan aktivitelerinden ötürü bitkilerdeki fenolik maddelerin tayini çok önemlidir. Antioksidan özellik gösteren fenolik maddeler, serbest radikal olarak adlandırılan kararsız ve zararlı maddelerin etkilerini azalttığı, yapılan bilimsel çalışmalar neticesinde bilinmektedir. Antioksidanlar bu özelliği sayesinde kanser, kalp-damar hastalıkları, astım, şeker hastalığı, karaciğer hastalıkları gibi birçok hastalığın olumsuz etkilerini azaltmaktadır.

Tez kapsamında, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen mandalinanın (*Citrus deliciosa* Tenore) kabuk ve yapraklarından antioksidan bileşiklerin elde edilmesi için Ultrason Destekli Ekstraksiyon, Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu ve Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Ekstraksiyon işlemi sırasında, Yanıt Yüzey Metodolojisi kullanılarak ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon basıncı, titreşim genliği, mikrodalga gücü gibi ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Toplam Fenolik Madde miktarı, Toplam Flavonoid Madde miktarı, DPPH (2,2-

difenil-1-pikrilhidrazil) radikal giderme yöntemi, ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) yöntemi ve CUPRAC Cu(II) İyonu İndirgen Antioksidan Kapasite değerleri göz önünde bulundurulmuş ve Yanıt Yüzey Metodolojisi kullanılarak ekstraksiyon koşulları optimize edilmiştir.

En yüksek toplam fenolik madde miktarı 216.0032 (mg-GAE/g-KY) ve toplam flavonoid madde miktarı 16.1051 (mg-KE/g-KY) mandalina yapraklarına su ile uygulanan UDE yönteminde elde edilmiştir.

Toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve antioksidan aktivite değerlerinin en iyi çıktığı optimum çalışma koşulları, herbir ekstrakt elde etme yöntemine göre açıklanmış ve tablo ve şekillerle gösterilmiştir.

Aralık 2017, 119 sayfa.

Anahtar kelimeler: Mandalina (*Citrus deliciosa* Tenore), kabuk, yaprak, ekstraksiyon, optimizasyon, antioksidan aktivite, yanıt yüzey metodoloji.

SUMMARY

INVESTIGATION OF MANDARIN PEEL AND LEAF EXTRACTS OBTAINED BY SEVERAL METHODS

M.Sc. THESIS

Fadime ATEŞ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemical Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR

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

In recent years, the insufficiency of synthetic drugs and the detection of side effects against increasing diseases have led people to use natural products. For this purpose, as it is applied to many plants, mandarin wastes such as peel, leaf, pulp etc. which appeared during mandarin consumption are being investigated antioxidatively. In addition, because of their natural antioxidant activity, the identification of phenolic substances in plants is very important. The scientific studies prove that phenolic substances with antioxidant properties are efficient on reducing effects of harmful and unstable substances called free radical. By means of this property, antioxidants decrease the negative effects of many diseases; such as cancer, cardiac related diseases, asthma, diabetes and liver diseases.

In the scope of this thesis, leaves and peels of mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) could be processed with Ultrasonic Assisted Extraction, Supercritical Fluid Extraction and Microwave Assisted Extraction. During the extraction, response surface methodology could be used to optimize extraction parameters such as duration, temperature, pressure, amplitude, microwave irradiation power. Response surface methodology was employed to optimize the extraction conditions according to the Total Phenolic Material, Total Flavanoid Material, DPPH (2,2-

diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging method, ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) method and CUPRAC Cupric Reducing Antioxidant Capacity values.

The highest total phenol content and total flavonoid content were calculated as 216.0032 (mg-GAE/g-DL) and 16.1051 (mg-CE/g-DL) from mandarin leaves with water under ultrasound-assisted extraction method; respectively.

The best optimal experimental conditions regarding extract efficiency, total phenolic compounds and antioxidant activity were explained and compared by figures and tables for each extraction method.

December 2017, 119 pages.

Keywords: Mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore), peel, leaf, extraction optimization, antioxidant activitiy, Response Surface Methodology.

1. GİRİŞ

Fonksiyonel gıda, besleyici özelliğinin dışında bir veya daha fazla fizyolojik fonksiyona sahip olan, sağlıklı yaşam sürdürmeye yarayan veya herhangi bir hastalık riskini azaltan gıda maddeleridir. Fonksiyonel gıdalar, geleneksel gıdaların, insan sağlığına fayda sağlayacak bir katkı maddesiyle zenginleştirilmesiyle de elde edilebilmektedir. Fonksiyonel özellik kazandırmak için eklenen bu katkı maddelerine, fonksiyonel katkı maddeleri denilmektedir. Bu katkı maddelerinin doğal kaynaklardan elde edilmesi son derece önemlidir. Son yıllarda fonksiyonel katkı maddelerinin bitkiler, gıda atıkları ve algler gibi doğal kaynaklardan elde edilmesi, analitik yöntemlerdeki gelişmeler sayesinde araştırıcıların ilgisini çekmiş ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır. Fonksiyonel özelliklere sahip olan maddeler arasında antioksidanlar en fazla çalışılan konulardan biridir [1].

Yapılan birçok araştırma, bitkilerde bulunan fenolik maddelerin değişik hastalıkları önlemede önemli etkileri olduğunu göstermiştir. Bu nedenle gıda üreticilerinin gıdaların fenolik antioksidanlarca zenginleştirilmesi konusuna ilgisi giderek artmıştır.

Bitkilerde bulunan doğal antioksidanlar aktivitelerinden ötürü fenolik maddelerin tayini oldukça önemlidir. Bitkiler, fenolik bileşenleri mikroplara ve ışımaya karşı savunma mekanizması olarak yapılarında bulundururlar ve güçlü antioksidan özelliğe sahiptirler. Doğal antioksidan maddeler bu serbest radikallerin zararlı etkilerini yani elektron kapmasını yok ederek ve hücre hasarını engelleyerek faydalar sağlamaktadır. Bu sayede serbest radikal zincir tepkimelerini önlerler [2]. Gıda endüstrisinde bütillenmiş hidroksi anisol ve bütillenmiş hidroksi toluen gibi yapay antioksidanların doğal ve güvenli olduğu düşünülerek, gıdaların hem besleyici hem de hastalıklara karşı koruyucu özelliklerini geliştirme amacıyla, bitkisel kaynaklardan özellikle de bitkilerin atıklarından doğal antioksidan elde etme çalışmalarını teşvik etmiş ve bu konuda ticari gelişmeler yaşanmıştır [3,4]. Burada belirtilmesi gereken bir diğer önemli ayrıntı ise, kimyasal antioksidanlara karşı söz konusu olan bu endişe sadece gıda değil, kozmetik ve ilaç endüstrileri için de geçerli olduğudur. [5]. Ayrıca polifenoller, yüksek antioksidatif özellikleri yanında mikrop, virüs ve enfeksiyon giderici özelliklere de sahiptirler [2,6-8].

Yapılan çalışmalar, mandalina ve mandalina atıklarının fenolik maddeler bakımından oldukça zengin olduğunu göstermiştir. Bu fenolik maddelerin özellikle mandalina yaprağında yoğunlaştığını ve güçlü antioksidan aktivite gösterdikleri değişik aktivite tayin yöntemleri ile tespit edilmiştir [9,10].

Bu çalışmada, yurt içi ve dışında önemli bir ekonomik potansiyele sahip olan mandalina tüketimi sırasında bir atık olarak açığa çıkan mandalina kabuk ve yapraklarından, fenolik yapıdaki antioksidan maddeleri değişik yöntemlerle ekstrakte etmek ve antioksidan aktivitelerini belirlemek hedeflenmiştir. Ayrıca, Yanıt Yüzey Metodolojisi (YYM) kullanarak Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UDE), Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SAE) ve Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MDE) için optimum ekstraksiyon koşullarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MANDALİNA

Turunçgiller; turunç, portakal, mandalina, greyfurt, bergamot ve limon gibi ekonomik değeri yüksek olan *Citrus* cinsi meyve ağacı türlerini içine alan bir bitki topluluğudur (Tablo 2.1)[11]. Yaklaşık 115 milyon ton üretim ile dünyada en fazla üretilen meyve grubudur ve bu üretim sırasıyla; portakal, mandarin, limon, greyfurt ve diğer turunçgiller şeklindedir. Nitekim 2010 yılında dünya turunçgiller üretiminin %57'si portakal, %23'ü mandarin, %11'i limon, %4'ü greyfurt (altıntop) ve kalanı da diğer turunçgiller şeklinde gerçekleşmiştir. Narenciye, ekonomik değer açısından uluslararası meyve ticaretinde de ilk sırada yer almaktadır.

Tablo 2.1: Mandalinanın bilimsel sınıflandırılması.

Alem	Plantae (Bitkiler)
Klad	Angiosperms (Kapalı tohumlular)
Klad	Eudicots (İki çenekliler)
Klad	Rosids
Takım	Sapindales
Familya	Rutaceae
Cins	Citrus
Tür	*Citrus reticulata*

Tablo 2.2'de görüldüğü üzere dünyada üretilen turunçgillerin neredeyse çeyreğini oluşturan mandalina önemli bir üretim kapasitesine sahiptir. Mandalina en fazla anavatanı olan Güneydoğu Asya'da yetiştirilmektedir. Çin'in toplam mandalina üretimi kendinden sonra gelen 14 ülkenin toplam mandalina üretimiyle hemen hemen iki katıdır. 1,040,000 tonluk üretimiyle Türkiye dünya mandalina üretiminde %5'lik pay ile beşincidir [12].

Tablo 2.2: Dünya'da mandalina üretimi.

SIRA	ÜLKE	2016(1000 TON)
1	Çin	20 000
2	Avrupa Birliği	3035
3	Japonya	1115
4	Fas	1065
5	Türkiye	1040
6	ABD	876
7	Güney Kore	640
8	Tayland	375
9	Arjantin	350
10	İsrail	240
11	Diğer Ülkelerin Toplamı	227
12	Dünya	28 963

Mandalina; ılıman iklime sahip bütün memleketlerde kültür şekilleri yetiştirilen, yaprak dökmeyen, uçucu yağ taşıyan bu küçük ağaçların meyveleri ülkemizde çok sevilir. Ege, Akdeniz ve Doğu Karadeniz Bölgelerinde bol miktarda üretilmektedir. Tatlı, kokulu, sulu, vitamince zengin bir meyvedir. Ticari olarak yetiştiriciliği yapılan turunçgil türleri içerisinde düşük sıcaklıklara en dayanıklısı ancak meyveleri düşük sıcaklıklara en hassas olanıdır. Mandalina çeşitlerinin olgunluk dönemleri aylara yayılmış durumdadır. Meyve kabuk renkleri açık sarıdan koyu kırmızıya kadar çeşitlilik ihtiva eder.

Mandalina ağaçları en iyi bol humuslu, derin, suyu iyi akıntılı, kumlu-tınlı, tınlı ya da killi-tınlı topraklarda yetişir. İyice derine inen köklerinin oksijen gereksinimi fazla olduğundan, mandalina ağacı kesinlikle ağır topraklarda yetiştirilmemelidir. Mandalina ağaçları için en uygun toprak pH'sı 5,5-6 olmalıdır. Mandalina bahçesi tesis edilecek yerin toprak derinliği en az 1,5-2 m olmalıdır. Mandalina kökleri yüksek oranda oksijen ister ve havasızlığa çok

duyarlı olup boğulma tepkisi göstereceğinden mandalina yetiştirilecek toprağın havalanan bir yapıya sahip olması gerekir. Bu sebeple toprak havalanan-süzek bir karakter taşımalıdır.

Tablo 2.3: Türkiye'de mandalina üretimi.

İller	**2008**	**2009**	**2010**	**2011**
Adana	247 930	273 422	241 289	236 937
Hatay	196 182	219 626	218 695	242 335
Mersin	113 025	141 421	155 458	165 327
İzmir	91 982	101 545	126 068	110 614
Balıkesir	34 162	34 522	34 611	26 388
Antalya	27 777	27 507	31 521	36 436
Aydın	24 881	27 216	28 746	10 103
Muğla	9023	9904	10 559	11 671
8 İlin Toplamı	744 962	835 163	846 947	859 861
Türkiye Toplamı	756 473	846 390	858 699	872 251
8 İlin Yüzdesi	98.48	98.67	98.63	98.58
İller	2008	2009	2010	2011
Adana	248 930	274 422	242 289	237 937

Tüm turunçgiller gibi mandalina ağaçlarının da en önemli isteği sıcak bir ortamda yetiştirilmektir. Mandalina yetiştiriciliğinin yapıldığı yerde sıcaklıklar -3, -4 derecenin altına düşmemelidir. Dayanamayacağı en yüksek sıcaklıklar ise, 45 derece ve üzeridir. Mandalina ağaçlarının gelişmesi 12, 13 derece sıcaklıkta başlar; 25-31 dereceler, gelişmenin en hızlı olduğu sıcaklıktır ve 37-39 derecelerde ağaçların gelişimi gözlenmez. Meyve bağlamaları için en uygun sıcaklık 21 derecedir. Soğuk ve sıcak olarak sert esen rüzgarlar mandalina ağaçlarını kötü yönde etkilediğinden, bulundukları yerde hakim esen rüzgarlara karşı rüzgar kıranlar kurulmalıdır. Ayrıca mandalina ağaçlarının meyve dökümü ve meyvelerinin niteliği, havanın nem oranından etkilenir. Düşük nem oranlı hava, ağacın gelişimini ve meyve verimini kötü yönde etkilemektedir [13].

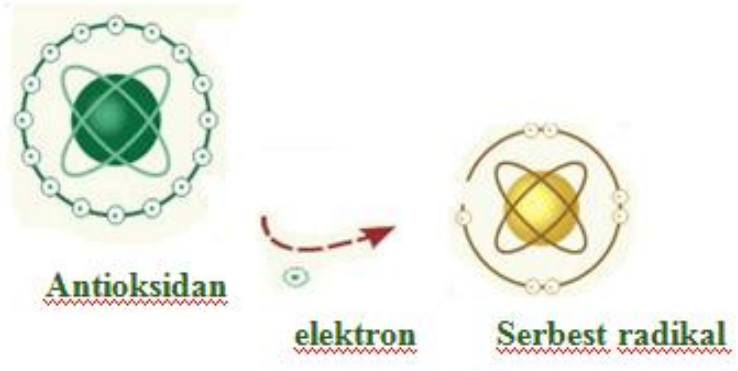
Şekil 2.1: Satsuma türü mandalinanın genel görünümü.

Şekil 2.2: Türkiye'de illere göre mandalina üretimi (AKİB).

Ülkemizde yetiştirilen mandalina türleri şu şekildedir: Ankor, Clemantin, Fairchild, Fortune, Fremond, Kara, Kinnow, Klausellina, Lee, Marisol, Minneola, Nova, Okitsu Ortanik, Ovari, Robinson, Satsuma ve Yerli mandalinadır [11].

2.2. ANTİOKSİDANLAR

Fenolik bileşikler olarak antioksidanlar serbest radikal süpürücü etkiye sahiptirler ve bu özellikleri cilt, kan veya doku gibi insan vücudunun çeşitli bölgelerinde serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif hasara karşı siper oluştururlar [14]. Bitkilerde bulunan antioksidan aktivitesi ve fenolik bileşikler arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Antioksidanların, serbest radikal oluşumunun önlenmesi, zincir reaksiyonları başlangıcının engellenmesi (serbest radikal süpürücü) ve geçiş metali kıskaçlama aktivitesi olmak üzere üç ana mekanizması vardır [15]. Antioksidanların serbest radikal temizleme mekanizması aşağıdaki şekil ile açıklanabilir:



Şekil 2.3: Antioksidanların serbest radikal temizleme mekanizması.

Belirli bir ölçüde sentetik ya da doğal antioksidanlar, DNA hasarı, doku yaralanması ya da lipid oksidasyonu gibi sorunların üstesinden gelmek için gereklidir. Antioksidanlar serbest radikallere karşı koruyucu ve onarıcı özelliklere sahiptir [16]. Gıda malzemelerinde bütillenmiş hidroksitoluen, tersiyer bütil hidrokinon ve bütillenmiş hidroksianisol gibi sentetik antioksidanlar kullanılabilir olmasına rağmen son yıllarda doğal antioksidanlar için artan bir talep vardır. Tüm tahıllar, sebze ve meyveler [17], kakao [18], çay ve kahve [19] bazı doğal antioksidan kaynaklarındandır. Antioksidanlar kalp hastalıkları ve kansere karşı korur [20] ve hatta travmatik beyin yaralanması tedavisinde kullanılabilir [21]. İnsan vücudundaki bu tür olumlu etkilerin yanı sıra gıdaların raf ömrünü uzatmak için serbest radikallere karşı gıda katkı maddesi olarak da kullanılabilir. Bitkilerde bulunan antioksidanlardan bazıları flavonoidler, sinnamik asit, benzoik asit ve rutindir [20].

Antioksidan aktivitesini belirlemek için çeşitli yöntemler vardır. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal giderme yöntemi (DPPH), 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit) yöntemi (ABTS), Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC), Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP), oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) ve troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAK) en sık kullanılan yöntemlerdir.

2.3. FENOLİK BİLEŞİKLER

Organik kimyada fenoller, fenolikler, aromatik bir hidrokarbon grubuna bir hidroksil iyon grubu (-OH) bağlanarak elde edilen kimyasal bileşikler sınıfıdır. Sınıfın en basit bileşiği fenoldür (C_6H_5OH). Alkollere benzemesine rağmen fenoller eşsiz özelliklerinden dolayı alkoller olarak sınıflandırılamaz (çünkü hidroksil grubu doymuş karbon atomuna bağlı

değildir). Fenoller, aromatik halkanın oksijen ile sıkı bağlanması ve oksijen ile hidrojen arasında daha gevşek bağlanmasına rağmen daha yüksek bir asitliğe sahiptir.

Fenolik bileşikler, bitki, sebze ve meyvelerde geniş bir aralıkta bulunmaktadır. Bitkilerde ikincil ara ürünler olarak üretilen fenolik bileşikler, bitkileri haşereler, patojenler veya parazitlere karşı önleyici ve koruyucu özelliklere sahiptir [14,22].

Fenolik bileşikler, gıda malzemelerinin acı, burukluk, ekşilik ya da tatlılık gibi tat ve koku özelliklerine önemli bir etkiye sahiptir. Örneğin; çayın tadının çoğunlukla polifenollerden geldiği düşünülmektedir ve bu bileşikler çaya tatlı ve sulu tat verir [22]. Ayrıca fenolik bileşiklerden flavonoidler, bitkilerin renk oluşumundan sorumludur [23].

Polifenoller, vitamin C, vitamin E ve karotenoidler gibi vücut dokularını oksidatif strese karşı koruyan besinsel indirgeyici maddelerdir. Genel olarak antioksidanlar olarak adlandırılan fenolik bileşikler vücudu oksidatif stresle ilişkili olarak kanser, kardiyovasküler hastalıklar, iltihap ve diğer hastalıklara karşı korur [24].

Polifenoller yapılarına bağlı olarak flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak iki ana gruba ayrılırlar.

2.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler, C_6-C_3-C_6 olarak temel yapıya sahiptir. Bu bileşikler bitkilerde polen çekici pigmentler olarak ya da bitkileri işgalci böcekler ve mikroorganizmalara karşı kimyasal savunma sağlar. Flavonoidler diğer biyolojik etkileşimlere de dahil olabilir. Son yıllarda yapılan bir araştırmada da önemli bir rol oynayan flavonoidlerin insan sağlığına faydalı etkilerinin olduğu görülmüştür. Flavonoidlerin güçlü antioksidan etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir [25]. Flavonoidlerin gerçek sayısı bilinmemekle birlikte 2000 ile 6500 arasında olduğu bildirilmiştir [26-30]. Elma, çilek, üzüm gibi meyveler, çikolata ve özellikle çay, belli oranlarda flavonoid ihtiva eder. Flavonoidlerin karbon halkalarındaki fonksiyonel grupların değişimlerinden dolayı yedi farklı alt grupları vardır.

2.3.1.1. Flavonoller

Flavonoller ya da kateşinler meyve ve bazı sebzelerin kabuklarında bulunur. Yaygın olarak tüketilen sebze ve meyvelerde flavonoller ve gallik asit esterleri bulunmaktadır [31].

Çoğunlukla soğan, kapari, marul gibi sebzelerde, maydanoz, rezene, kekik ve benzeri bazı otlar ve baharatlarda bulunur.

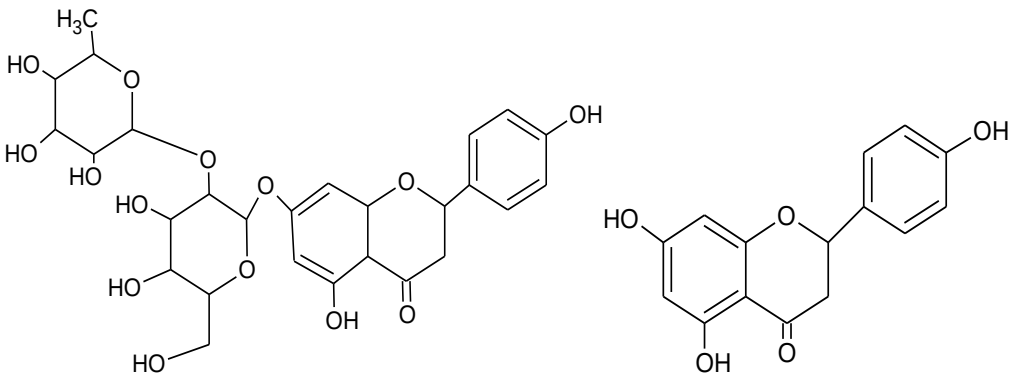
Soğan, kuşkonmaz, çilek ve marulda da bulunan kuersetin en yaygın bilinen polifenol olan flavonoldür. Kamferol, flavonollerin ikinci büyük grubudur. Lahana, ıspanak ve çilek yüksek oranda kamferol içeren gıdalardır. Myrisetin, maydanoz, rezene, kekik, üzüm, kırmızı lahana, demlenmiş çay ve kırmızı şarapta bulunan bir başka flavonoldür. En az rastlanan isorhamnetin soğan ve armutta bulunan flavonoldür [14].

2.3.1.2. Flavonlar

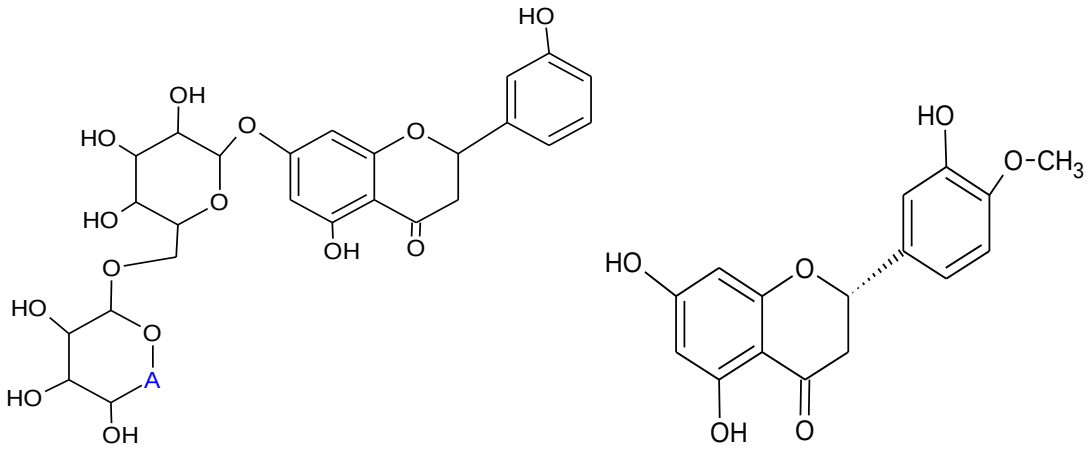
Bitkilerde flavonlar flavonola kıyasla daha küçük miktarlarda bulunur. Apigenin ve luteolin özellikle maydanoz, kereviz, kekik, fesleğen, enginar ve diğer bitkilerde bulunan en yaygın flavonlardandır. Tangeretin ve krisin sırasıyla turunçgil kabuğu ve çarkıfelek çiçeğinde bulunan flavonlardır [32]. Ayrıca, limon otu orientin ve izoorientin flavonları içerir [23].

2.3.1.3. Flavanonlar

Hesperidin, naringenin ve eriodiktiol özellikle misket limonu, limon, mandalina, greyfurt ve portakal gibi turunçgillerde en bol bulunan flavanonlardır. Sakuranetin ve izosakuranetin yaygın olmayan flavanonlardır [23]. Turunçgiller, kuru erik ve kivi dışında da flavanonlar vardır. Genellikle meyvelerde flavanonlar, naringenin (naringin), hesperidin (örneğin hesperedin-7-O-rutinosid), narirutin veya neohesperidin gibi glikolize edilmiş formda bulunur. Bu bileşikler meyvelerdeki acı tattan sorumludur [32].



Şekil 2.4: Naringin[c] ve Naringenin[c] .



Şekil 2.5: Hesperidin[c] ve Hesperidin[b].

2.2.1.4. İzoflavonlar

Polar ve suda çözünür bileşikler olan izoflavonlar yapısal olarak diğer bazı flavonoidlerden farklıdır. Çoğunlukla baklagillerde bulunur ve meyve, sebzelerde tespit edilmez [14]. İzoflavonlar fındık ve tahıllarda küçük miktarda bulunurken çoğunlukla soya fasulyesinde bulunur [32]. Daidzein, genistein ve glisitin en yaygın bulunan izoflavonlardır [23].

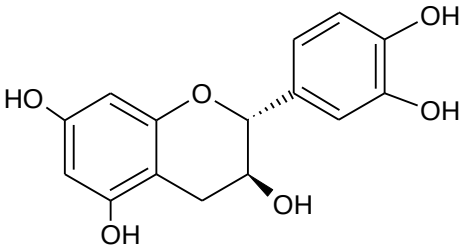
2.3.1.5. Antosiyanidinler/Antosiyaninler

Antosiyanidinlerin glikozit türevleri antosiyaninler suda çözünür ve bitkilerde renk belirleyici pigmentlerdir. pH değerlerine bağlı olarak, antosiyanidinler kırmızıdan (aşırı asidik koşullar), mor-mavi(orta derecede pH koşulları) ve sarı-yeşil (alkali koşullar) renkler gösterir ve bitkileri yüksek yoğunluktaki ışığa karşı koruyucu bir etkiye sahiptir [33]. Antosiyanidin konsantrasyonu olgunlaşma sırasında artar ve çoğunlukla meyvelerin kabuğunda birikir [14]. Üzüm, çilek, erik, şeftali, kiraz, patlıcan ve kırmızı lahana genellikle siyanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin, malvidin gibi antosiyanidinlerin glikozitli türevlerine sahiptir [23].

2.3.1.6. Flavan-3-oller

Kateşin ve epikateşin flavan-3-ollerin en yaygın temsilcileri arasında bulunmaktadır. Bu tür bileşikler acı, burukluk, ekşilik ya da tatlılık gibi farklı tatlardan sorumludurlar. Flavan-3-oller, kayısı, elma, kiraz ve üzüm gibi meyvelerde olduğundan daha yüksek miktarlarda çay ve çikolatada bulunur. Kakao çekirdekleri [34,18] ve çay epigallokateşin içerir. Çay

yaprakları, büyük miktarlarda theaflavin ve onun türevlerini içerir (265-530 mg theaflavin/ 100 mL taze ağırlık) [14,23].



Şekil 2.6: Flavan-3-ol (D-Kateşin).

2.2.1.7. Proantosiyanidinler

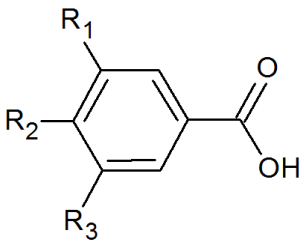
Proantosiyanidinler (yoğunlaşmış tanninler) oligomerik ya da polimerik flavan-3-ollerdir. Bunlar flavanollerin yoğunlaşma ürünleridir. Prosiyanidinler (kateşin veya epikateşin birimleri içeren), prodelfinidinler ((epi)gallokateşin içeren) ve propelargonidinler ((epi)afzeleşinden oluşan) ana proantosiyanidinlerdir. Proantosiyanidinlerce zengin gıda kaynaklarına tarçın, sorgum, fasulye, fındık, çikolata, çilek ve erik örnek verilebilir. Elma ve üzüm de daha az konsantrasyonlarda proantosiyanidin içerir [14,32].

2.3.2. Flavanoid Olmayan Bileşikler

C_6-C_1, C_6-C_3 ve C_6-C_2-C_6 temel yapıları ile flavonoid olmayan fenolik bileşikler üç ana gruptan oluşmaktadır bunlar; fenolik asitler, hidroksisinnamik asitler ve stilbenlerdir.

2.3.2.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler ağırlıklı olarak gallik, hidroksibenzoik, p-protokateşik, ellagik, vanilik ve siringik asitleri içerir. Fenolik asitlerin temel yapısı C_6-C_1' dir.



Benzoik asitler:

Gallik asit $R_1 = R_2 = R_3 = OH$

Protokateşik asit $R_1 = H$, $R_2 = R_3 = OH$

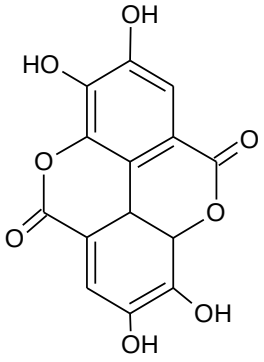
Vanilik asit $R_1 = H$, $R_2 = OH$, $R_3 = OCH_3$

Siringik asit $R_2 = OH$, $R_1 = R_3 = OCH_3$

Şekil 2.7: Fenolik asitlerin temel yapısı [35].

Gallik asit, analjesik (ağrı kesici), antiallerjenik (alerjiye karşı), astıma karşı, antibakteriyel (bakteri yok edici), bronşite karşı, antikanser (kansere karşı), antihepatotoksik (karaciğeri toksinden arındırıcı), antioksidant (serbest radikalleri yok edici), immunostimulant (bağışıklık sistemini güçlendirici), antiviral (mikroplara karşı), antiseptik (doğrudan vücudun mikrop bulaşmış bölgelerine sürülerek dıştan uygulanır ve vücut dokularına fazla zarar vermeden o bölgedeki hastalık yapıcı mikropları öldürür), antinitrosaminik (nitrozamin yok edici), bronş genişletici antipolio (çocuk felçine karşı) insan sağlığı üzerinde büyük öneme sahip çok yönlü bir maddedir. Normal hücrelere zarar vermeden, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik (hücreye toksik şekilde etki edip hücrenin fonksiyonunu durduran) etki gösterir Albüminüri ve diyabet için kullanılır. Sedef ve basur tedavisinden kullanılan bazı kremler içeriğini oluşturur [36]. Gallik asit iç kanamayı durdurarak damarların büzüşmesine yardımcı olur. Hücrelerdeki sinirsel ölümlerin engellenmesinde etkilidir. Lösemi, bazı prostat, akciğer kanser hücrelerine karşı anti kansorojen özelliğe sahiptir. Gallik asit iltihaplı alerjik hastalıklar, astım ve sinüzit için tedavi edici etkiye sahiptir. Enflamasyon ve histamin'i serbest kalmasını engelleme özelliğine sahiptir. Ayrıca akciğer, rahim ve nefrotik kanamaların tedavisinde yararlıdır [37].

Ellagik asit antioksidan, anti-mutajen ve anti-kanser özelliklere sahiptir. Bu bileşik ile ilgili yapılan çalışmalar göğüs, yemek borusu, cilt, bağırsak, prostat ve pankreas kanserlerinde anti-kanser özelliğini göstermiştir. Ellagik asit kansere neden olan moleküllere bağlanarak onları etkisizleştirebilir. Bitkiler ellagik asidi haşeratlardan ve hastalıklardan korunmak için salgılarlar. Ellagik asit ile ilgili literatürde ön çalışmalardan şu sonuçlar ortaya çıkmıştır ki deri, meme, özofagus ve akciğer kanserinde pozitif etkisinin olduğu görülmüştür. Tümör büyümesini engellediği ifade edilmektedir. Laboratuvar hayvanlarında tümör büyümesini yavaşlattığı görülmüştür. Ayrıca antioksidan, antiviral ve anti bakteriyel özelliğe sahiptir. Karaciğerdeki kanda bulunan ve kansere sebep olan yaşayan bir kısım ajanların potansiyelinin azalmasına sebep olur [38]. Ellagik asit, ahududu, çilek ve böğürtlen gibi meyvelerde önemli miktarlarda vardır.

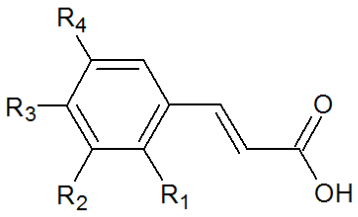


Şekil 2.8: Ellagik asit [39].

Narda bulunan fenolik asitler izomer ya da bağlı formda mevcut olabilir. Nar suyu önemli bir miktarda hidroliz edilebilir tanninler olan ellagitanninler içerir. Ayrıca nar suyunda gallagik asit ve punikalagin izomerleri içerir. Ahududu, tarçın kabuğu, karanfil tomurcuğunda da protokateşik asit içerir. Üzümlerde gallik asit zengin miktarda bulunur ve hidroliz edilebilir tanninlerin bir başka tipi olan gallotanninler oluşur [14,23].

2.3.2.2. Hidroksisinnamik Asitler

En çok bilinen hidroksisinnamik asitler, p-kumarik, kafeik, ferülik, sinapik asit ve koutarik, kadtarik asit gibi asitlerin tartarat esterleridir. Kuinik ve kafeik asitten oluşan klorojenik asit de önemli bir hidroksisinnamik asittir. Bu asit çoğunlukla meyve ve sebzelerin kabuğunda ayrıca bazı bitkiler ve kahve çekirdeklerinde bulunur. Örneğin, yeşil kahve çekirdekleri yüksek miktarda klorojenik asit içerir (1158-2741 mg/ 100 g kuru malzeme) [14].



Hidroksisinnamik asitler:

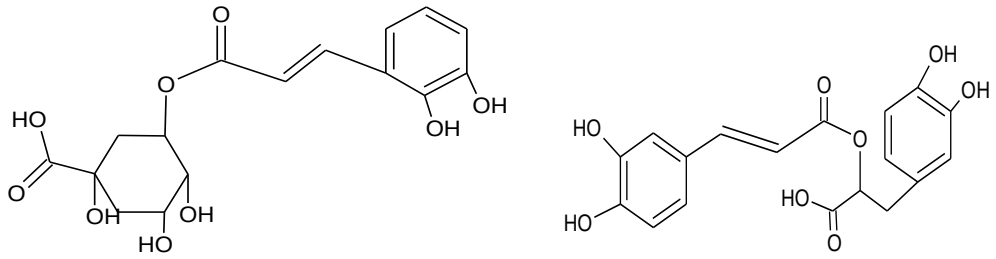
Ferülik asit $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_4 = OCH_3$

P- kumarik asit $R_1 = R_2 = R_4 = H$, $R_3 = OH$

Kafeik asit $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = R_4 = OH$

Şekil 2.9: Hidroksisinnamik asitler [35].

Hidroksisinnamik asitlerin başka bir grubu olan kurkuminoidler zencefil, kakule ve zerdeçalda bulunmaktadır. Kurkumin, zerdaçalda demetoksikurkumin ve bisdemeteoksikurkumin ile birlikte bir hayli bulunur.[23].



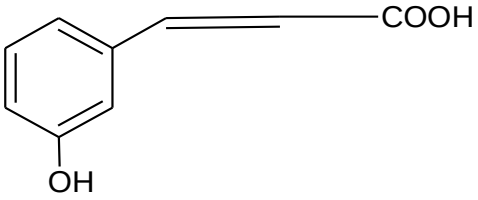
Şekil 2.10: Hidroksisinnamik asit türlerinden klorojenik asit ve rosmarinik asit.

P-kumarik asit ve m-kumarik asit dahil kumarinler, tarçın çubuğu, Çin tarçını ve lavantada çoğunlukla uçucu yağlar olarak mevcuttur. Ayrıca bazı meyve ve yeşil çayda da bulunur [14].

Ayrıca m-kumarik asit, oksidatif bozunumları korumak için serbest radikallerin etkisine karşı koyan bir antioksidanttır. Yapılan bir çalışmada m-kumarik asit içeriğine sahip bileşimi demans oluşturulmuş farelerde hafıza ve öğrenmeyi geliştiren etkiye sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca kalp rahatsızlığı ve kansere karşı koyması için bağışıklık sisteminin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır [40].

2.3.2.3. Stilbenler

Gıdalar çok kısıtlı konsantrasyonlarda stilben içerir. Resveratrol ve onun glikozit türevleri, üzüm ve kırmızı şarap gibi üzüm ürünlerinin tamamında bulunan stilbenlerin ana temsilcisidir [23,14].



Şekil 2.11: m-Kumarik asit [41].

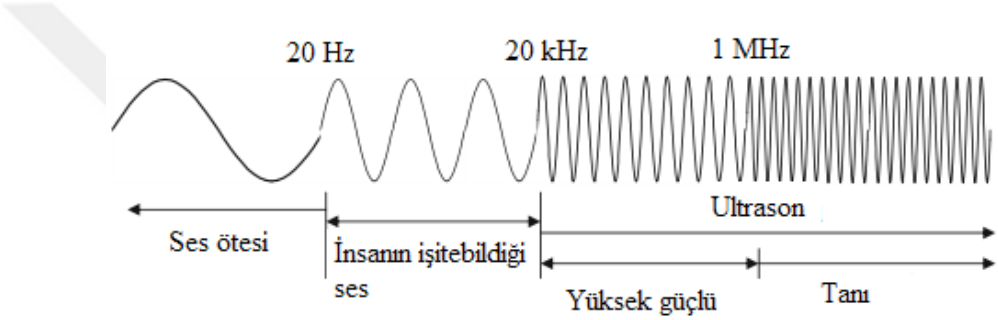
2.4. BİTKİSEL KAYNAKLARDAN FENOLİK MADDELERİN EKSTRAKSİYONU

Bitkisel kaynaklardan fenolik bileşikler gibi maddelerin eldesinde kullanılan geleneksel ekstraksiyon tekniklerinin fazla zaman almaları, yorucu olmaları, düşük seçiciliğe ve düşük verime sahip olmaları, fazla miktarda zehirli çözücüye ihtiyaç duyulması gibi bazı olumsuzlukları vardır [42]. Bunlara ek olarak, klasik çözücü ekstraksiyonu ile yapılan ekstraksiyon sonrasında çözücü uzaklaştırılmak istenirken ekstrakt oksidatif bozulmalara uğramaktadır [43]. Bu nedenlerden dolayı bitkisel kaynaklardan değişik maddelerin

ekstraksiyonunda çevre dostu, kimyasal çözücü tüketimi daha az olan, ekstraksiyon süresinin kısaltılması, ekstraksiyon veriminin artırılması için SAE, UDE, MDE ve hızlandırılmış solvent ekstraksiyonu gibi yeni metodlar geliştirilmiştir [44,45,77].

2.4.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ses dalgası tipleri, frekanslarına göre ayrılırlar (Şekil 2.12). Ultrason, saniyede 20.000'den fazla titreşim gerçekleştiren ses dalgalarıdır. Gıda uygulamalarında kullanılan ultrason 20 kHz'den 1 MHz'ye kadardır. 1 MHz'nin üstündeki ses dalgaları tıpta ve endüstride görüntüleme amacıyla kullanılmaktadır [46].



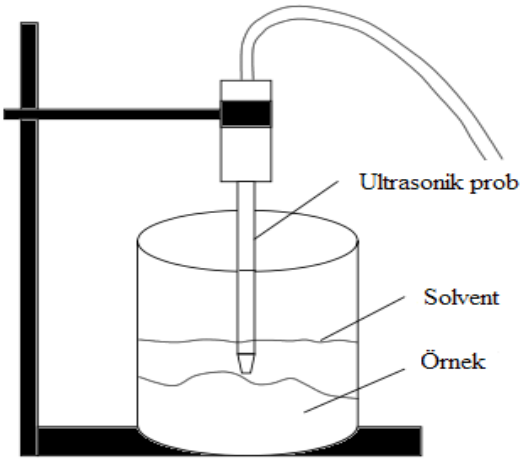
Şekil 2.12: Ses dalgası tipleri [46].

Ultrason, emniyetli, ısısal olmayan, etkili, hücrelerin parçalanması ve ekstrakt üretimi için kullanılabilen bir gıda işleme metodudur. Ayrıca ultrason, düşük sıcaklıklarda da etkin olarak uygulanabildiğinden, sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstrakte edilmesini mümkün kılan bir tekniktir. UDE sistemi; ucuz, basit ve verimli olması nedeniyle geleneksel ekstraksiyon tekniklerine iyi bir alternatiftir. Ultrasonun katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılmasının başlıca nedeni, ekstraksiyon kinetiği ve verim artışıdır. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde uzun sürelere ve büyük miktarlarda çözücüye ihtiyaç duyulmaktadır [44].

Ultrason metodu; ekstrakt eldesinde geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine karşın etkili bir alternatif bir metottur. Ultrasonik uygulama, hücre duvarlarını mekanik olarak parçalar ve madde aktarımı sağlar. Ultrason uygulamasıyla hücre duvarı ortadan kalktığından, bu yöntemle yapılan ekstraksiyon işlemi diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha hızlıdır. Ultrasonik uygulamada, partikül çapının azalması ile katı ve sıvı kısımlar arasındaki yüzey alanı artar [47].

UDE'de ultrasonik banyo ve problu olmak üzere iki tür sistem kullanılır [48]. Problu sistemde enerji direk olarak çözücü ve örnekle temas halindedir ve herhangi bir enerji kaybı söz konusu değildir (Şekil 2.13). Ultrasonik banyo ile ekstraksiyonda ise çözücü ve örnek bir kap içerisinde olduğundan direk olarak ultrasonik ses dalgaları ile temas etmez ve enerjinin bir kısmı bu kap tarafından absorbe edilir [49,77].

Son yıllarda, UDE ile bitkisel kaynaklardan fenolik maddelerin ekstraksiyonuyla ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmına aşağıda yer verilmiştir.



Şekil 2.13: Ultrason destekli ekstraksiyon sistemi [50].

Londoño-Londoño ve diğ. [51], Güney Amerika'da yetişen turunçgillerin (misket limon, portakal ve tangerin) kabuklarını optimize edilmiş sulu UDE uygulaması ile ekstrakte etmişlerdir. Flavonoid içeriğini 40.25± 12.09 mg/ g kabuk gibi yüksek bir verimle elde etmişlerdir. Misket limon, portakal ve tangerin kabuklarından elde edilen ekstraktların optimize edilmiş toplam fenol içeriğini ise sırasıyla şöyle bulmuşlardır: 74.80 ± 1.90, 66.36 ± 0.75 ve 58.68 ± 4.01 mg gallik asit eş değeri (GAE)/ g kabuk. Elde edilen ekstraktlarda bulunan flavonoid gruplarının kompozisyonlarını HPLC/MS metodu ile analiz etmişlerdir.

Ma ve diğ. [9], mandalina (*Citrus unshiu* Marc) kabuklarından fenolik maddelerin eldesinde ultrasonun ekstraksiyon verimine etkisini incelemişlerdir. UDE için 60 kHz frekanslı ultrasonik banyo kullanmışlar ve % 80 metil alkol çözeltisiyle farklı sıcaklık (15, 30 ve 40 ºC) ve sürede (10, 20, 30, 40, 50 ve 60 dakika) ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Bunun dışında, 15ºC sıcaklık ve 20 dakika süreyi sabit tutarak ultrasonik banyonun gücünü 3.2, 8, 30 ve 56 Watt'a ayarlamış ve gücün ekstraksiyon verimi üzerine etkisini araştırmışlardır.

Ultrasonik ekstraksiyon dışında, % 80 metil alkol çözeltisi ile 40ºC'de 1 ve 8 saat süreyle klasik çözücü ekstraksiyonda yapmışlardır. Sonuçları karşılaştırdıklarında, mandalina kabuklarından fenolik maddelerin ekstraksiyonunda UDE'nin klasik çözücü ekstraksiyonuna göre daha etkili olduğunu görmüşlerdir. Ayrıca, ultrasonik gücün artırılmasının ekstraksiyon verimine olumlu etki yaptığını da kaydetmişlerdir.

Şahin ve Şamlı [52], tarım ve sanayide atık olarak çıkan zeytin ağacı yapraklarını UDE metodu ile ekstrakte etmişler ve polifenol içeriğini incelemişlerdir. Çözücü konsantrasyonu (0-%100 etanol (EtOH), v/v), katı/çözücü oranı (25-50 mg/mL) ve ekstraksiyon süresi (20-60 dk) gibi ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinde optimum koşulları belirlemek için YYM yöntemini kullanmışlardır. İkinci dereceden polinom modeli deneysel veriler için ikna edici açıklama vermiştir. Optimum koşullarda (500 mg kuru yaprak/10 mL çözücü, 60 dakika ve %50 EtOH) incelenen bağımsız değişken için maksimum sonuçlar, ekstraksiyon verimi için 201.2158 (mg ekstrakt/g kuru yaprak), TPM içeriği 25.0626 mg (GAE/g kuru yaprak) ve %95.5610 DPPH olarak elde etmişlerdir. Sonuçlara göre, zeytin yaprağından fenolik maddelerin UDE ile çözücü konsantrasonunun en önemli bağımsız değişken olduğunu elde etmişlerdir.

Virot ve diğ. [53], elma posasından fenolik maddelerin ekstrakte etmişlerdir. Çalışmada UDE uygulaması ile klasik ekstraksiyona oranla % 20'den fazla verim artışı sağlandığını tespit etmişlerdir.

Zeynep ve diğ. [54], çalışmada UDE metodu ile kuşburnu çayından ekstrakt elde etmişlerdir ve polifenol içeriğini incelemişlerdir. Ekstraksiyon süresi (30-90 dakika), sıcaklık (30-50 ºC) ve çözücü konsantrasyonu (40-100 % EtOH, v/v) gibi ekstraksiyon değişkenlerinde optimum koşulları belirlemek için YYM yöntemini kullanmışlardır. Optimum koşullarda (%40 EtOH, 81.23 dakika, 50ºC), deneysel veriler için elde edilen ikinci dereceden polinom modeli oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Ve optimum koşullar için elde edilen polifenol içeriği 47.23 (mg GAE/kuru kuşburnu çayı) olarak bulmuşlardır. Çalışmada kuşburnu çayı ekstrakt verimini tüm değişkenlerin etkilediğini saptamışlardır. Ancak çözücü konsantrasyonu ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli bağımsız değişken olarak tespit etmişlerdir.

Wang ve diğ. [55], UDE ile buğday kepeğinden fenolik maddeleri ekstrakte etmiş ve bu tekniğin, ekstraksiyon hızını ve kalitesini artırdığını belirlemişlerdir. Yapılan optimizasyonla

en yüksek verim %64 etil alkol kullanılarak 60ºC'de 20 dakika süreyle gerçekleştirilen ultrasonik ekstraksiyonda elde etmişlerdir.

2.4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

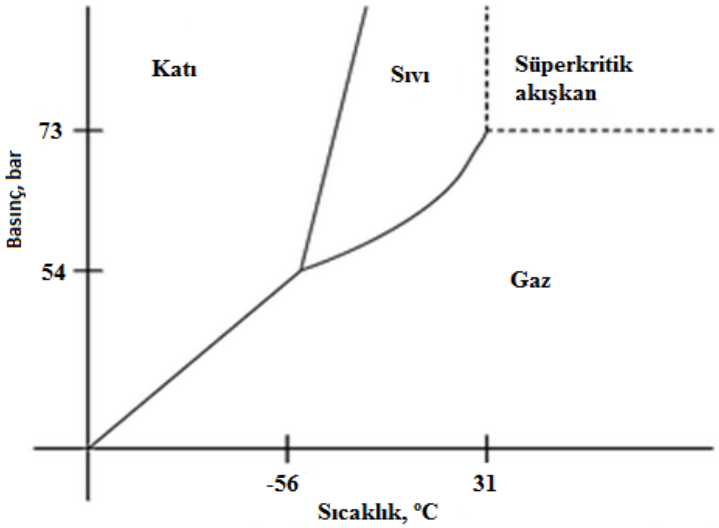
Bir maddenin katı, sıvı ve gaz olmak üzere üç hali bulunmaktadır. Maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_k), basıncı ise kritik basıncının (P_k) üzerine çıkartıldığında yeni bir bölge ortaya çıkar, bu bölge süperkritik bölge, bu bölgedeki akışkan ise süperkritik akışkan olarak tanımlanır (Şekil 2.14) [56]. Kritik sıcaklık (T_k); bir akışkanın sıvı hale getirilebildiği maksimum sıcaklık, kritik basınç (P_k) ise bu noktadaki basınçtır. Süperkritik akışkan, sıcaklığı ve basıncı kendi P_k'nın üstünde olan, gaza benzeyen, içinde bulunduğu kabı doldurup onun şeklini alan ve sıkıştırılabilen özellik gösterir [57].

Karbondioksit (T_k=31.1ºC, P_k=72 bar), SAE'de en çok kullanılan çözücüdür. CO_2 kullanılarak gerçekleştirilen SAE'nin doğal maddelerden ekstraksiyon için kullanılması büyük ilgi çekmiş ve değişik yönleriyle incelenmiştir. CO_2'nin T_k ve P_k'nın diğer çözücülere göre nispeten düşüktür (Tablo 2.5). Süperkritik CO_2 inert, toksik olmayan, çevreye zararlı olmayan ve düşük sıcaklık ve nispeten düşük basınçlarda, yüksek seçicilikte ve kısa sürede ekstraksiyon yapılmasına olanak sağlayan bir maddedir [1]. Ekstraksiyondan sonra CO_2 yüksek uçuculuğu sayesinde kolaylıkla ekstrakttan ayrılır [43].

Diğer ticari organik çözücülerle karşılaştırıldığında süperkritik akışkanlar daha yüksek yayınırlık ve daha düşük yoğunluk, viskozite ve yüzey gerilimine sahiptir (Tablo 2.4). Ayrıca süperkritik akışkanların özellikleri çalışma koşulları değiştirilerek istenilen şartlara getirilebilir [43].

Tablo 2.4: Gaz, süperkritik akışkan ve sıvıların fiziksel özellikleri [50].

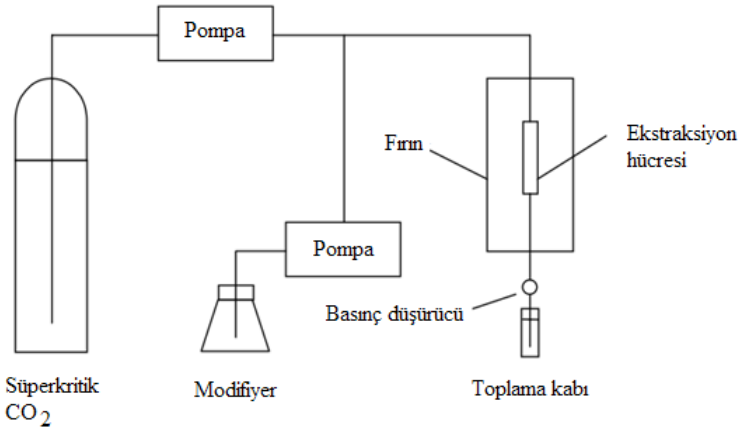
Faz	**Koşullar**	**Yoğunluk**	**Vizkozite**	**Yayınırlık katsayısı**
		10^3 kg/m^3	**mPa.s**	**10^4 m^2/s**
Gaz	30ºC, 1 atm	0.6-2x10^3	1-3x10^2	0.1-0.4
Süperkritik	T_k, P_k	0.2-0.5	1-3x10^{-2}	0.7x10^{-3}
Akışkan	T_k, P_k	0.4-0.9	3-9x10^{-2}	0.2x10^{-3}
Sıvı	30ºC, 1 atm	0.6-1.6	0.2^{-3}	0.2-2x10^{-3}



Şekil 2.14: Karbondioksitin sıcaklık-basınç faz diyagramı [57].

SAE sisteminin temel bileşenleri; CO_2 tüpü, yüksek-basınç pompası, ekstraksiyon hücresi, ısıtıcı, çıkış vanası ve ekstrakt toplama kabından oluşur (Şekil 2.15) [59]. Sistemde genellikle piston veya şırınga pompalar kullanılır. Şırınga pompalar titreşimlerin gözlenmediği daha düzgün basınç kontrolünün yanı sıra yüksek akış hızı ve daha doğru hacimsel taşınım sağlamaktadır [50]. Ekstraksiyon hücresi genellikle paslanmaz çelikten 30-250 ºC arasında sıcaklık kontrolü yapılabilen 10.000 psi basınca dayanıklı olarak üretilmektedir [59].

SAE, dinamik ve statik olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir. Dinamik ekstraksiyonda, ekstraksiyon hücresi ile çıkış vanası arasındaki musluk açıktır. Statik ekstraksiyonda ise, ekstraksiyon hücresi ile çıkışı arasındaki musluk kapalıdır ve ekstraksiyon hücresi, statik şartlarda istenen basınca getirildikten sonra, bu musluk açılır ve ekstraksiyon hücresindeki çözelti toplama kabında toplanır [58,60].



Şekil 2.15: Süperkritik akışkan ekstraktörünün şematik gösterimi [50].

SAE'de, CO_2 en çok kullanılan akışkandır. [58]. Yardımcı çözücü kullanımı karışım içerisindeki bileşenin seçiciliğini arttırır. Çoğu zaman çok az miktarlarda kullanılan yardımcı çözücü ilavesi ekstraksiyon verimini yükseltmekte ve ekstraksiyon süresini kısaltmaktadır. Yardımcı çözücülerin seçimi ve kullanılacak miktarının ayarlanması süperkritik akışkanın özelliklerini kolayca değiştirebilmektedir [61]. Sık kullanılan yardımcı çözücüler arasında, özellikle etanol, metanol gibi alkoller, klorlanmış hidrokarbonlar, hekzan, su, aseton, asetonitril ve formik asit yer almaktadır [56].

Tablo 2.5: Süperkritik akışkan olarak kullanılan bazı çözücülerin özellikleri.

Çözücü	**Tk (°C)**	**Pk (bar)**	**ρ_k (g/mL)**
Karbondioksit	31.1	72	0.47
Azotdioksit	158	98.7	0.27
Amonyak	132.5	109.8	0.23
Su	374.2	214.8	0.32
Helyum	-268	2.2	0.07
Hidrojen	-240	12.6	0.03
Ksenon	17	56.9	1.11
Metan	-82	46	0.169
Etan	32.3	47.6	0.2
n-Hekzan	234.2	28.9	0.23
Benzen	288.9	98.7	0.302
Toluen	319	41.1	0.292
Metanol	239	78.9	0.27
Etanol	243.4	72	0.276
İzopropil alkol	235.3	47.6	0.273
Dietileter	193.6	63.8	0.267
Aseton	235	47	0.279
Asetonitril	275	47	0.25

Tablo 2.6: Etil alkol ilavesiyle CO_2' nin kritik özelliklerinde meydana gelen değişim [62].

Etil alkol konsantrasyonu (%)	T_k (°C)	P_k (MPa)
0	31.1	7.38
5	42.5	7.32
10	53.7	7.27
15	64.9	7.21
20	76.1	7.15
100	243.3	6.13

SAE'de metot geliştirme aşamasında; ekstraksiyon süresi, süperkritik akışkanın sıcaklığı ve basıncı, yardımcı çözücü kullanımı ayrıca ekstraktın toplanma şekli (boş toplama kabı ya da sıvı tuzak ile) çok önemlidir [63,77].

Günümüze kadar, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonuyla farklı kaynaklardan fenolik maddeler elde edilmiştir. Bu çalışmalara kısaca göz atacak olursak;

Kırbaşlar ve diğ. [64], klementin meyvesinin kabuklarını soğuk presleme ve SAE metodu ile ekstrakte etmişlerdir. Uçucu yağ içeren ekstraktların kimyasal kompozisyonlarını GC ve GC/MS kullanarak analiz etmişlerdir. Her iki yöntemle de elde edilen ekstraktlardaki tüm uçucu yağlarda toplamda 69 adet bileşen olduğu %99.8 doğrulukta belirlenmiştir. Soğuk presleme ekstraksionu %3.7 oksijenlenmiş bileşen, SAE yöntemi ile %4.2 oksijenlenmiş bileşenler olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca ekstraktlardaki %2.09-2.10 gibi bir oranla baskın olarak karbonilleri, % 1.32-1.60'la alkoller ve %0.12-0.40 ile esterler izlemiştir. Ana bileşen limonen yüzdesi %88.12-89.28 arasında değişirken %4.64-3.77 ile myrcene ardından gelmiştir. Oksijenlenmiş bileşenlerde yüksek seviyelerde %1.02-1.24 linalool ve %0.71–0.72 dekanal olduğunu belirtmişlerdir.

Abbasi ve diğ. [65], nar çekirdeklerinden farklı yardımcı çözücüler kullanarak değişik sıcaklık ve basınç koşullarında SAE ile fenolik maddeleri elde etmişlerdir. Saptadıkları sonuçları diğer ekstraksiyon metodları (mikrodalga, klasik ekstraksiyon, ultasonik ekstraksiyon, sokslet ekstraksiyonu) ile karşılaştırılmışlardır. SAE'nin diğer yöntemlere göre daha verimli olduğu saptamışlardır. Diğer ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan farklı organik çözücülerin (benzen ve hekzan) ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarında önemli bir değişiklik

meydana getirmediğin bildirmişlerdir. MDE'de gücün ve UDE'de ses dalgalarının artırılmasının ekstraksiyon verimini etkilemediğini tespit ederek, bunun nedenini polar karakterdeki fenolik maddelerin polar olmayan çözücülerde yeteri kadar çözünememesine dayandırmışlardır. SAE'de basıncın artırılması ekstraksiyon verimini olumsuz etkilediğini gözlemlemişlerdir.

SAE'de basıncın artırılması çözücünün yoğunluğunu ve çözme gücünü artırdığını, ancak basıncın artırılmasıyla çözücünün polar yapısının değişmesi nedeniyle verim düştüğünü bildirmişlerdir. Sıcaklığın artırılması ile özücünün yoğunluğu ve çözme gücü azaldığı, ayrıca artan sıcaklığın fenolik maddelerin yapısını bozması sonucu ekstakte edilen fenolik madde miktarında düşüş olduğunu kaydetmişlerdir. Yardımcı çözücü olarak su kullanılan ekstraksiyonlarda diğer yardımcıların kullanıldığı ekstraksiyonlara (etanol ve hekzan) göre daha yüksek verim elde etmişlerdir. Yardımcı çözücü miktarının artırılması ekstraksiyon verimini olumsuz etkilemiştir. SAE koşullarının değiştirilmesi ile 7.8-72.1 mg/g fenolik madde elde edilmiştir. En yüksek verim ise 200 atm basınç, 40ºC sıcaklık ve yardımcı çözücü kullanılmadan gerçekleştirilen ekstraksiyondan sağlanmıştır.

Şahin ve diğ. [66], Türkiye'de yetişen üç farklı zeytin ağacı yapraklarını sokslet ve SAE yöntemiyle ekstrakte ederek ekstraktların fenolik maddelerini ve oleuropein miktarını incelemişlerdir. Soxhlet ekstraksiyon metodunda farklı çözücülerin (EtOH, MeOH ve MeOH/EtOH (3:2 v/v) ekstraksiyon performansına etkisini incelemişlerdir. SAE'de ise basınç (100-300 bar), sıcaklık (50 ve 100ºC) ve hacimce %20 yardımcı çözücüler (EtOH, MeOH ve su) kullanarak ekstraktraksiyon yaparak ekstrakt ve oleuropein miktarına etkisini incelemişlerdir. Her iki ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktları LC, ESI, MS/MS metotlarıyla kalitatif olarak analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda, metanol ile yapılan Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda en yüksek oleuropein verimi 37.84 mg/g kuru yaprak olarak elde edilirken, yardımcı çözücü olarak metanol ve akışkan olarak CO_2 kullanılarak 300 bar ve 100ºC'de süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde edilen en iyi oleuropein verimi 14.26 mg/g kuru yaprak olarak bulmuşlardır.

Gelmez ve diğ. [67], fırınlanmış buğdaydan SAE ile fenolik maddelerin eldesinin YYM'ne göre optimizasyonunu yapmışlar, bağımsız değişkenler olarak basıncı (148-602 bar) sıcaklığı (40-60ºC) ve süreyi (10-60 dakika) seçmişlerdir. Yanıt olarak ise ekstraksiyon verimi, TPM miktarı, toplam tokoferol miktarı ve antioksidan aktiviteyi belirlemişlerdir. Optimum

ekstraksiyon şartlarını 336 bar, 58ºC ve 10 dakika, bu koşullardaki ekstraksiyon verimi %5.3, TPM miktarı 6 mg/g, tokoferol miktarı 6.7 mg/g ve antioksidan aktivite 57.3 mg indirgenmiş DPPH/g ekstrakt olarak tespit etmişlerdir.

Ghafoor ve diğ. [68], üzüm kabuklarından SAE ile fenolik maddelerin eldesinin YYM'ye göre optimizasyonunu yapmışlardır. Bağımsız değişken olarak sıcaklığı (37-46ºC), basıncı (140-170 kg/cm^2) ve yardımcı çözücü konsantrasyonunu (%5-8) çalışmışlardır. Ekstraksiyon verimi, TPM miktarı, antioksidan aktivite ve toplam antosiyanin miktarını yanıt olarak almışlardır. Çalışma sonucunda, sıcaklık ve basıncı bütün yanıtlar için istatistiksel olarak önemli bulurken, optimum ekstraksiyon koşullarını 45–46°C sıcaklık, 160–165 kg/cm^2 basınç ve %6–7 etil alkol (yardımcı çözücü olarak) şeklinde bildirmişlerdir. Bu koşullarda ekstraksiyon verimini %12.31, TPM 2.156 mg/100 mL, toplam antosiyanin miktarını ise 1.176 mg/mL olarak belirlemişlerdir.

Şahin ve Bilgin [69], zeytin yapraklarından SAE ile elde edilen ekstraktların fenolik maddelerini ve oleuropein içeriğini incelemişlerdir. Süperkritik akışkan olarak CO_2, yardımcı çözücü olarak su ve EtOH kullanmışlardır. Ekstraksiyon değişkenleri, yardımcı çözücü akış hızı (0-1 mL/dk), sıcaklık (50 ve 100°C) ve basınç (100-300 bar) olarak belirlemişlerdir ve elde edilen ekstraktların TPM ve oleuropein içeriği analizlerini LC, ESI, MS/MS metotlarıyla kantitatif olarak belirlemişlerdir. Sonuçta, süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemi tek başına yeterli sonuçlar vermemiştir. Bu nedenle ekstraksiyon verimi ve seçiciliğini artırmak için süperkritik akışkan olarak polar bir akışkan seçilmesi gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca CO_2 modifiyeli ve su ve EtOH yardımcı çözücüler ile yapılan ekstraksiyondan elde edilen ekstraktların TPM içerikleri neredeyse aynı bulunurken, yüksek oleuropein verimi içi yardımcı çözücü olarak su kullanmak gerektiğini gözlemlemişlerdir.

2.4.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

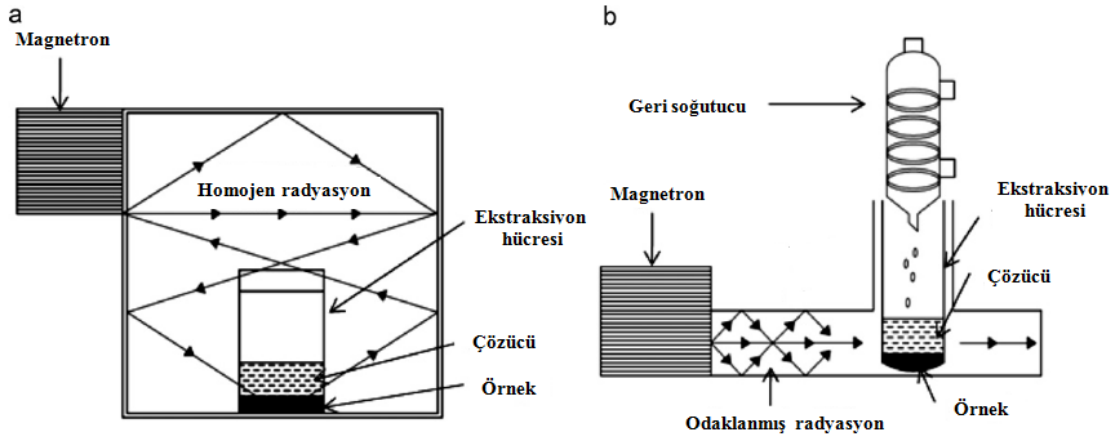
Mikrodalgalar, dalga boyları 1.0 m ile 1.0 mm arasında olup, frekansı 300 MHz ve 300 GHz arasında değişen elektromanyetik ışımalardır. Elektromanyetik spektrumda radyo frekansı ile kızılötesi bölgenin arasında yer almaktadır .

Mikrodalganın ısıtma mekanizması geleneksel ısıtmaya göre farklıdır. Geleneksel ısıtmada ısı enerjisi kondüksiyon ve konveksiyon yolu ile iletilirken, mikrodalga enerjisi iyonik kondüksiyon ve dipol rotasyonu ile ısı enerjisine dönüşür. İyonik kondüksiyon, bir

elektromanyetik alanda çözücüdeki iyonların hareketidir. İyonlar polarite değişimi ile hareket eder ve çarpışır ve bu çarpışma sonrasında ısı enerjisi oluşur. Dipol rotasyonu ise dipol momentli moleküllerin mikrodalga radyasyonu altında, dönme hareketi sonucu uygulanan alanla aynı hizaya gelmesidir. Bu dönme hareketi sonucu oluşan sürtünme ile ısı enerjisi açığa çıkar. Dipol momenti fazla olan bir molekül mikrodalga alanda daha kuvvetli bir salınım gerçekleştirir [50].

MDE metodu, çözücü içerisine ısıyı hızlı, etkili ve homojen bir şekilde iletir. Bitkisel materyaldeki su mikrodalga enerjisini absorbe eder, hücre süper ısınma etkisi ile parçalanır ve çözücünün hücre içerisinden istenilen maddeyi ayırması kolaylaştırılır. [44].

MDE'de kapalı ve açık olmak üzere iki tür sistem kullanılır (Şekil 2.16). Kapalı sistemde kontrollü sıcaklık ve basınç koşullarında ekstraksiyon gerçekleştirilir. Açık sistem de ise atmosfer basınç altında çalışır. Ekstraksiyon hücresi bir geri soğutucu ünitesine bağlıdır ve buharlaşan çözücü burada tekrar yoğunlaşarak ekstraksiyon hücresine geri döner. Açık sistem sıcaklığa duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunda daha uygundur [71,77].



Şekil 2.16: Mikrodalga destekli ekstraksiyon sisteminin şematik görünümü (a. Kapalı sistem, b. Açık sistem) [71].

MDE ile fenolik maddelerin ekstraksiyonu konusunda birçok çalışma yapılmıştır.

Hayat ve diğ. [72], mandalina kabuklarından kapalı sistem MDE cihazı ile fenolik asitlerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişler ve optimum ekstraksiyon koşullarını belirlemişlerdir. Ayrıca, UDE ve klasik çözücü ekstraksiyonu ile de ekstraksiyon gerçekleştirilmiş, değişik yöntemlerle antioksidan aktivitelerini belirlemişler ve yöntemleri kıyaslamışlardır. MDE, diğer yöntemlere kıyasla, kısa süre, daha az çözücü tüketimi, yüksek ekstraksiyon verimi ve

yüksek antioksidan aktivite değerleri göstermiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarını ise 152 W mikrodalga gücü, 49 s ekstraksiyon süresi, çözücü/katı madde oranı 16/1 ve %66 MeOH konsantrasyonu olarak belirlemişlerdir.

Li ve diğ. [73], kapalı sistem MDE ile domatesten fenolik maddelerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmişler, optimum ekstraksiyon koşullarını belirlemişler ve TPM miktarı ve antioksidan aktiviteyi klasik çözücü ekstraksiyonu ile karşılaştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, MDE ile elde edilen ekstraktların, hem TPM miktarı hem de antioksidan aktivitesini klasik çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen ekstraktlardan daha yüksek bulmuşlardır. Optimum ekstraksiyon koşullarını ise FRAP için 96.5ºC, 2.06 dakika ve %66.2 EtOH çözeltisi; ORAC için ise 96.5ºC 1.66 dakika ve % 61.1 EtOH çözeltisi olarak belirlemişlerdir.

Şahin [74], açık sistem çözücü içermeyen MDE ile mandalina yapraklarından polifenoller ve flavonoid kapasitelerini incelemiştir. Bu çalışmada ekstraksiyon süresi (30-90 saniye), mikrodalga gücü (250-350 W) ve katı malzeme (2.5-7.5 g) bağımsız değişkenler seçilerek ekstraksiyon sürecini optimize etmek için YYM yöntemleri ile Yüzey Merkezi Kompozit Tasarım (Face Central Composite Design-FCCD) modeli kullanmıştır. Ekstraksiyon için optimum koşullar, 53.155 s ekstraksiyon süresi, 339.190 W mikrodalga gücü ve 2.500 g katı malzeme olarak bulunmuştur. Optimum koşullar altında 0.8610 mg-GAE/g-DL toplam fenol içeriği ve 0.2440 mg-KE (kateşin eşdeğeri) /g-DL TFM içeriği ekstrakte edilmiştir. Ektraktların antioksidan aktivitesi CUPRAC, DPPH ve ABTS yöntemleriyle incelenmiştir ve TEAK cinsinden ifade edilmiştir. Ekstraktların CUPRAC değerleri TPM ve TFM içerikleri ile son derece ilişkili bulunurken, DPPH ve ABTS değerleri ile oldukça az ilişkili cevaplar verdiğini belirlemiştir.

Liazid ve diğ. [75], kapalı sistem MDE ile üzüm kabuklarından antosiyaninleri ekstrakte etmişler, optimum ekstraksiyon koşullarını belirlemişler ve klasik çözücü ekstraksiyonu ile karşılaştırmışlardır. Optimum ekstraksiyon koşulları, 100ºC ekstraksiyon sıcaklığı, 500 Watt mikrodalga gücün, 25 mL çözücü, çözücü oranı %40 MeOH ve 5 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Klasik çözücü ekstraksiyonu ise MeOH:formik asit (95:5 v/v) karışımı kullanılarak 5 saatte gerçekleştirilmiştir. Belirlenen optimum koşullardaki MDE ile 1857.9 mg/kg toplam antosiyanin ekstrakte edilirken, klasik çözücü ekstraksiyonu ile 1545.9 mg/kg toplam antosiyanin ekstrakte edilmiştir.

Ballard ve diğ. [76], yerfıstığı kabuklarını MDE yöntemiyle ekstrakte etmişlerdir. Yerfıstığı kabuğu ekstraktlarında bulunan toplam fenol içeriği, ORAC seviyesi ve resveratrol içeriğine mikrodalga gücü (%10, %50, %90), ışınlanma süresi (30, 90, 150 s) ve kabuk kütlesinin (1.5, 2.5, 3.5 g) etkisini araştırmışlardır. Yerfıstığı kabukları 37.5 mL %30 EtOH ile ekstrakte edilmiş ve YYM ile optimum ekstraksiyon koşullarında TPM, ORAC seviyesi ve resveratrol içeriği tahmin edilmek için uygulamışlardır. Optimum koşullar altında (%90 mikrodalga gücü, 30 s ışınlanma süresi ve 1.5 g kabuk), tahmin edilmiş maksimum TPM içeriği 143.6 mg-GAE/g kabuk olarak bulunmuştur. %90 mikrodalga gücü, 150 s ve 1.5 g kabuk koşullarında ORAC değeri 2789 μmol TEAK/g kabuk olarak bulunmuştur. Ayrıca yerfıstığı ekstraktındaki resveratrol içeriğini LC/MS/MS ile analiz etmişlerdir.

2.4.4. Yanıt Yüzey Metodolojisi

Optimizasyon, prosesin belirlenen yanıtlar doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin yanıta olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemidir. Herhangi bir optimizasyon prosedürü, genellikle hedef fonksiyonu adı verilen önceden tanımlanmış kriterleri maksimize veya minimize etmek için bağımsız değişkenleri adı verilen belirlenen koşulların değiştirilmesini içerir [78].

YYM, Box ve Wilson [79] tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. YYM, çeşitli bağımsız değişkenlerin söz konusu olduğu bir fonksiyonun çıktı değerinin optimize edilmesi için uygulanan bir seri deney yöntemidir. Optimum noktaya ulaşmak için maksimum artış veya düşüşün olduğu yönde hareket edilmesi temel yaklaşımdır [80].

Genel olarak YYM; proses veya ürün için önemli olan kritik faktörlerin belirlenmesi, test edilecek faktörlerin seviye aralıklarının belirlenmesi, deney tasarımının, spesifik test örneklerinin belirlenmesi, denemelerin yapılması ve denemelerden elde edilen verilerin YYM ile incelenmesi, grafiklerin çizilmesidir. Lineer regresyon analizi, bağımlı değişken ile bir veya daha fazla bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi fonksiyonel olarak inceleyen istatistiksel bir tekniktir. Polinomiyal modeller gibi lineer olan herhangi bir model, oluşturduğu yanıt yüzeyin şekli ne olursa olsun lineer regresyon modelidir. 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. Bu amaçla, varyasyon katsayısının (C.V) hesaplanması, regresyon analizine hipotez testlerinin uygulanması, hipotez testlerinin regresyon katsayılarına bireysel olarak uygulanması, regresyon katsayısının (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısının belirlenmesi, model uygunsuzluğunun test edilmesi (lack of fit testi) ve kalıntı analizi gibi farklı test yöntemleri uygulanmaktadır [77,78].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEMELER

3.1.1. Bitki Materyali

Ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan mandalina ağacı meyvesi ve yaprakları Akdeniz Bölgesi' nin Antalya ilçesinde bulunan Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Endüstrisinden (BATEM) 2013 yılının Ekim ayında temin edilmiştir. Faydalanılan mandalina ağacı türü *Citrus deliciosa* Tenore' dir. Elde edilen kabuklar ve yapraklar kuru ve karanlık ortam koşullarında kurutulmuştur.

3.1.2. Kimyasallar ve Reaktifler

Etanol ve metanol Merck firmasından sağlanmıştır ve her biri sırasıyla > % 99.5, > % 99.8 saflıktadırlar. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•), 2,2′-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (trolox), 2,9-dimetil-1,10,fenantrolin (neokuproin), folin-ciocalteu reaktifi, (+)- kateşin, sodyum karbonat, gallik asit, hidroklorik asit ve sodium hidroksit Sigma Aldrich firmasından sağlanmıştır. Potasyum persülfat, sodyum nitrit ve aluminyum klorür de Merck firmasından sağlanmıştır. Millipore Milli-Q su saflaştırma sisteminden 8 mΩ destile su analizler için hazırlanan karışımlarda kullanılmıştır.

3.1.3. Deney Düzeneğinde Kullanılan Ekipman ve Cihazlar

- Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu Cihazı (Applied Seperations SFE-2)
- Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Cihazı (Milestone, Neos-GR)
- Ultrases Destekli Ekstraksiyon Cihazı (Vibra Cell, Model VCX 750, CT, USA, 20 kHz ve 125 Watt)
- UV-Vis Spektrofotometresi (UV-Vis Lambda 35)
- Santrifüj (Nüve, CN180)
- Hassas terazi (Mettler Toledo, MS204S)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Örneklerin Ekstraksiyona Hazırlanması

Kurutulan *Citrus deliciosa* Tenore türü mandalina kabuk ve yaprakları ev tipi öğütme robotu ile 0.9-2.0 mm boyutlarında öğütülmüş (Moulinex masterchef 750 duotronic) ve elekten geçirilmiştir. Öğütülmüş örnekler kullanıma kadar laboratuvarda -18ºC'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.2. Deneysel Tasarım

YYM; deney tasarımı, model denklerimin oluşturulması ve optimizasyon olmak üzere temelde 3 aşamadan oluşur.

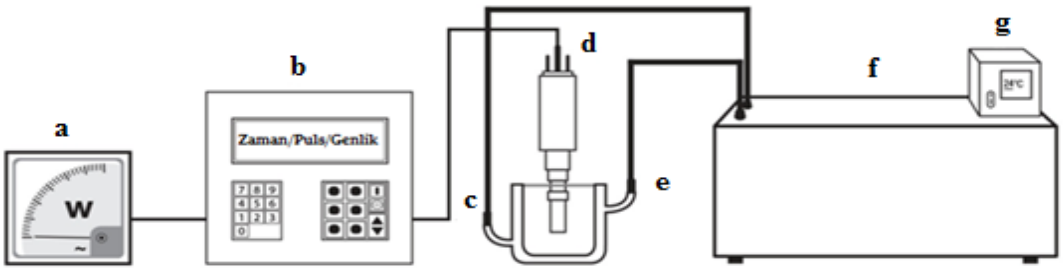
Optimizasyon için UDE, SAE ve MDE da daha önce yapılan çalışmalardan faydalanılarak bağımsız değişkenler seçilmiş ve her bir ekstraksiyon yöntemi için deney tasarımları oluşturulmuştur. Deneysel yanıtları maksimize etmek için, üç değişkenli ve üç seviyeli YYM yöntemlerinden FCCD modeli uygulanmıştır. FCCD modelinde 2^3 faktöriyel bir tasarımda tüm değişkenlerin orta değerlerinin alındığı merkez noktada 6 tekrarla birlikte toplamda 20 adet deney noktası içermektedir.

3.2.3. Fenolik Maddelerin Farklı Yöntemlerle Ekstraksiyonu

3.2.3.1. Ultrason destekli ekstraksiyon

Fenolik maddelerin UDE ultrasonik parçalayıcı (Vibra Cell, Model VCX 750, CT, USA, 20 kHz ve 125 Watt) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). 0.5 gram öğütülmüş örnek, içerisinde 40 mL çözücü (su ve MeOH) bulunan 50 mL hacminde ceketli bir hücreye konulmuştur. Ceket içerisinden 13 L/dk akış hızında 10ºC glikol sirküle edilirken 13 mm çapında 125 Watt ultrasonik işlemcili prob ile 60 dakika ekstraksiyon yapılmıştır. Örnekler 20 kHz titreşim modunda sabit frekansta ekstrakte edilmiştir. Titreşim süresi ve titreşim aralığında sonikatörün "açık" ve "kapalı" zamanından yararlanılır. Prob dalma derinliği, titreşim genliği ve titreşim süresi olmak üzere bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Uygulanan prob dalma derinlikleri 5, 5.5 ve 6 cm, titreşim genlikleri %20, 40 ve 60, titreşim süreleri (açık/kapalı) 2:2, 3:3 ve 4:4 saniye olmak üzere 20 ayrı deney noktasında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri mandalina kabuk ve yaprakları için çözücü olarak su ve metanol

kullanılarak tekrarlanmıştır. Elde edilen ekstraktlar 5000 rpm de 25 dakika santrifüj (Nüve, CN 180) edilmiştir. Santrifüjden sonra, süzüntü 0.45 µm şırınga filtresi ile filtrelenmiş ve biyokimyasal ölçümler için analiz edilene kadar -18°C'de saklanmıştır.



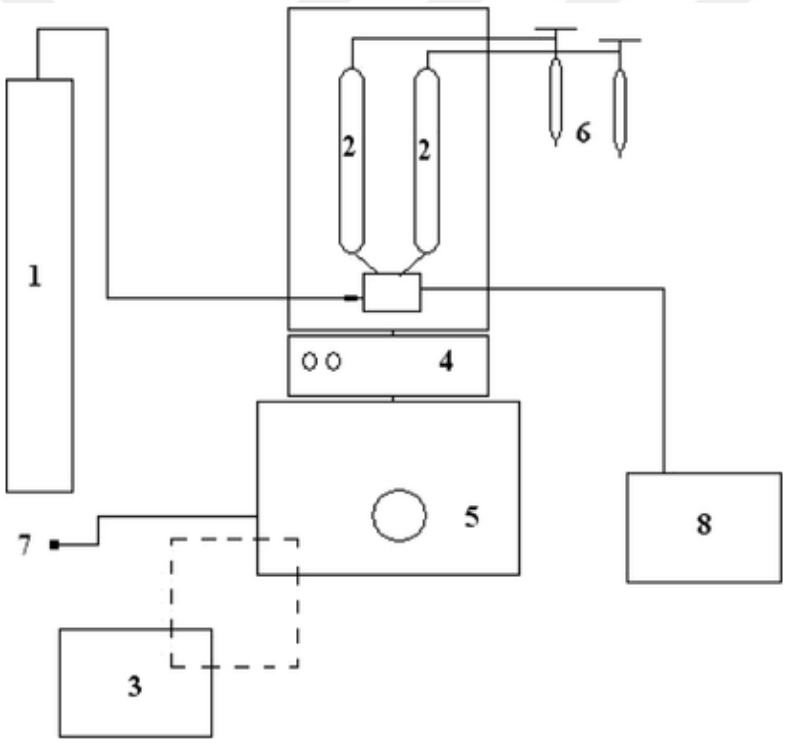
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan ultrason destekli ekstraksiyon cihazının şematik gösterimi (a- Güç kaynağı, b- Ultrasonik ayarlayıcı, c- Soğutma sıvısı hücre girişi, d- Ultrasonik prob, e- Soğutma sıvısı hücre çıkışı, f- Soğutucu sistem, g- Soğutucu sistem ayarlayıcısı).

3.2.3.2. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu

Mandalina yapraklarından fenolik maddelerin süperkritik akışkan ile ekstraksiyonunda kullanılan sistem (Spe-ed SFE-2 7070, Applied Separations Inc., ABD) Şekil 3.2'de görülmektedir. Ekstraksiyon 25 mL paslanmaz çelikten yapılmış bir kapta gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sistemi aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir: Ekstraksiyon kabının bir ucuna sırasıyla frit, hydromatrix ve bir parça polipropilen yün konulup kapatılarak sıkıştırılmıştır. Ardından 5 gram mandalina yaprağı ile doldurulmuş ve yukarıdaki aynı işlem kabın diğer ucu için yapılarak kapatılmıştır. Son olarak reaktör fırın içerisine konulmuştur. Sıvı CO_2 silindirik derin bir tüpten sağlanırken, 680 bar basınçta sıkıştırılmış CO_2 pompaya ulaşması için 0°C'ye ayarlanmış sirkülasyon banyosu ile sağlanmıştır. Kontrol sistemi vasıtasıyla ayarlanan fırın sıcaklığına ulaşıldıktan sonra sistem basıncı kompresör havası yardımıyla istenen değere arttırılmıştır. CO_2 çıkış valfi yavaşça açılırken, mikro ölçüm valfi ile ölçülen etanol debisi istenen değere ayarlanarak sisteme 1 saat süre ile beslenmiştir. 1 saat sonunda etanol akışı durdurulmuş, 30 dakika sadece CO_2 akışı sağlanmıştır. CO_2 akış hızı 2 L/dakika olacak şekilde bütün ekstraksiyon aşamalarında sabit tutulmuştur. Ekstraksiyon işleminden sonra, sistem basıncı pompa modülü üzerinde bulunan hava basınç düzenleyici yardımıyla düşürülmüştür. Fırın içerisindeki basınç düşürüldükten sonra fırın sıcaklığı da düşürülmüştür. Ekstraktlar küçük şişeler içerisinde toplanmıştır. Elde edilen ekstraktlar 5000 rpm de 25

dakika santrifüj (Nüve, CN 180) edilmiştir. Santrifüjden sonra, süzüntü 0.45 µm şırınga filtresi ile filtrelenmiş ve kimyasal ölçümler için analiz edilene kadar -18°C'de saklanmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığı, basınç ve yardımcı çözücü olarak seçilen etanol debisi bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı 50, 75 ve 100°C, basınç 100, 150 ve 200 bar, etanol debisi 0.25, 0.50 ve 0.75 mL/dakika olmak üzere 20 ayrı deney noktasında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.2'de gösterilen SAE cihazını oluşturan aparatlar şöyledir: 1- CO_2 tüpü; 2- çelik kaplar; 3- sirkülasyon banyosu; 4- sıcaklık kontrol sistemi; 5- CO_2 pompa modülü; 6- milimetrik valf; 7- hava kaynağı; 8- EtOH pompa modülüdür.



Şekil 3.2: Süperkritik akışkan ekstraksiyon cihazının şematik gösterimi.

3.2.3.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Mandalina yapraklarından fenolik maddelerin MDE 2.45 GHz ve 900 Watt maksimum güç ile çalışan mikrodalga cihazı (NEOS-GR, Milestone Srl, İtalya) kullanılmıştır. Aynı zamanda cihaz özel bir yazılım ile video kamera ile donatılmıştır. Çevre dostu bu teknoloji, mikrodalga ısıtma ve yerçekimi kuvvetini birleştiren orijinal bir baş aşağı mikrodalga destekli damıtıcıdır. Fiziksel olgu olan hidrodifüzyon ekstraktın bitki örneğinden dışarı yayılmasını sağlar ve

ekstrakt mikrodalga reaktörün dışına çıkarak yerçekimi kuvvetiyle altında bulunan delikli Pyrex diskten geçerek aşağı doğru damlar.

Su ile mikrodalganın doğrudan etkileşimi, bitki örneğinin hücrelerinin içinde sıkışık halde bulunan bileşiklerin salınımından yana olsa da su bu çalışmada ekstraksiyon sürecini hızlandırmak için ön muamele olarak kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi atmosferik basınç altında gerçekleştirilmiştir. Öğütülmüş mandalina yaprakları 1 litre hacminde Pyrex® beher içine yerleştirilmiş ve herhangi bir çözücü eklenmeden beher mikrodalga fırın içerisine yerleştirilmiştir. Ve ekstraksiyon işlemi çeşitli mikrodalga gücü ve süreler ayarlanarak uygulanmıştır. Elde edilen ekstraktlar 5000 rpm de 25 dakika santrifüj (Nüve, CN 180) edilmiştir. Santrifüjden sonra, süzüntü 0.45 µm şırınga filtresi ile filtrelenmiş ve kimyasal ölçümler için analiz edilene kadar -18°C'de saklanmıştır. Ekstraksiyonda güç, ekstraksiyon süresi ve kuru mandalina yaprağı kütlesi bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Güç 275, 300 ve 325 Watt, ekstraksiyon süresi 45, 75 ve 105 saniye ve kuru mandalina yaprağı kütlesi 2, 4 ve 6 gram olmak üzere 20 ayrı deney noktasında ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.3: Çalışmada kullanılan mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı.

3.2.4. Fenolik Madde Miktarlarının Belirlenmesi

3.2.4.1. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Farklı yöntemlerle elde edilen mandalina yaş kabuk ve kuru yaprakları ektraktlarının Toplam Fenolik Madde (TPM) miktarı, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu çözeltisi ile verdiği rengin UV-spektrofotometrede (UV-Vis Lambda 35) ölçümü ile saptanmıştır. TPM

içeriği Malik ve Bradford [81] yöntemi takip edilerek, Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenmiştir. Bunun için 40 µL ekstrakt polipropilen bir tüp içine alınarak üzerine sırasıyla 360 µL destile su, 2 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi ve 1600 µL Na_2CO_3 çözeltisi eklenmiş ve 30 dakika bekletildikten sonra 760 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Ölçümler 3 kez tekrarlanarak hesaplamalar yapılmıştır. Gallik asitle çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplama yapılmış ve sonuçlar gallik asit cinsinden mg-GAE/g- kuru malzeme (yaprak veya kabuk) olarak verilmiştir.

3.2.4.2. Toplam flavonoid madde miktarının belirlenmesi

Mandalina yaş kabuk ve kuru yapraklarından elde edilen ekstraktlardaki Toplam Flavonoid Madde (TFM) içeriği, Sakanaka ve diğ. [82] tarafından tanımlanan kalorimetik yöntem biraz değiştirilerek uygulanarak belirlenmiştir. Bunun için polipropilen bir tüp içerisinde 375 µL ekstrak üzerine 1875 µL destile su eklenmiştir. Ve üzerine 112.5 µL %5 $NaNO_2$ çözeltisi eklenerek karıştırılmış ve 6 dakika beklenmiştir. Ardından 225 µL %10 $AlCl_3$ çözeltisi eklenerek karıştırılmış ve 5 dakika beklenmiştir. Sonra sırasıyla 750 µL 1 M NaOH çözeltisi ve 412.5 µL destile su eklenmiş ve 510 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Ölçümler 3 kez tekrarlanarak hesaplamalar yapılmıştır. Kateşin çözeltisi ile çizilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplama yapılmış ve sonuçlar mg (+)- kateşin eşdeğeri /g kuru malzeme (mg-KE/g- kuru malzeme (yaprak veya kabuk)) türünden verilmiştir.

3.2.5. Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

DPPH serbest radikalini indirgeme aktivitesi, ABTS serbest radikalini indirgeme aktivitesi ve CUPRAC analizleri mandalina yaş kabuk ve kuru yapraklarından çeşitli yöntemlerle elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

3.2.5.1. DPPH serbest radikalini indirgeme aktivitesi

DPPH serbest radikalini indirgeme aktivitesi Yu ve diğ. [83] yöntemine göre bazı değişikliklerle yapılmıştır [84,85]. Bu yönteme göre polipropilen bir tüp içerisine 200 µL ekstrakt konulmuş ve üzerine sırasıyla 500 µL %80 MeOH ve 3 mL DPPH çözeltisi eklenmiş ve karıştırılmıştır. 30 dakika bekledikten sonra 517 nm'de absorbansı UV-spektrofotometrede içerisinde 3 mL DPPH çözeltisi ve 700 µL %80 MeOH çözeltisi bulunan kuvars bir tüpe karşı ölçülmüştür. Ölçümler 3 kez tekrarlanarak hesaplamalar yapılmıştır. Sonuçlar, troloks

yardımıyla hazırlanan çözelti ile çizilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmış ve troloks cinsinden mg-TEAK/g-kuru malzeme olarak verilmiştir.

3.2.5.2. ABTS serbest radikalini indirgeme aktivitesi

ABTS serbest radikalini indirgeme aktivitesi Re ve diğ. [86] tarafından tanımlanan yöntem değiştirilerek yapılmıştır. 0.700 nm absorbans gösteren 2850 µL ABTS çözeltisi üzerine 150 µL ekstrakt eklenmiş ve karıştırılmıştır. 10 dakika beklendikten sonra 734 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Ölçümler 3 kez tekrarlanarak hesaplamalar yapılmıştır. Sonuçlar, troloks yardımıyla hazırlanan çözelti ile çizilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmış ve troloks cinsinden mg-TEAK/g-kuru malzeme olarak verilmiştir.

3.2.5.3. Cu (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite

Apak ve diğ. [87] tarafından bulunan CUPRAC yöntemine göre ölçümler yapılmıştır. CUPRAC yöntemine göre polipropilen bir tüpe sırasıyla 1 ml 10^{-2} M Cu(II) çözeltisi, 1 mL $7.5*10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi, 1 mL 1 M amonyum asetat çözeltisi, 100 µL ekstrakt ve 1 mL destile su eklenerek karıştırılmıştır. 30 dakika bekledikten sonra 450 nm'de absorbansı okunmuştur. Ölçümler 3 kez tekrarlanarak hesaplamalar yapılmıştır. Sonuçlar, troloks yardımıyla hazırlanan çözelti ile çizilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmış ve troloks cinsinden mg-TEAK/g-kuru malzeme olarak verilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel Analizler

Ultrason, süperkritik akışkan ve mikrodalga destekli ekstraksiyon sonuçlarında; regresyon analizi, istatistiksel analizler, yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon Design Expert Version 8.0.7.1 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca antioksidan aktivite tayinlerinin istatistiksel analizleri InStat® 3.0 versiyon (GraphPad, San Diego, CA, ABD) yazılımının varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanılarak yürütülmüştür. Ayrıca deneysel veriler kuadratik modele uygulanmıştır. Kuadratik model Denklem 3.1' e göre tasarlanmıştır:

$$Y=\beta_0+\sum_{i=1}^{3}\beta_{ii}x_i^2+\sum_{i=1}^{3}\sum_{j=i+1}^{3}\beta_{ij}x_i x_j+e \qquad (3.1)$$

Y: yanıt, β_0: genellikle kesişim olarak tanımlanan sabit katsayı, X_i: belirlenmemiş değişken (prob dalma derinliği, titreşim genliği ve titreşim süresi gibi), β_i: lineer, β_{ii}: ikinci derece ve β_{ij}: ikinci dereceden etkileşim katsayılarıdır [88].

4. BULGULAR

Günümüze kadar, farklı türdeki bitki materyallerinden fenolik maddelerin ekstraksiyonu için geniş çaplı çalışmalar yapılmıştır [52, 89-95].

Turunçgillerin yan ürünlerinden UDE yöntemiyle elde edilen biyolojik olarak aktif bileşenler üzerine çalışmalar vardır. Bunlardan bazıları şöyledir: Portakal kabuğundan (*Citrus sinensis* (L.)) [96], misket limonu, portakal ve tangerin kabuklarından [51], Penggan kabukları (*Citrus reticulata*) [97-98] ve turunçgillerin Tayvan' da yetişen sekiz çeşidinin kabuklarından {Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco), Tonkan (*C. tankan* Hayata), Murcott (*C. Reticulate X C. sinensis*), Wendun (*C. grandis* Osbeck), Peiyou (*C. grandis* Osbeck CV), Kumquat (*C. microcarpa*), Liucheng [*C. sinensis* (L.) Osbeck], and Limon [*C. limon* (L.) Bur.]} [99]. Bilindiği kadarıyla, mandalina kabuk ve yapraklarından UDE yöntemiyle elde edilen flavonoid ve fenolik madde içerikleri ile ilgili literatür eksikliği vardır. Mandalina kabuklarından UDE yöntemiyle elde edilen antioksidatif fenolik bileşenler ile ilgili birkaç çalışma vardır ancak mandalina yaprakları ile ilgili mevcut değildir. [9,97,100].

Diğer taraftan mandalina kabuk ve yapraklarından MDE yöntemiyle elde edilen flavonoid ve fenolik madde içerikleri ile ilgili literatürde yeterli çalışma bulunamamıştır. Hayat ve diğ. [10, 101, 102], mandalina posasından mikrodalga yöntemiyle elde edilen fenolik bileşen ve antioksidan kapasitesini incelemişlerdir. Ancak mandalina yapraklarıyla ilgili MDE çalışması yapmamışlardır [10, 101, 102]. Diğer yandan Kırbaşlar and Kırbaşlar [103], mandalina yapraklarından (*Citrus reticulata* Blanco) buhar destilasyonu ile elde edilen ekstraktların uçucu yağ kapasitesini incelemişler fakat fenolik bileşenleri incelememişlerdir [103]. Son yıllarda mandalina yapraklarından MDE yöntemiyle herhangi bir çözücü kullanmadan ekstrakt çıkarılması üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanmıştır [74].

Turunçgillerden SAE ile ilgili yapılan çalışma sayısı da sınırlıdır. *Citrus hystrix* yapraklarından SAE ile fenolik bileşikler elde edilmiş ve YYM ile optimize edilmiştir [104]. Cavero ve diğ. [105], kekik yapraklarından pilot ölçekli SAE yöntemiyle değişik çalışma koşullarında (farklı basınç, sıcaklık ve etanol değerlerinde) elde edilen ekstraktları

incelemişlerdir. Roy ve diğ. [106], *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka ve *Citrus sphaerocarpa* Hort. ex Tanaka kabuklarından SAE yöntemiyle elde edilen ekstrakstların uçucu yağ içeriğini incelemişlerdir. Mandalina yapraklarından SAE yöntemiyle elde edilen ekstraktların TPM içeriğiyle ilgili herhangi bir çalışma literatürde bulunamadı. Fakat mandalina kabuklarından SAE yöntemiyle uçucu yağ eldesi çalışmasına rastlanmıştır [64].

Mandalina kabuk ve yapraklarındaki antioksidan maddeler üç farklı teknikle ekstrakte edilerek TPM, TFM, DPPH, ABTS ve CUPRAC serbest radikalini giderme açısından değerlendirilmiştir. Kullanılan ekstraksiyon tekniklerinden üçü de modern teknik olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda 3 farklı faktörün etkisi incelenmiş ve YYM yöntemiyle optimum noktalar belirlenmiştir.

4.1. UDE ile Su için Mandalina Kabuk ve Yapraklarından Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi

Bağımsız değişken olarak seçilen 3 faktör ve YYM ile belirlenmiş seviyeleri (alt, orta ve üst) ve kodlanmış değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Optimizasyon için gerekli deney düzeni Design Expert 8.0.7.1 paket programı (Deneme Sürümü) kullanılarak FCCD deneme planı ile Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Design Expert programı kullanılarak, TPM ve TFM için ANOVA analizleri sırasıyla Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Mandalina kabuk ve yapraklarının su ile yapılan UDE için belirlenen bağımsız değişkenlerin seviye ve sembolleri.

			Kodlanmış Değerler		
Bağımsız Değişkenler	**Birim**	**Bağımsız Değişken Sembolleri**	**-1**	**0**	**1**
Prob dalma derinliği	cm	X_1	5	5.5	6
Titreşim genliği	%	X_2	20	40	60
Titreşim süresi	s	X_3	2:2	3:3	4:4

Tablo 4.2: UDE ile elde edilen TPM ve TFM için FCCD deneme planı ve sonuçları.

Bağımsız Değişkenler				Deneysel Sonuçlar			
				TPM (mg-GAE/g-YK) (mg-GAE/g-KY)		TFM (mg-KE/g-YK) (mg-KE/g-KY)	
Deney No	X_1 (cm)	X_2 (%)	X_3 (s)	Kabuk	Yaprak	Kabuk	Yaprak
1	5	20	2:2	46.160	208.074	2.920	12.976
2	6	20	2:2	57.306	184.882	3.123	12.951
3	5	60	2:2	33.985	210.685	2.920	13.889
4	6	60	2:2	56.343	216.003	3.016	16.105
5	5	20	4:4	45.013	191.259	2.796	12.544
6	6	20	4:4	41.936	182.922	3.099	12.072
7	5	60	4:4	54.452	202.745	2.742	14.357
8	6	60	4:4	67.465	207.859	3.028	13.938
9	5	40	3:3	39.081	208.600	3.200	12.916
10	6	40	3:3	42.003	195.667	3.080	12.218
11	5.5	20	3:3	45.219	190.445	2.743	12.195
12	5.5	60	3:3	68.419	197.154	2.954	13.548
13	5.5	40	2:2	40.717	189.332	2.856	13.039
14	5.5	40	4:4	37.051	185.558	2.617	12.570
15	5.5	40	3:3	55.698	187.108	2.882	12.993
16	5.5	40	3:3	55.698	187.108	2.882	12.993
17	5.5	40	3:3	55.698	187.108	2.882	12.993
18	5.5	40	3:3	55.698	187.108	2.882	12.993
19	5.5	40	3:3	55.698	187.108	2.882	12.993
20	5.5	40	3:3	55.698	187.108	2.882	12.993

X_1: Prob dalma derinliği, X_2: Titreşim genliği, X_3: Titreşim süresi, YK: Yaş kabuk, KY: Kuru Yaprak

Tablo 4.3: Mandalina kabuklarına uygulanan UDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

Kaynak	Kareler toplamı	Dağılma faktörü	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri
Model (**TPM**)	1309.57	9	145.51	3.17	0.0435
X_1-Prob dalma derinliği	214.94	1	214.94	4.68	0.0559
X_2-Titreşim genliği	202.76	1	202.76	4.41	0.0620
X_3-Titreşim süresi	13.1	1	13.1	0.28	0.6063
X_1X_2	93.18	1	93.18	2.3	0.1849
X_1X_3	69.43	1	69.43	1.51	0.2471
X_2X_3	289.27	1	289.27	6.29	0.0310
X_1^2	95.38	1	95.38	2.8	0.1803
X_2^2	296.73	1	296.73	6.46	0.0293
X_3^2	156.65	1	156.65	3.41	0.0946
Kalıntı	459.57	10	45.96		
Model Uygunsuzluğu	459.57	5	91.91		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	1769.14	19			
Model (**TFM**)	0.30	9	0.033	3.79	0.0247
X_1-Probdalma derinliği	0.059	1	0.059	6.81	0.0260
X_2-Titreşim genliği	3.83E-05	1	3.83E-05	4.42E-03	0.9483
X_3-Titreşim süresi	0.031	1	0.031	3.52	0.0900
X_1X_2	1.93E-03	1	1.93E-03	0.22	0.6475
X_1X_3	0.011	1	0.011	1.22	0.2945
X_2X_3	3.86E-05	1	3.86E-05	4.45E-03	0.9481
X_1^2	0.18	1	0.18	20.84	0.0010
X_2^2	3.45E-3	1	3.45E-3	0.40	0.5423
X_3^2	0.060	1	0.060	6.90	0.0253
Kalıntı	0.087	10	8.67E-03		
Model Uygunsuzluğu	0.087	5	0.017		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	0.38	19			

X_1: Prob dalma derinliği, X_2: Titreşim genliği, X_3: Titreşim süresi.

Tablo 4.4: Mandalina yapraklarına uygulanan UDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

Kaynak	Kareler toplamı	Dağılma faktörü	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri
Model (**TPM**)	1907.96	9	212.00	15.3	<0.0001
X_1-Prob dalma derinliği	115.80	1	115.80	8.21	0.0168
X_2-Titreşim genliği	590.81	1	590.81	41.88	<0.0001
X_3-Titreşim süresi	149.02	1	149.02	10.56	0.0087
X_1X_2	220.09	1	220.09	15.60	0.0027
X_1X_3	26.83	1	26.83	1.90	0.1979
X_2X_3	0.91	1	0.91	0.064	0.8052
X_1^2	388.76	1	388.76	27.56	0.0004
X_2^2	34.77	1	34.77	2.46	0.1475
X_3^2	21.31	1	21.31	1.51	0.2472
Kalıntı	141.07	10	14.11		
Model Uygunsuzluğu	141.07	5	28.21		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	2049.03	19			
Model (**TFM**)	13.47	9	1.50	7.57	0.0020
X_1-Prob dalma derinliği	0.036	1	0.036	0.18	0.6776
X_2-Titreşim genliği	8.28	1	8.28	41.90	<0.0001
X_3-Titreşim süresi	1.21	1	1.21	6.13	0.0328
X_1X_2	0.66	1	0.66	3.32	0.0983
X_1X_3	1.19	1	1.19	6.1	0.0342
X_2X_3	0.019	1	0.019	0.095	0.7640
X_1^2	0.011	1	0.011	0.057	0.8160
X_2^2	0.37	1	0.37	1.89	0.1993
X_3^2	0.25	1	0.25	1.26	0.2871
Kalıntı	1.98	10	0.20		
Model Uygunsuzluğu	1.98	5	0.40		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	15.44	19			

X_1: Prob dalma derinliği, X_2: Titreşim genliği, X_3: Titreşim süresi

Design Expert programı kullanılarak, mandalina kabuk ve yapraklarından elde edilen toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı için ANOVA analizleri sırasıyla Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'de verilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarından yararlanılarak bağımsız değişkenlerin ekstrakte edilen TPM ve TFM değerleri üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. p değeri 0.05'ten büyük olan etkiler önemsiz kabul edilmiştir. Regrasyon (bağlantı) analizleri %95 güven aralığında yapılmıştır. Tablo 4.3'e göre, yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi göstermek için TPM ve TFM için türetilen modellerin her ikisi de önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. ANOVA sonuçları aynı zamanda, deneysel veriler ile hesaplanan modellerin 0.740 ve 0.773 korelasyon katsayılarına (R^2) sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca mandalina kabuklarından ekstrakte edilen TPM için X_1, X_2X_3 ve X_2^2 anlamlı ($p<0.05$) parametreler iken, X_2, X_3, X_1X_2, X_1X_3, X_1^2 ve X_3^2 anlamsız parametreler olarak bulunmuştur. TFM için X_1, X_1^2 ve X_3^2 anlamlı ($p<0.05$) parametreler iken, X_2, X_3, X_1X_2, X_1X_3, X_1^2 ve X_2^2 anlamsız parametreler olarak bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.4'e göre, mandalina yapraklarından ekstrakte edilen TPM ve TFM için elde edilen modelin önemli olduğu görülmüştür (($p<0.0001$) ve ($p<0.05$)). Ayrıca mandalina yapraklarından ekstrakte edilen TPM için bulunan en önemli parametre X_2 olarak bulunmuş ($p<0.0001$), bunun yanı sıra X_1, X_3, X_1X_2 ve X_1^2 önemli parametreler iken ($p<0.05$), X_1X_3, X_2X_3, X_2^2 ve X_3^2 önemsiz parametreler olarak bulunmuştur. Yüksek korelasyon katsayılarına (R^2=0.931 ve 0.872) göre, bu çalışmada kullanılan YYM yaklaşımı mandalina yapraklarından UDE vasıtasıyla elde edilen TPM ve TFM için uygun olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.5: UDE yöntemi kullanılarak mandalina kabuk ve yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

Bağımlı Değişkenler	R^2	R^2_a	C.V	AP	SD.
TPM (mg-GAE/g-YK)	0.740	0.506	13.43	6.589	6.78
TPM (mg-GAE/g-KY)	0.931	0.869	1.93	11.494	3.76
TFM (mg-KE/g-YK)	0.773	0.569	3.19	8.140	0.093
TFM (mg-KE/g-KY)	0.872	0.757	3.38	12.277	0.44

Tablo 4.5'de korelasyon katsayıları (R^2 ve R^2_a), standart katsayılar, varyans ve yeterli hassasiyet gösterilmektedir. Bir diğer önemli parametre ise varyasyon katsayısıdır(C.V). Standart sapmanın (SD.) ortalamaya oranını ifade etmektedir [107]. Tahmin edilen korelasyon

katsayısının negatif çıkması ve varyans katsayısının da % 10'dan büyük çıkması modelden hesaplanan değerlerle deneysel değerlerin uyum sağlamadığı görülmektedir. Yeterli hassasiyet (Adequate precision-AP) değeri ise sinyalin gürültüye oranını ölçer ve bu değerin 4'ten büyük olması istenir [108]. Bu durumda, yeterli hassasiyet oranı bütün modeller için yeterli sinyallerin olduğunu göstermektedir.

YYM kullanılarak, mandalina kabuk ve yapraklarından elde edilen TPM ve TFM için kuadratik modeller sırasıyla verilmiştir. Mandalina kabuklarından TPM ve TFM için bulunan kuadratik denklemler Denklem 4.2 ve Denklem 4.3'de, mandalina yaprakları için belirlenen denklemler ise Denklem 4.4 ve Denklem 4.5'de verilmiştir:

$$\mathrm{TPMk} = -736.468 + 272.425X_1 - 4.631X_2 + 66.804X_3 + 0.341X_1X_2 - 5.892X_1X_3 + 0.301X_2X_3 - 23.557X_1^2 + 0.026X_2^2 - 7.547X_3^2 \quad (4.2)$$

$$\mathrm{TFMk} = +32.609 - 11.285X_1 + 0.016X_2 + 0.433X_3 - 0.002X_1X_2 + 0.073X_1X_3 - 0.0001X_2X_3 + 1.026X_1^2 - 0.0001X_2^2 - 0.148 * X_3^2 \quad (4.3)$$

$$\mathrm{TPMy} = +1827.689 - 561.927X_1 - 3.262X_2 - 7.976X_3 + 0.525X_1X_2 + 3.663X_1X_3 + 0.016X_2X_3 + 47.559X_1^2 + 0.009X_2^2 - 2.784X_3^2 \quad (4.4)$$

$$\mathrm{TFMy} == +16.596 - 1.532X_1 - 0.179X_2 + 2.177X_3 + 0.029X_1X_2 - 0.770X_1X_3 - 0.002X_2X_3 + 0.256X_1^2 + 0.001X_2^2 + 0.301X_3^2 \quad (4.5)$$

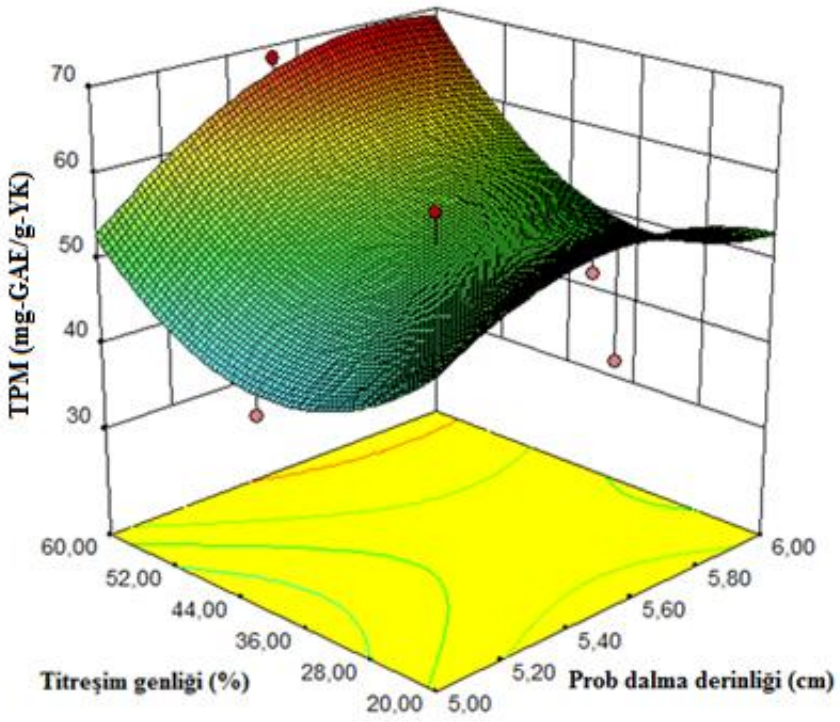
Farklı bağımsız değişkenler ve onların yanıt üzerine etkisi arasındaki etkileşimi tahmin etmek için, üç boyutlu yanıt yüzey eğrileri Şekil 4.1 - Şekil 4.12 sırasıyla Denklem 4.2- Denklem 4.5'e göre çizilmiştir.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de, mandalina kabuklarından UDE yöntemiyle elde edilen TPM ve TFM üzerine sabit titreşim süresinde (3:3 s), titreşim genliği ve prob dalma derinliği arasındaki etkileşimin etkisi gösterilmiştir.

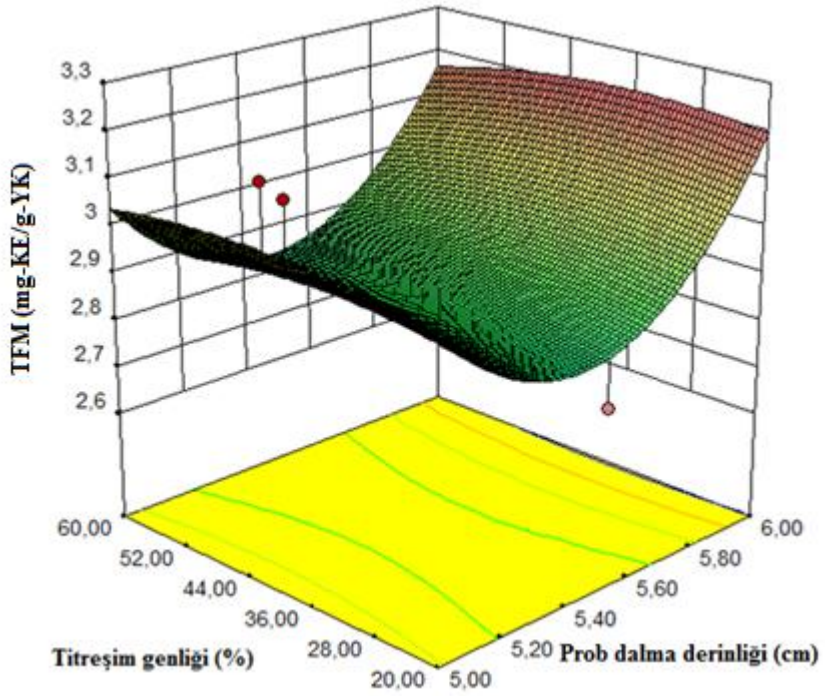
Şekil 4.1'de görüldüğü gibi mandalina kabuklarının TPM değeri titreşim genliği ile birlikte ilk başta düşmekte ve sonrasında Sun ve diğ. [84]'nin sonuçlarına benzer şekilde artmaktadır. Sun ve diğ. [84]'ne göre, β-karoten konsantrasyonu ilk önce artan titreşim yoğunluğu

60.51'den 302.55 W/cm^2 ile azalmış, ardından artan titreşim yoğunluğu 302.55'den 786.62 W/cm^2 ile artmıştır.

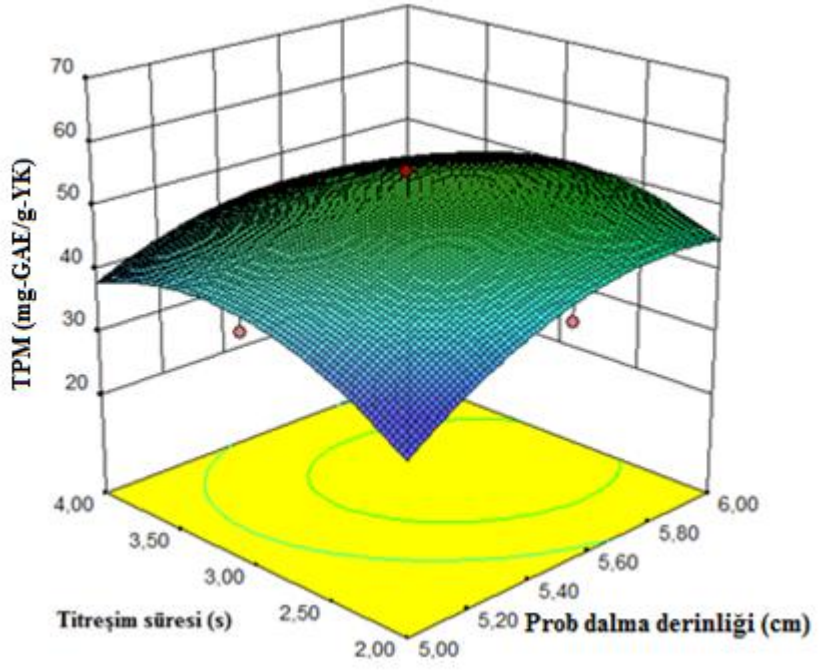
Değişik prob dalma derinliklerinde güç tüketimi, mandalina kabuklarında elde edilen TFM için anlamsız bir etkiye sahiptir (Şekil 4.2). Yapılan bu gözlem Ma ve diğ. [98]'nin yaptığı Penggan (*Citrus reticulata*) kabuklarında UDE yöntemiyle hesperidin çalışmasıyla tutarlı sonuçlar vermiştir. Buna ek olarak Carrera ve diğ. [92], üzümden fenolik bileşikler ektrakte ederken uygulanan %100 titreşim genliği ve %50 titreşim genliği arasında önemli farklılıklar bulunmadığını göstermişlerdir. Ayrıca mandalina kabuklarından elde edilen TFM üzerine prob dalma derinliği etkisi hususunda (Şekil 4.2) ulaşılan sonuçlar Sun ve diğ. [84] yaptığı çalışma ile benzer sonuçlar vermiştir. Sun ve diğ. [84] ise, β-karoten konsantrasyonu prob dalma derinliğinin 2'den 6 cm'ye değişimiyle önemli derecede azalmakta ardından prob dalma derinliğinin 6'dan 12 cm'ye değişimiyle çok az artmaktadır.



Şekil 4.1: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



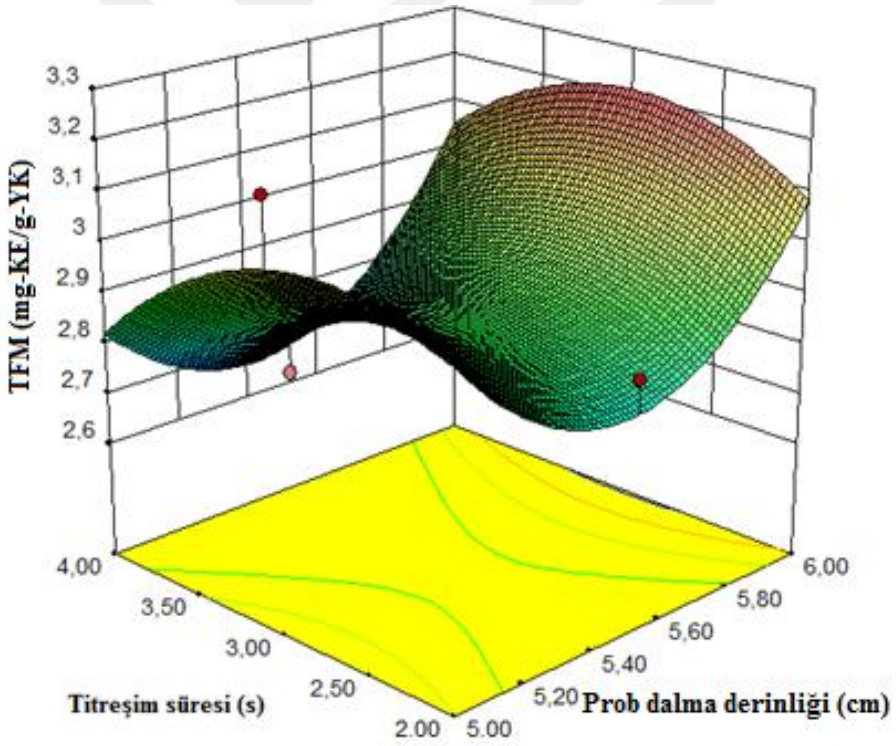
Şekil 4.2: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.



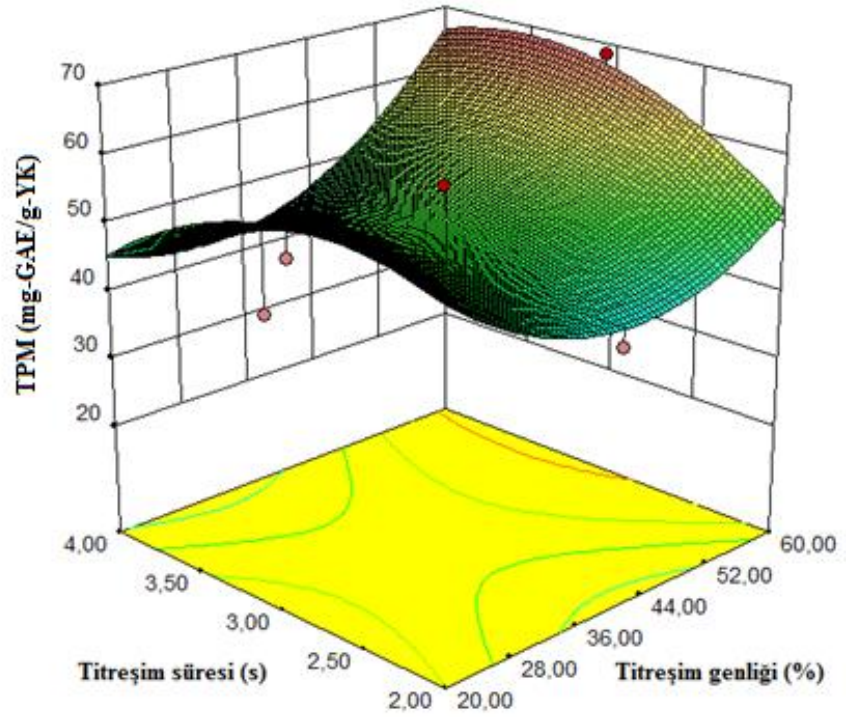
Şekil 4.3: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de, mandalina kabuklarından UDE yöntemiyle elde edilen TPM ve TFM üzerine sabit titreşim genliğinde (%40), titreşim süresi ve prob dalma derinliği

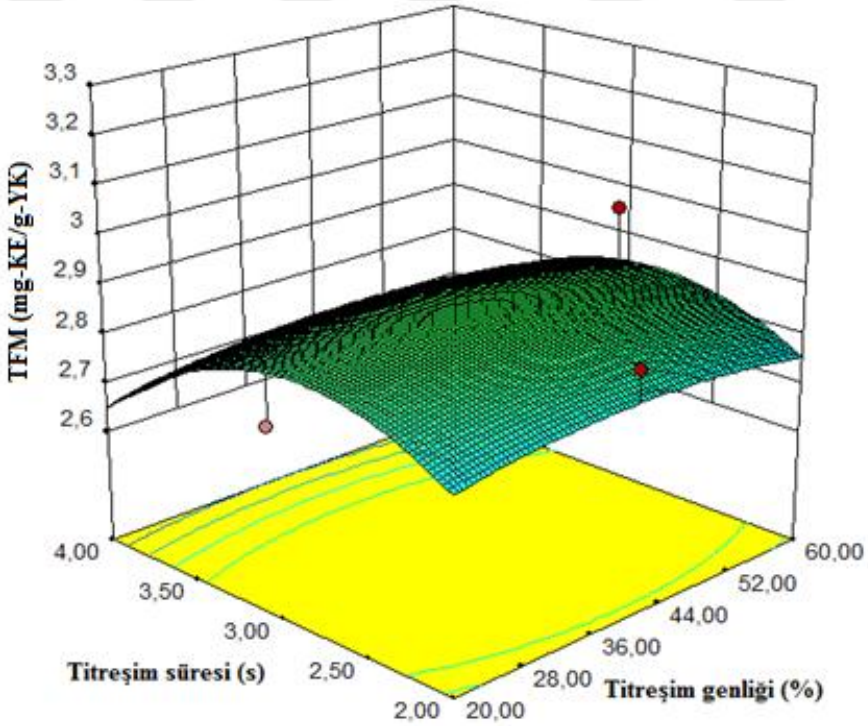
arasındaki etkileşimin etkisi gösterilmiştir. Mandalina kabuklarından elde edilen TPM ve TFM, titreşim süresi ile aynı eğilimi göstermiştir. TPM ve TFM verimi ilk başta titreşim süresi ile artarken ardından düşmeye başlamıştır. Belli bir derece dengeye geldikten sonra ise TPM ve TFM değerleri hafif bir artış göstermiştir. Bu sonuç, elektrik enerjisi tüketiminin azaltılması nedeniyle ekonomik açıdan çok kabul edilebilir bir sonuçtur. Pan ve diğ. [89], nar kabuklarından elde edilen TPM veriminin titreşim süresi ile birlikte başlangıçta arttığını ve sonra dengeye ulaştığını bildirmişlerdir. Ayrıca Sun ve diğ. [100], turunçgil kabuklarından elde edilen ekstraksiyon veriminin titreşim süresi ile dengeye ulaşana dek önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir. Mandalina kabukları ekstraktlarının TPM değeri, Pe´rez-Serradilla ve diğ. [85]'nin bulduğu sonuçlar ile tutarsız biçimde prob dalma derinliğiyle birlikte artmıştır. Yukarıda açıklandığı gibi mandalina kabukları için TFM verimi prob dalma derinliği ile beraber aynı eğilimi göstermiştir.



Şekil 4.4: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.



Şekil 4.5: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.

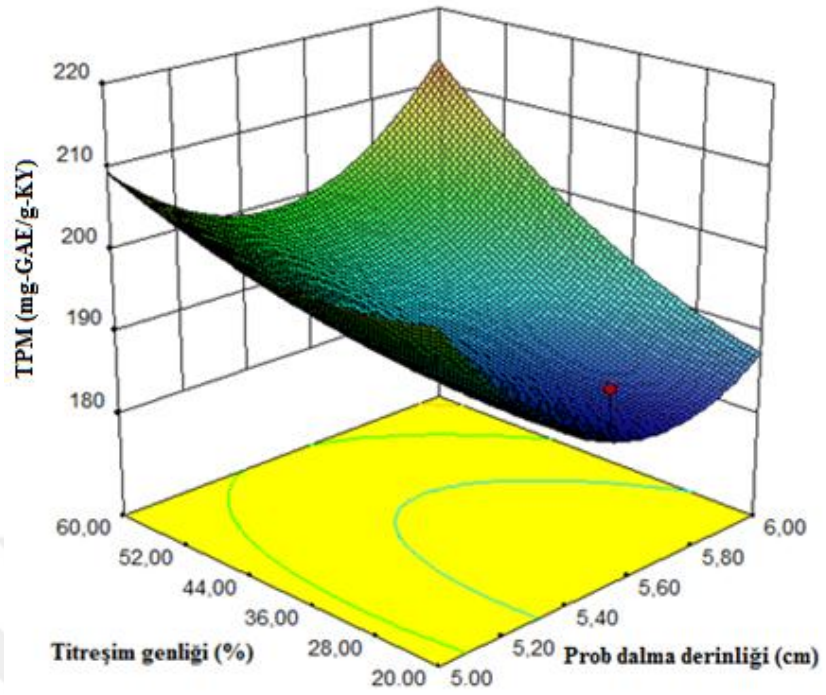


Şekil 4.6: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.

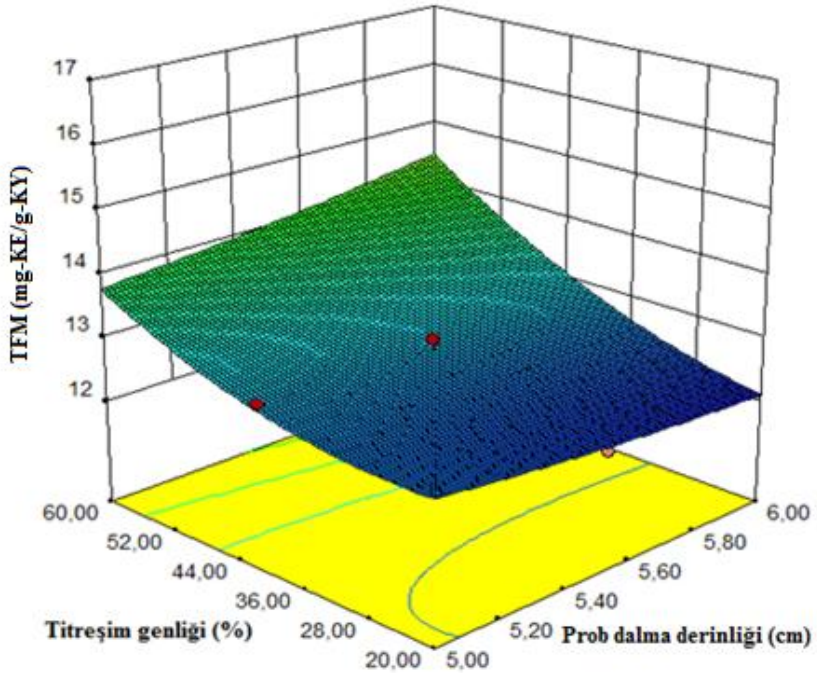
Şekil 4.7 ve Şekil 4.8, mandalina yapraklarından elde edilen ekstraktların TPM ve TFM değerlerinin üzerine titreşim genliği ve prob dalma derinliği arasındaki etkileşimin etkisinin eğrileridir. Mandalina yapraklarındaki TPM miktarı, ultrason enerjisi nedeniyle titreşim genliğiyle artmaktadır. Aynı sonuçlar, Carrera ve diğ. [92], Hossain ve diğ. [93] ve Horžić ve diğ. [95] tarafından da bulunmuştur. Hossain ve diğ. [93], yüksek titreşim genliğinde, daha fazla hücre duvarları zarar görerek çözücüye daha çok fenolik bileşikler içeren antioksidanların geçeceğini gözlemlerken, Carrera ve diğ, [92], üzüm ile yaptıkları çalışmada yüksek titreşim genliğinde daha yüksek fenolik bileşikler içeren ekstraktlar elde edildiğini göstermişlerdir. Horžić ve diğ. [95], yüksek titreşim genliğinde sarı çay ekstraktlarındaki ölçülen tüm biyoaktif bileşenlerin arttığını bildirmişlerdir. Diğer yandan, mandalina yapraklarındaki TPM miktarı Pe´rez-Serradilla ve diğ. [85]'nin bildirdiği sonuçlar ile tutarlı bir şekilde prob dalma derinliğiyle azalmıştır. Araştırmacılar, katı bitki örneklerinden polar ve polar olmayan bileşiklerin ekstraksiyonunda prob derinliğinin olumsuz etkisini göstermiştir. Ayrıca bu bağımsız değişkenin %95 güven düzeyinde önemli olmadığını, mandalina yapraklarının TFM miktarı sonuçlarına dayanarak iddia etmişlerdir (Şekil 4.8).

Şekil 4.9 ve Şekil 4.10, mandalina yapraklarından elde edilen TPM ve TFM miktarı üzerine titreşim süresi ve prob dalma derinliği arasındaki etkileşimin etkisini gösterirken, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12 ise titreşim süresi ve titreşim genliği arasındaki etkileşimin etkisini göstermektedir. Şekil 4.9'da görüldüğü üzere, TPM verimi titreşim süresi ile başlangıçta artmıştır ancak belli bir noktadan sonra çok az düşmeye başlamıştır. Diğer yandan, mandalina yapraklarındaki TPM miktarı için Sun ve diğ. aynı sonuçları elde etmişlerdir [100]. Aynı bağımsız değişkenler, mandalina yapraklarından UDE yöntemiyle elde edilen ekstraktlardaki TFM miktarı için de aynı etkiyi göstermiştir (Şekil 4.10). TFM verimi, titreşim süresi ve prob dalma derinliğinin her ikisiyle de artmıştır.

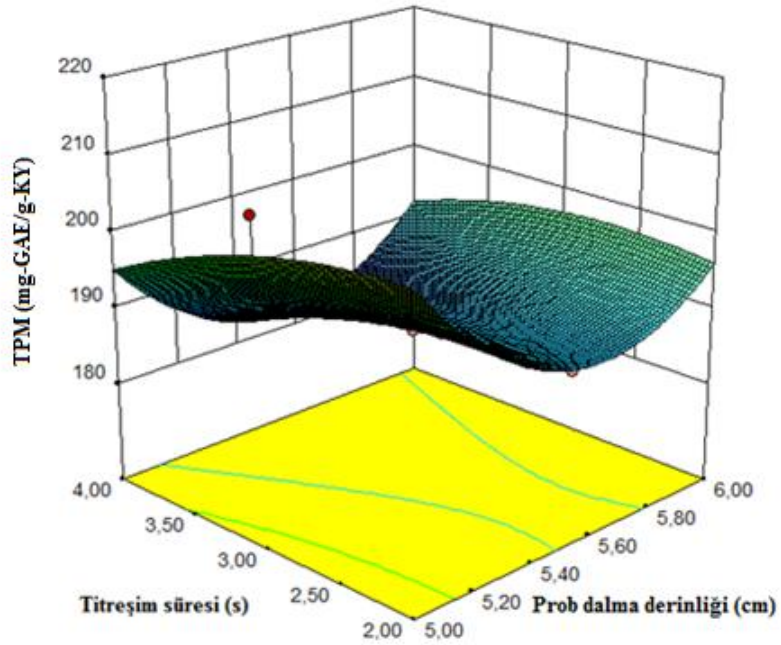
Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de görüldüğü gibi, mandalina yapraklarından elde edilen TPM ve TFM miktarına titreşim genliğinin etkisi de artan eğilim göstermiştir. Yüksek titreşim genliğinde, daha fazla hücre duvarları zarar görerek çözücüye daha çok fenolik bileşikler içeren antioksidanların geçeceği gözlemlenmiştir [93].



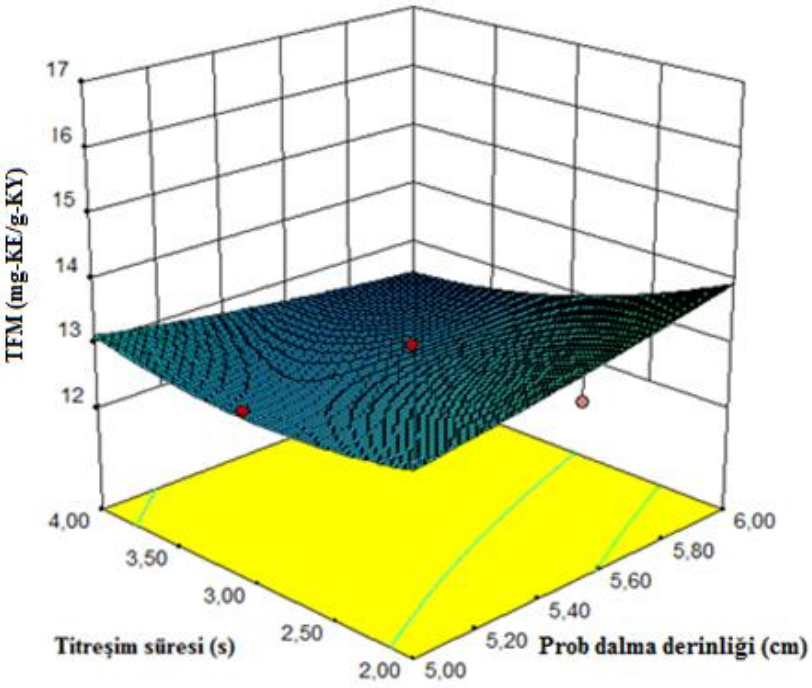
Şekil 4.7: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



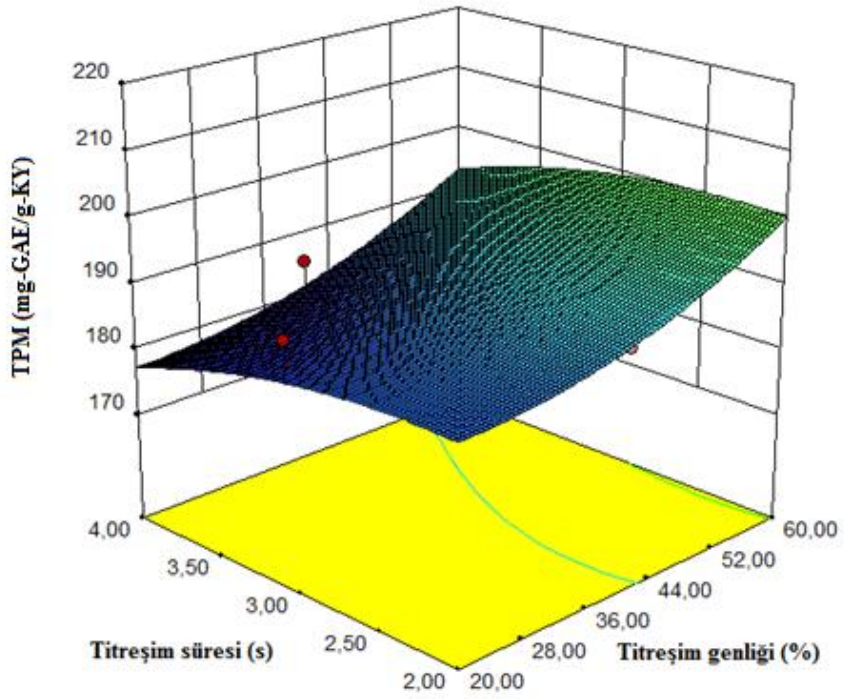
Şekil 4.8: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.



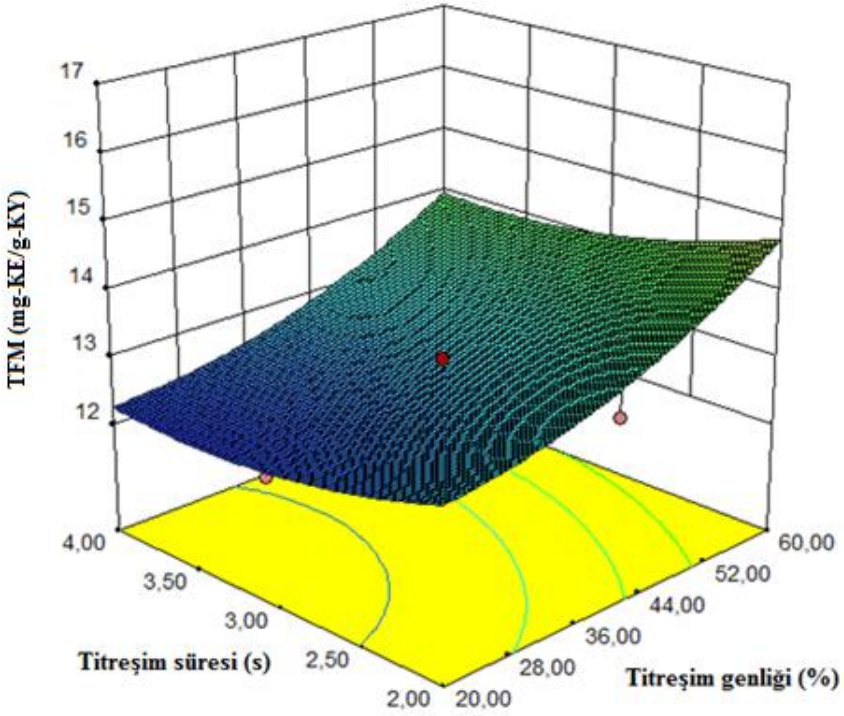
Şekil 4.9: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



Şekil 4.10: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.



Şekil 4.11: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



Şekil 4.12: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.

Ayrıca mandalina kabuk ve yaprakları için YYM yapılan optimizasyonda en yüksek TPM ve TFM, DPPH, ABTS ve CUPRAC değerleri optimum nokta olarak seçilmiş ve istenilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum nokta bulunmuştur (Tablo 4.6- Tablo 4.7).

Tablo 4.6: Mandalina kabukları için UDE ile istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.

	X_1 (cm)	X_2 (%)	X_3 (s)	TPM (mg-GAE/g)	TFM (mg-KE/g)	DPPH (mg-TEAK/g)	ABTS (mg-TEAK/g)	CUPRAC (mg-TEAK/g)	İstenilirlik
1	6.000	60.000	2.879	68.419	3.163	3.805	5.741	5.400	0.806

Tablo 4.7: Mandalina yaprakları için UDE ile istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.

No	X_1 (cm)	X_2 (%)	X_3 (s)	TPM (mg-GAE/g)	TFM (mg-KE/g)	DPPH (mg-TEAK/g)	ABTS (mg-TEAK/g)	CUPRAC (mg-TEAK/g)	İstenilirlik
1	6.000	60.000	2.946	213.420	14.529	6.724	11.145	29.785	0.832

4.1.1. UDE ile Su için Mandalina Kabuk ve Yapraklarından CUPRAC, DPPH ve ABTS Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi

Antioksidan aktivite, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla meydana gelen karmaşık bir proses olduğu için bu çalışmada DPPH, ABTS ve CUPRAC olarak üç tamamlayıcı analiz gerçekleştirilmiştir [109]. Tablo 4.8, mandalina kabuk ve yapraklarından UDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların istatistiksel analizleriyle elde edilen antioksidan aktivitelerini göstermektedir. Elde edilen DPPH, ABTS ve CUPRAC verileri troloks eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir. Mandalina kabuklarından çeşitli koşullar altında ultrason yöntemiyle elde edilen ekstraktlar için CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasitesi 4.937-6.137 mg-TEAK/g-YK arasında değişmiştir. Elde edilen mandalina yaprakları ekstraktları için CUPRAC antisoksidan kapasite ise 17.587'den 30.797 mg-TEAK/g-KY olarak değişmiştir. Genellikle, düşük prob dalma derinliği ve titreşim genliğinde çıkarılan numuneler düşük antioksidan kapasite göstermişlerdir ($p>0.05$). DPPH yöntemine göre ise, kabuk ekstraktları antioksidan kapasitesi 1.085'den 3.940 mg-TEAK/g-YK olarak değişirken, yaprak ekstraktları için 5.591 ve 7.026 mg-TEAK/g-KY arasında değişim göstermiştir. ABTS yöntemiyle elde edilen değerler kabuklar için 4.162 ile 6.238 mg-TEAK/g-YK, yapraklar için ise 10.248 ile 11.171 mg-TEAK/g-KY arasında elde edilmiştir. Li ve diğ. [110] ve [111]'de olduğu gibi,

CUPRAC analizi sonucunda elde edilen antioksidan aktivitesi değerleri DPPH ve ABTS'ye göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Onlar da, Çin şarapları ve üzüm çekirdeği tozundan elde edilen CUPRAC analizlerinde DPPH ve ABTS analizlerine kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite elde etmişlerdir.

Tablo 4.8: Mandalina kabuk ve yapraklarından UDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite analiz sonuçları.

Bağımsız Değişkenler				**Deneysel Sonuçlar**					
				CUPRAC (mg-TEAK/g-YK) (mg-TEAK/g-KY)		**DPPH (mg-TEAK/g-YK) (mg-TEAK/g-KY)**		**ABTS (mg-TEAK/g-YK) (mg-TEAK/g-KY)**	
Deney No	**X_1 (cm)**	**X_2 (%)**	**X_3 (s)**	**Kabuk**	**Yaprak**	**Kabuk**	**Yaprak**	**Kabuk**	**Yaprak**
1	5	20	2:2	5.315	24.231	1.204	6.166	5.040	11.153
2	6	20	2:2	6.061	19.093	1.554	6.488	6.238	11.171
3	5	60	2:2	5.378	28.039	1.085	5.591	4.698	11.053
4	6	60	2:2	5.876	30.622	3.552	6.551	5.849	10.937
5	5	20	4:4	5.301	17.587	1.251	6.504	5.294	10.248
6	6	20	4:4	5.924	22.212	1.615	6.995	4.162	11.132
7	5	60	4:4	5.484	28.283	3.595	6.805	6.060	11.039
8	6	60	4:4	5.664	30.796	3.784	6.789	5.136	11.094
9	5	40	3:3	5.578	26.243	1.798	6.854	5.762	10.997
10	6	40	3:3	5.718	25.268	1.204	6.675	5.918	11.163
11	5.5	20	3:3	5.501	17.647	1.498	7.026	4.651	11.151
12	5.5	60	3:3	6.042	27.434	3.940	6.876	5.876	11.138
13	5.5	40	2:2	5.395	26.874	1.751	6.807	5.862	10.973
14	5.5	40	4:4	6.137	24.878	1.219	6.799	5.545	10.893
15	5.5	40	3:3	4.937	24.987	1.554	6.629	5.335	11.088
16	5.5	40	3:3	4.937	24.987	1.554	6.629	5.335	11.088
17	5.5	40	3:3	4.937	24.987	1.554	6.629	5.335	11.088
18	5.5	40	3:3	4.937	24.987	1.554	6.629	5.335	11.088
19	5.5	40	3:3	4.937	24.987	1.554	6.629	5.335	11.088
20	5.5	40	3:3	4.937	24.987	1.554	6.629	5.335	11.088

X_1: Prob dalma derinliği, X_2: Titreşim genliği, X_3: Titreşim süresi, YK: Yaş kabuk, KY: Kuru Yaprak

Antioksidan aktivite ve TPM ve TFM içeriği arasındaki ilişkiyi araştırmak için korelasyon katsayıları dikkate alınmalıdır. Kabuk ekstraktlarındaki. TPM içeriği ile DPPH değeri arasında yüksek ilişki (r=0.855) var iken bu ilişkiyi CUPRAC (r=0.371) ve ABTS (r=0.245) izlemiştir. Öte yandan, mandalina kabuklarından elde edilen ekstraktların TFM içeriği ile antioksidan aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon (r=0.016-0.457, p=0.05) olduğu

bulunurken TPM içeriği ile arasındaki korelasyonun daha fazla olduğunu kanıtlar nitelikte elde edilmiştir. Mandalina yaprakları için DPPH (r=0.672/-0.002, p=0.05) ve ABTS (r=-0.285/-0.241, p=0.05) ile karşılaştırıldığında TPM/TFM madde ve CUPRAC arasında daha yüksek ilişki (r=0.795/0.718, p=0.05) olduğu gözlemlenmiştir.

4.2. UDE ile Metanol için Mandalina Kabuk ve Yapraklarından Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi

Bağımsız değişken olarak seçilen 3 faktör ve YYM ile belirlenmiş seviyeleri (alt, orta ve üst) ve kodlanmış değerleri Tablo 4.9'da verilmiştir. Optimizasyon için gerekli deney düzeni Design Expert programı kullanılarak FCCD deneme planı ile Tablo 4.10'da gösterilmiştir. TPM ve TFM için ANOVA analizleri sırasıyla Tablo 4.11 ve Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.9: Mandalina kabuk ve yapraklarının metanol ile yapılan UDE için belirlenen bağımsız değişkenlerin seviye ve sembolleri.

			Kodlanmış Değerler		
Bağımsız Değişkenler	**Birim**	**Bağımsız Değişken Sembolleri**	**-1**	**0**	**1**
Prob dalma derinliği	cm	X_1	5	5.5	6
Titreşim genliği	%	X_2	20	40	60
Titreşim süresi	s	X_3	2:2	3:3	4:4

Tablo 4.10: UDE ile elde edilen TPM ve TFM için FCCD deneme planı ve sonuçları.

Bağımsız Değişkenler				Deneysel Sonuçlar			
				TPM (mg-GAE/g-YK) (mg-GAE/g-KY)		TFM (mg-KE/g-YK) (mg-KE/g-KY)	
Deney No	X_1 (cm)	X_2 (%)	X_3 (s)	Kabuk	Yaprak	Kabuk	Yaprak
1	5	20	2:2	37.476	22.611	0.803	1.614
2	6	20	2:2	38.936	22.176	0.665	1.640
3	5	60	2:2	40.840	38.409	0.755	3.418
4	6	60	2:2	41.063	38.537	1.059	3.095
5	5	20	4:4	41.434	21.622	1.066	1.581
6	6	20	4:4	37.801	21.142	0.635	1.520
7	5	60	4:4	41.421	37.749	0.798	3.570
8	6	60	4:4	39.965	42.914	0.963	2.785
9	5	40	3:3	42.623	30.339	1.079	2.446
10	6	40	3:3	42.311	28.979	0.908	2.049
11	5.5	20	3:3	41.680	22.013	0.796	1.699
12	5.5	60	3:3	40.280	36.694	0.746	3.156
13	5.5	40	2:2	42.173	29.313	0.946	2.347
14	5.5	40	4:4	40.408	31.213	0.685	2.278
15	5.5	40	3:3	41.994	28.206	0.722	2.150
16	5.5	40	3:3	41.994	28.979	0.722	2.347
17	5.5	40	3:3	41.994	28.206	0.722	2.150
18	5.5	40	3:3	41.994	28.206	0.722	2.150
19	5.5	40	3:3	41.994	28.206	0.722	2.150
20	5.5	40	3:3	41.994	28.206	0.722	2.150

X_1: Prob dalma derinliği, X_2: Titreşim genliği, X_3: Titreşim süresi, YK: Yaş kabuk, KY: Kuru Yaprak

Tablo 4.11: Mandalina kabuklarına uygulanan UDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

Kaynak	Kareler toplamı	Dağılma faktörü	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri
Model (**TPM**)	32.87	9	3.65	4.30	0.0162
X_1-Prob dalma derinliği	1.38	1	1.38	1.63	0.2308
X_2-Titreşim genliği	3.90	1	3.90	4.59	0.0578
X_3-Titreşim süresi	0.029	1	0.029	0.034	0.8570
X_1X_2	0.11	1	0.11	0.13	0.7529
X_1X_3	5.73	1	5.73	6.75	0.0266
X_2X_3	1.39	1	1.39	1.64	0.2289
X_1^2	0.063	1	0.063	0.074	0.7905
X_2^2	4.90	1	4.90	5.77	0.0372
X_3^2	2.89	1	2.89	3.40	0.0950
Kalıntı	8.49	10	0.85		
Model Uygunsuzluğu	8.49	5	1.70	4.075E+009	<0.0001
Saf hata	2.083E-009	5	4.167E-10		
Toplam	41.39	19			
Model (**TFM**)	0.28	9	0.031	3.21	0.0416
X_1-Probdalma derinliği	7.356E-003	1	7.356E-003	0.77	0.4017
X_2-Titreşim genliği	0.013	1	0.013	1.32	0.2765
X_3-Titreşim süresi	6.690E-004	1	6.690E-004	0.070	0.7970
X_1X_2	0.13	1	0.13	14.07	0.0038
X_1X_3	0.023	1	0.023	2.44	0.1494
X_2X_3	0.01	1	0.01	1.07	0.3246
X_1^2	0.075	1	0.075	7.80	0.0190
X_2^2	9.098E-003	1	9.098E-003	0.95	0.3530
X_3^2	4.650E-004	1	4.650E-004	0.048	0.8301
Kalıntı	0.096	10	9.589E-003		
Model Uygunsuzluğu	0.096	5	0.019		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	0.37	19			

X_1: Prob dalma derinliği, X_2: Titreşim genliği, X_3: Titreşim süresi.

Tablo 4.12: Mandalina yapraklarına uygulanan UDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

Kaynak	Kareler toplamı	Dağılma faktörü	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri
Model (**TPM**)	749.86	9	83.32	70.02	<0.0001
X_1-Prob dalma derinliği	0.91	1	0.91	0.77	0.4022
X_2-Titreşim genliği	718.08	1	718.08	603.51	<0.0001
X_3-Titreşim süresi	1.29	1	1.29	1.08	0.3223
X_1X_2	4.82	1	4.82	4.05	0.0719
X_1X_3	3.12	1	3.12	2.62	0.1367
X_2X_3	4.12	1	4.12	3.46	0.0924
X_1^2	1.03	1	1.03	0.86	0.3748
X_2^2	0.26	1	0.26	0.22	0.6520
X_3^2	4.06	1	4.06	3.41	0.0945
Kalıntı	11.90	10	1.19		
Model Uygunsuzluğu	11.40	5	2.28	22.90	0.0019
Saf hata	0.50	5	0.100		
Toplam	761.75	19			
Model (**TFM**)	6.96	9	0.77	88.62	<0.0001
X_1-Probdalma derinliği	0.24	1	0.24	27.11	0.0004
X_2-Titreşim genliği	6.35	1	6.35	727.50	<0.0001
X_3-Titreşim süresi	0.014	1	0.014	1.66	0.2271
X_1X_2	0.14	1	0.14	16.43	0.0023
X_1X_3	0.038	1	0.038	4.31	0.0646
X_2X_3	2.714E-006	1	2.714E-006	3.109E-004	0.9863
X_1^2	6.045E-004	1	6.054E-004	0.069	0.7978
X_2^2	0.075	1	0.075	8.53	0.0153
X_3^2	6.883E-003	1	6.883E-003	0.79	0.3955
Kalıntı	0.087	10	8.732E-003		
Model Uygunsuzluğu	0.055	5	0.011	1.70	0.2870
Saf hata	0.032	5	6.465E-003		
Toplam	7.05	19			

X_1: Prob dalma derinliği, X_2: Titreşim genliği, X_3: Titreşim süresi.

Design Expert programı kullanılarak, mandalina kabuk ve yapraklarından elde edilen TPM ve TFM için ANOVA analizleri sırasıyla Tablo 4.11 ve Tablo 4.12'de verilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarından yararlanılarak bağımsız değişkenlerin ekstrakte edilen TPM ve TFM değerleri üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir. p değeri 0.05'ten büyük olan etkiler anlamsız kabul edilmiştir. Regrasyon (bağlantı) analizleri %95 güven aralığında yapılmıştır. Tablo 4.11'e göre, yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi göstermek için TPM ve TFM için türetilen modellerin her ikisi de anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. ANOVA sonuçları aynı zamanda, deneysel veriler ile hesaplanan modellerin 0.795 ve 0.743 korelasyon katsayılarına (R^2) sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca mandalina kabuklarından ekstrakte edilen TPM için X_2, X_1X_3 ve X_2^2 anlamlı ($p<0.05$) parametreler iken, X_1, X_3, X_1X_2, X_2X_3, X_1^2 ve X_3^2 anlamsız parametreler olarak bulunmuştur. TFM için X_1X_2 ve X_1^2 anlamlı ($p<0.05$) parametreler iken, X_1, X_2, X_3, X_1X_3, X_2X_3, X_2^2 ve X_3^2 anlamsız parametreler olarak bulunmuştur (Tablo 4.11). Tablo 4.12'ye göre, mandalina yapraklarından ekstrakte edilen TPM ve TFM için elde edilen modelin anlamlı olduğu görülmüştür (($p<0.0001$) ve ($p<0.0001$)). Ayrıca mandalina yapraklarından ekstrakte edilen TPM için bulunan en anlamlı parametre X_2 olarak bulunmuş ($p<0.0001$), X_1, X_2, X_3, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_1^2, X_2^2 ve X_3^2 anlamsız parametreler olarak bulunmuştur. TFM için ise bulunan en anlamlı parametre X_2 olarak bulunmuş ($p<0.0001$), bunun yanı sıra X_1, X_1X_2 ve X_2^2 anlamlı parametreler olarak bulunmuş ve diğer tüm parametreler anlamsız olarak bulunmuştur. Yüksek korelasyon katsayılarına (R^2=0,984 ve 0,988) göre, bu çalışmada kullanılan YYM yaklaşımı mandalina yapraklarından UDE vasıtasıyla elde edilen TPM ve TFM için uygun olduğunu göstermiştir.

Tablo 4.13: UDE yöntemi kullanılarak mandalina kabuk ve yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

Bağımlı Değişkenler	R^2	R^2_a	CV	AP	SD.
TPM (mg-GAE/g-YK)	0.795	0.610	2.25	6.476	0.92
TPM (mg-GAE/g-KY)	0.984	0.970	3.67	27.943	1.09
TFM (mg-KE/g-YK)	0.743	0.512	12.06	6.578	0.098
TFM (mg-KE/g-KY)	0.988	0.977	4.04	30.841	0.093

YYM kullanılarak, mandalina kabuk ve yapraklarından elde edilen TPM ve TFM için kuadratik modeller sırasıyla verilmiştir. Mandalina kabuklarından TPM ve TFM için bulunan kuadratik denklemler Denklem 4.6 ve Denklem 4.7'de, mandalina yaprakları için belirlenen denklemler ise Denklem 4.8 ve Denklem 4.9'da verilmiştir:

$$\mathrm{TPMk} = +20.736 - 2.827X_1 + 0.296X_2 + 16.347X_3 + 0.012X_1X_2 - 1.693X_1X_3 - 0.021X_2X_3 + 0.607X_1^2 - 0.003X_2^2 - 1.024X_3^2 \quad (4.6)$$

$$\mathrm{TFMk} = +21.480 - 7.505X_1 - 0.053X_2 + 0.736X_3 + 0.013X_1X_2 - 0.108X_1X_3 - 0.002X_2X_3 + 0.660X_1^2 - 0.0001X_2^2 - 0.013X_3^2 \quad (4.7)$$

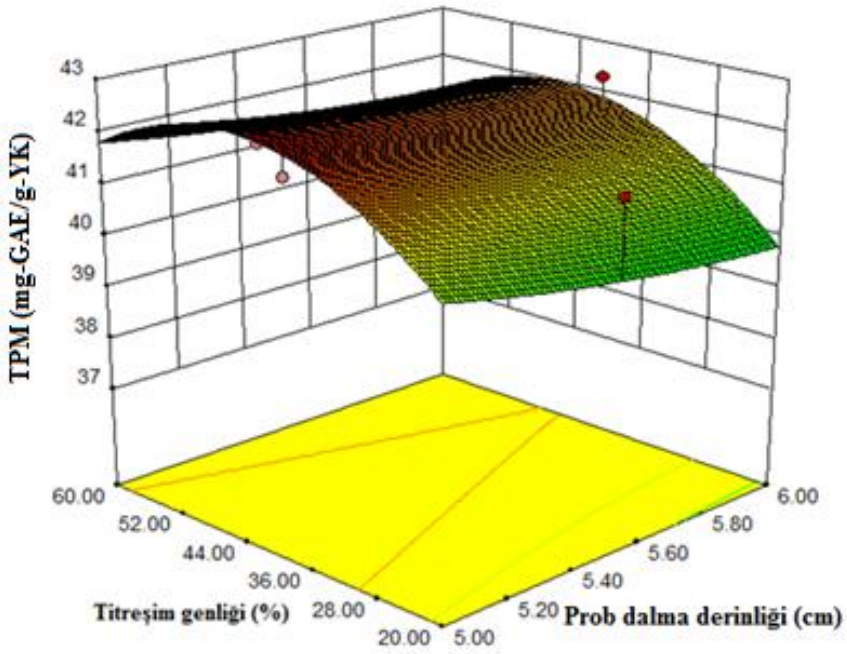
$$\mathrm{TPMy} = +135.349 - 33.134X_1 - 0.172X_2 - 15.230X_3 + 0.078X_1X_2 + 1.248X_1X_3 + 0.036X_2X_3 + 2.444X_1^2 + 0.001X_2^2 + 1.215X_3^2 \quad (4.8)$$

$$\mathrm{TFMy} == -3.472 + 1.272X_1 + 0.081X_2 + 0.418X_3 - 0.013X_1X_2 - 0.137X_1X_3 - 0.00003X_2X_3 - 0.059X_1^2 + 0.0004 * X_2^2 + 0.050X_3^2 \quad (4.9)$$

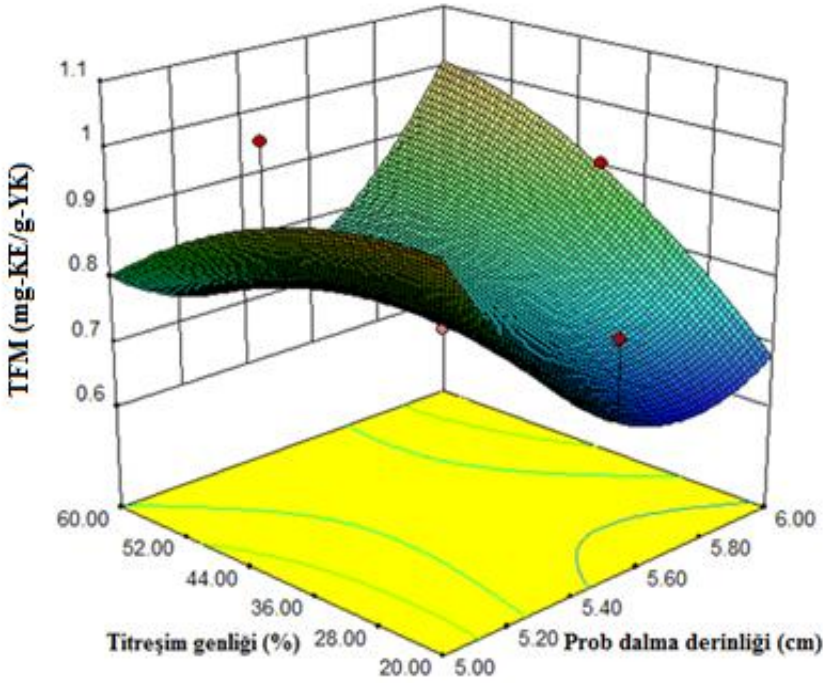
Farklı bağımsız değişkenler ve onların yanıt üzerine etkisi arasındaki etkileşimi tahmin etmek için, üç boyutlu yanıt yüzey eğrileri Şekil 4.13 - Şekil 4.24 sırasıyla Denklem 4.6- Denklem 4.9'a göre çizilmiştir.

Şekil 4.13 ve Şekil 4.14, mandalina kabuk ve yapraklarından metanol ile yapılan UDE'de sabit titreşim süresinde (3:3 s), TPM ve TFM için yanıt yüzey grafiklerini göstermektedir.

Şekil 4.13'e göre toplam fenolik madde miktarının yaklaşık olarak %45 titreşim genliğine kadar hızlı bir artış göstermekte ve bu noktadan sonra yavaş yavaş düştüğü görülmektedir. Prob dalma derinliği TPM miktarını etkilememiş fakat daha uzun süreli ekstraksiyonda prob dalma derinliğinin artması TPM miktarını azaltmıştır. Aynı koşullar altında mandalina kabuklarından metanol ile elde edilen TFM miktarı, titreşim genliği ile birlikte belli bir noktaya kadar artmış sonra hızla düştüğü görülmektedir. Prob dalma derinliği yaklaşık olarak 5.70 cm'ye kadar arttırıldığında TFM miktarı düşmekte, bu noktadan sonra hızla artmaktadır. Bunun sebebi, hücre içerisinde ultrason ile çözücü-çözünen temas yüzeyi arttıkça çözünen mandalina kabuklarının hücre çeperlerinin bozunmaya uğraması olabilir (Şekil 4.14).



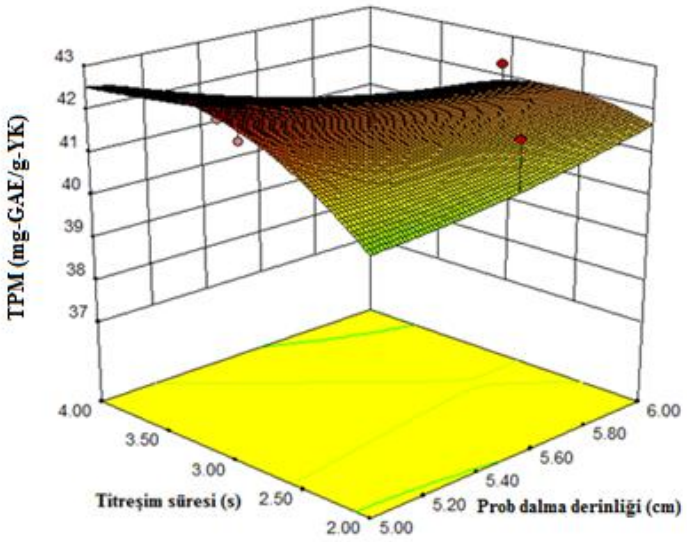
Şekil 4.13: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



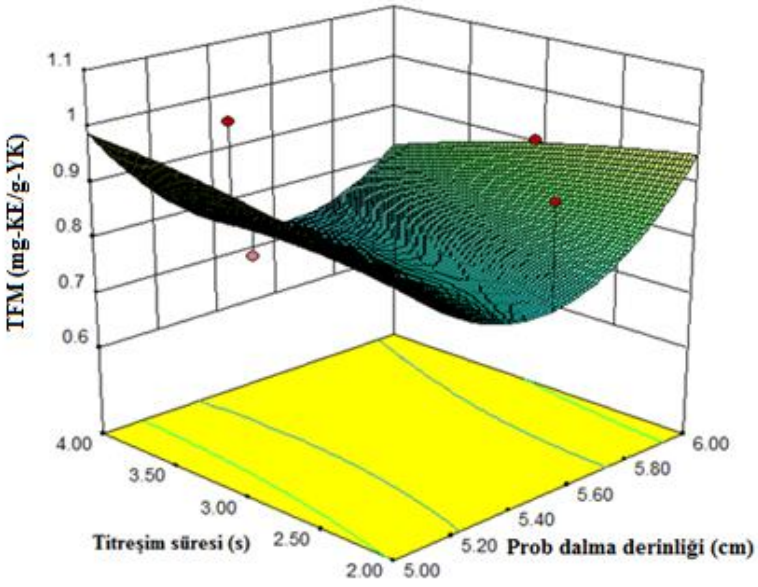
Şekil 4.14: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.

Sabit titreşim genliğinde (%40), TPM değerinin titreşim süresi ve prob dalma derinliğine göre değişimini veren yanıt yüzey grafiği Şekil 4.15'deki gibidir. Şekilden de görüldüğü gibi, TPM değeri yaklaşık 3:3 titreşim süresinde en yüksek değere ulaşmakta, bu noktadan sonra düşüşe

geçmekte ve prob dalma derinliği yine yaklaşık 5.5 cm'ye ulaştığında en düşük değere ulaşmakta ve bu noktadan sonra artmaktadır. TFM miktarı ise titreşim süresi arttıkça artmakta ve prob dalma derinliği Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'deki gibi eğilim göstermektedir.



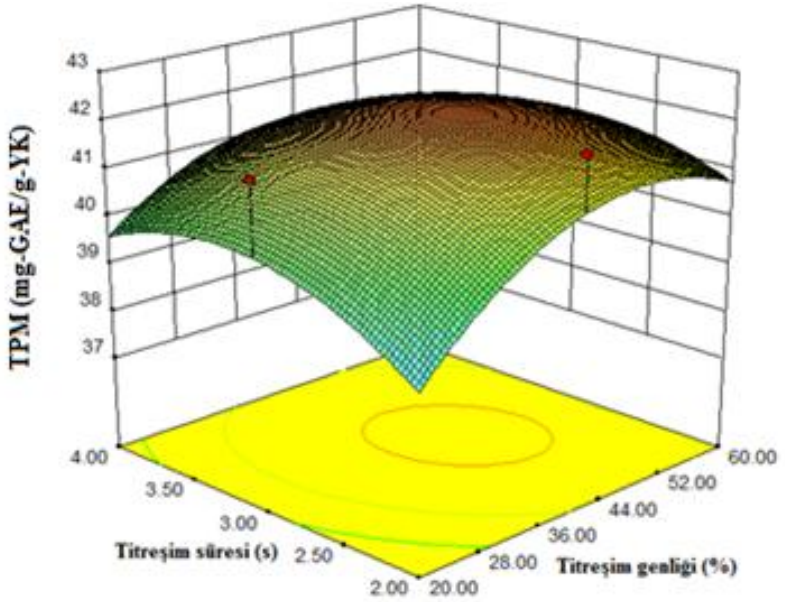
Şekil 4.15: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



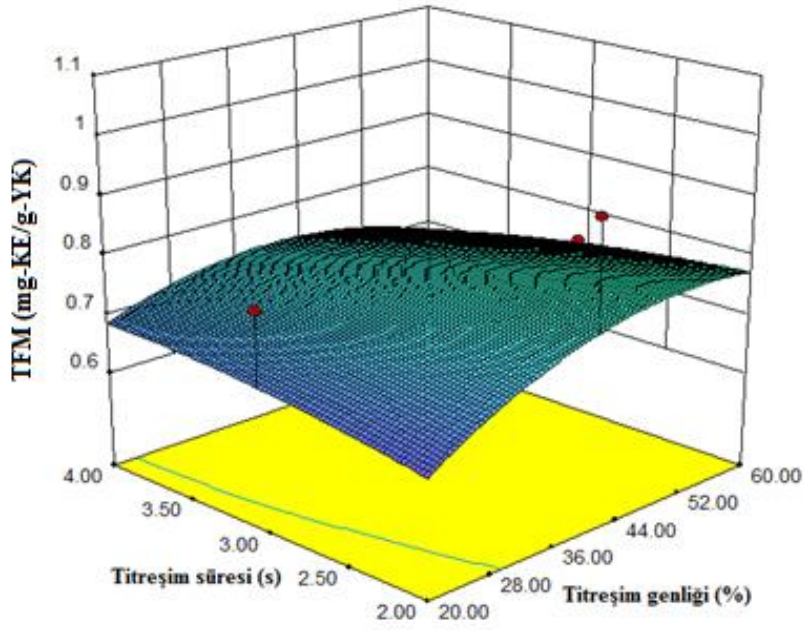
Şekil 4.16: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.

Şekil 4.17'ye göre, mandalina kabuklarından MeOH ile yapılan UDE'de TPM miktarı sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm), titreşim süresi ve titreşim genliğinin artmasıyla belli bir noktaya kadar hızla artmakta, bu noktadan sonra yavaş yavaş düşmektedir. TFM miktarı ise

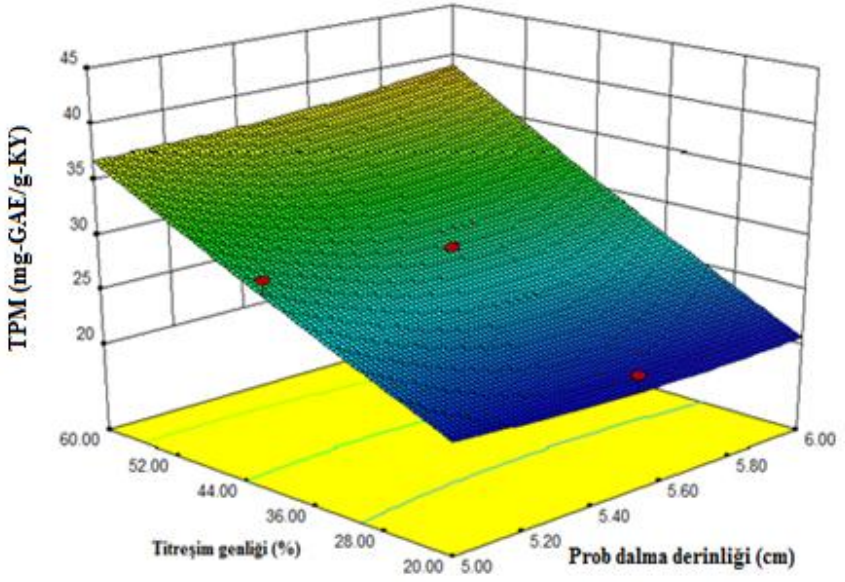
titreşim süresi ve titreşim genliğinin artışıyla birlikte artmaktadır (Şekil 4.18). Şekil 4.19 ve Şekil 4.20, mandalina yapraklarından MeOH ile yapılan UDE'de sabit titreşim süresinde (3:3 s), TPM ve TFM miktarının yanıt yüzey grafiği eş yükselti eğrisini göstermektedir.



Şekil 4.17: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.

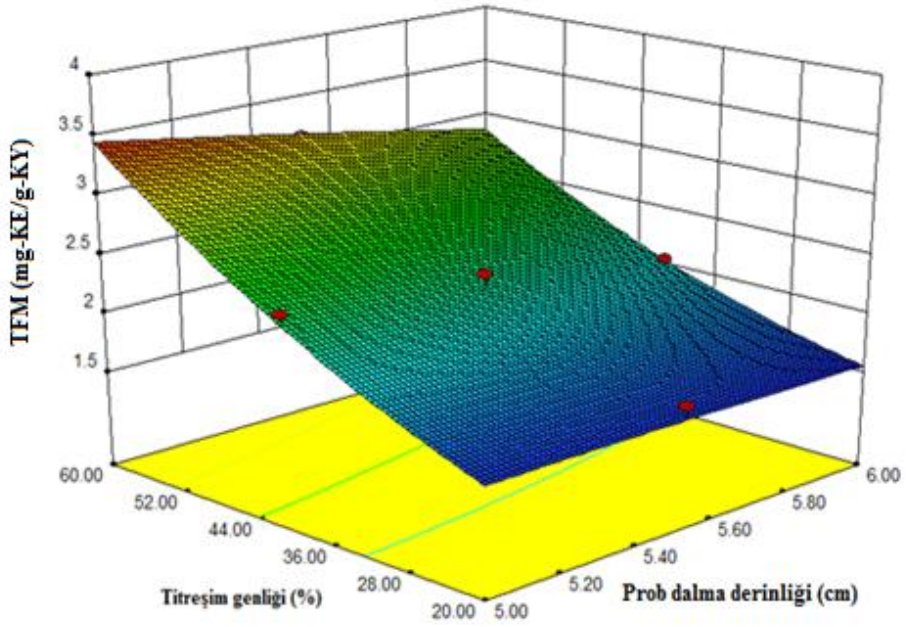


Şekil 4.18: Mandalina kabuklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.



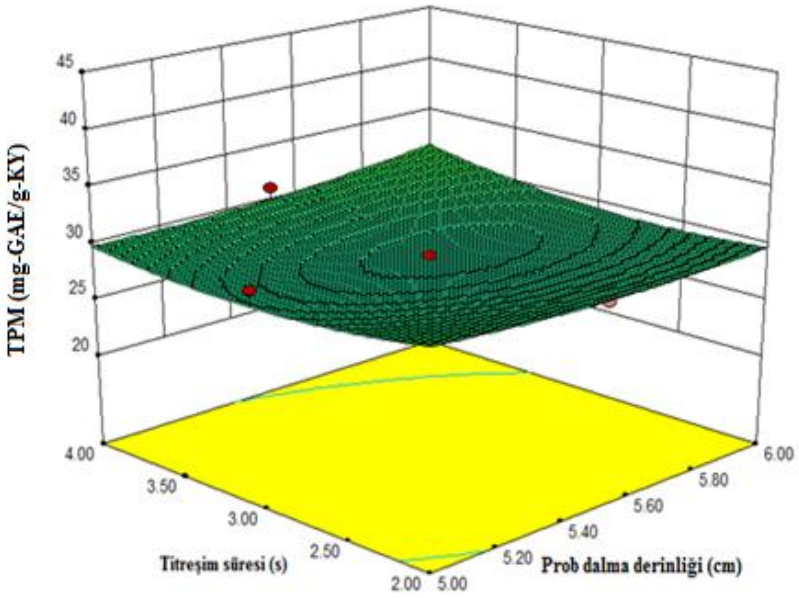
Şekil 4.19: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.

Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de görüldüğü gibi, TPM ve TFM verimi titreşim genliği ile artmakta, prob dalma derinliğinden etkilenmemektedir.

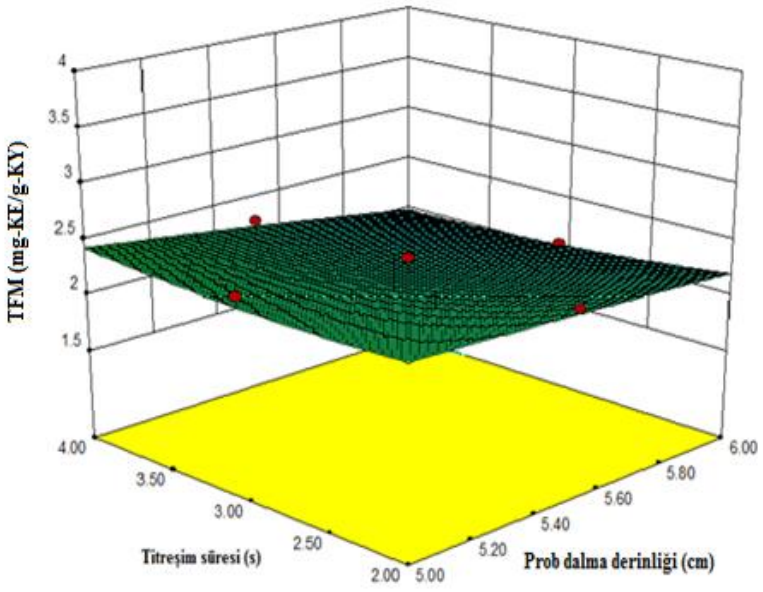


Şekil 4.20: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim süresinde (3:3 s) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.

TPM ve TFM miktarı sabit titreşim genliğinde (%40), titreşim süresi ile beraber artmakta ancak yukarıda olduğu gibi prob dalma derinliğinden etkilenmemektedir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).

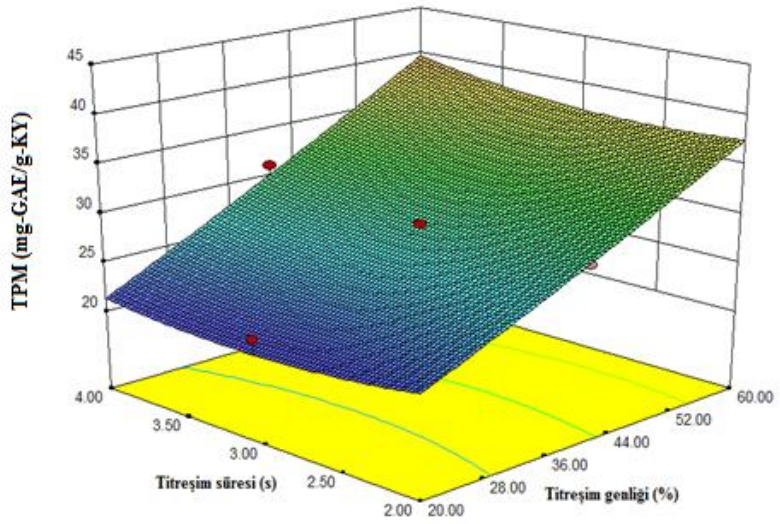


Şekil 4.21: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



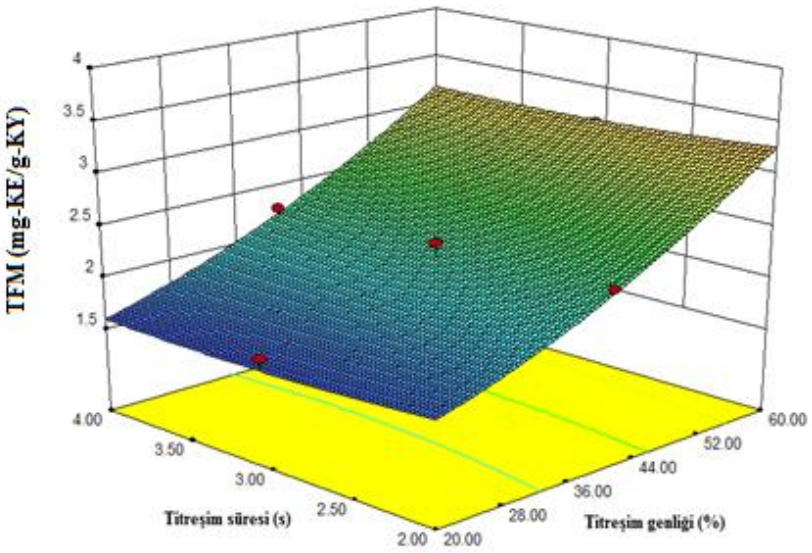
Şekil 4.22: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit titreşim genliğinde (%40) kullanılan prob dalma derinliğine bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.

TPM ve TFM miktarı sabit titreşim genliğinde (%40), titreşim süresi ile beraber artmakta ancak yukarıda olduğu gibi prob dalma derinliğinden etkilenmemektedir (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22).



Şekil 4.23: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.

Mandalina yapraklarından metanol ile yapılan UDE'de sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm), TPM ve TFM miktarı titreşim genliği ile birlikte artmakta ve yukarıda olduğu gibi titreşim süresinden etkilenmemektedir (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24).



Şekil 4.24: Mandalina yapraklarından UDE ile ekstraksiyonunda sabit prob dalma derinliğinde (5.5 cm) kullanılan genliğe bağlı olarak titreşim süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.

Ayrıca mandalina kabuk ve yaprakları için YYM ile yapılan optimizasyonda en yüksek TPM ve TFM, DPPH, ABTS ve CUPRAC değerleri optimum nokta olarak seçilmiş ve istenilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum nokta bulunmuştur (Tablo 4.14-Tablo 4.15).

Tablo 4.14: Mandalina kabuklarının UDE için istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.

No	X_1 (cm)	X_2 (%)	X_3 (s)	TPM (mg-GAE/g)	TFM (mg-KE/g)	DPPH (mg-TEAK/g)	ABTS (mg-TEAK/g)	CUPRAC (mg-TEAK/g)	İstenilirlik
1	5.000	33.296	3.754	42.528	1.018	1.002	5.102	16.925	0.920

Tablo 4.15: Mandalina yapraklarının UDE için istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.

No	X_1 (cm)	X_2 (%)	X_3 (s)	TPM (mg-GAE/g)	TFM (mg-KE/g)	DPPH (mg-TEAK/g)	ABTS (mg-TEAK/g)	CUPRAC (mg-TEAK/g)	İstenilirlik
1	5.000	60.000	3.453	37.388	3.473	2.862	3.488	23.992	0.887

4.2.1. UDE ile Metanol için Mandalina Kabuk ve Yapraklarından CUPRAC, DPPH ve ABTS Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi

Antioksidan aktivite, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla meydana gelen karmaşık bir proses olduğu için bu çalışmada DPPH, ABTS ve CUPRAC olarak üç tamamlayıcı analizler gerçekleştirilmiştir [109]. Tablo 4.16, mandalina kabuk ve yapraklarından UDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların istatistiksel analizleriyle elde edilen antioksidan aktivitelerini göstermektedir. Elde edilen DPPH, ABTS ve CUPRAC verileri troloks eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir. Mandalina kabuklarından çeşitli koşullar altında çözücü olarak MeOH kullanılarak UDE yöntemiyle elde edilen ekstraktlar için CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasitesi 11.644 ve 17.491 mg-TEAK/g-YK arasında değişmiştir. Elde edilen mandalina yaprakları ekstraktları için CUPRAC antisoksidan kapasite ise 8.228'den 25.986 mg-TEAK/g-KY olarak değişmiştir. DPPH yöntemine göre ise, kabuk ekstraktları antioksidan kapasitesi 0.607'den 1.762 mg-TEAK/g-YK olarak değişirken, yaprak ekstraktları için 0.282 ve 3.148 mg-TEAK/g-KY arasında değişim göstermiştir. ABTS yöntemiyle elde edilen değerler kabuklar için 3.203 ile 9.510 mg-TEAK/g-YK, yapraklar için ise 0.905 ile 3.075 mg-TEAK/g-KY arasında elde edilmiştir. Li ve diğ. [110] ve [111]'de olduğu gibi, CUPRAC analizi sonucunda elde edilen antioksidan aktivitesi değerleri DPPH ve ABTS'ye göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Onlar da, Çin şarapları ve üzüm çekirdeği tozundan elde edilen

CUPRAC analizlerinde DPPH ve ABTS analizlerine kıyasla daha yüksek antioksidan aktivite elde etmişlerdir.

Kabuk ekstraktlarındaki, TPM içeriği ile CUPRAC değeri arasında yüksek ilişki (r=0.967) var iken bu ilişkiyi DPPH (r=0.851) ve ABTS (r=0.816) izlemiştir. Yaprak ekstraktlarındaki, TPM içeriği ile CUPRAC değeri arasında yüksek ilişki (korelasyon) (r=0.977) var iken bu ilişkiyi ABTS (r=0.953) ve DPPH (r=0.869) izlemiştir.

Tablo 4.16: Mandalina kabuk ve yapraklarından UDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite analiz sonuçları.

Bağımsız Değişkenler				**Deneysel Sonuçlar**					
				CUPRAC (mg-TEAK/g-YK) (mg-TEAK/g-KY)		**DPPH (mg-TEAK/g-YK) (mg-TEAK/g-KY)**		**ABTS (mg-TEAK/g-YK) (mg-TEAK/g-KY)**	
Deney No	**X_1 (cm)**	**X_2 (%)**	**X_3 (s)**	**Kabuk**	**Yaprak**	**Kabuk**	**Yaprak**	**Kabuk**	**Yaprak**
1	5	20	2:2	11.644	9.395	1.668	1.186	3.704	1.179
2	6	20	2:2	15.219	8.228	0.607	0.720	5.587	1.025
3	5	60	2:2	16.978	20.972	1.360	2.734	4.124	2.751
4	6	60	2:2	15.001	22.182	1.762	2.321	5.063	1.070
5	5	20	4:4	12.134	9.254	1.723	1.174	3.203	1.070
6	6	20	4:4	14.084	7.236	1.234	0.575	3.763	1.112
7	5	60	4:4	15.196	21.943	1.578	2.633	5.869	3.593
8	6	60	4:4	14.301	25.986	1.812	2.893	9.510	1.563
9	5	40	3:3	17.061	16.220	0.913	1.792	4.411	3.075
10	6	40	3:3	17.468	16.449	1.410	0.282	5.199	2.079
11	5.5	20	3:3	11.789	9.408	0.675	1.108	5.827	0.905
12	5.5	60	3:3	15.721	19.866	1.497	3.148	5.764	1.293
13	5.5	40	2:2	17.491	9.605	0.900	1.652	4.371	1.346
14	5.5	40	4:4	17.044	9.300	0.879	0.386	4.278	1.271
15	5.5	40	3:3	17.315	14.035	0.926	0.454	3.738	1.379
16	5.5	40	3:3	17.315	14.035	0.926	0.454	3.738	1.379
17	5.5	40	3:3	17.315	14.035	0.926	0.454	3.738	1.379
18	5.5	40	3:3	17.315	14.035	0.926	0.454	3.738	1.379
19	5.5	40	3:3	17.315	14.035	0.926	0.454	3.738	1.379
20	5.5	40	3:3	17.315	14.035	0.926	0.454	3.738	1.379

4.3. MDE ile Mandalina Yapraklarından Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi

Bağımsız değişken olarak seçilen 3 faktör ve YYM ile belirlenmiş seviyeleri (alt, orta ve üst) ve kodlanmış değerleri Tablo 4.17'de verilmiştir. Optimizasyon için gerekli deney düzeni Design Expert programı kullanılarak FCCD deneme planı ile Tablo 4.18'de gösterilmiştir. Design Expert programı kullanılarak, TPM ve TFM için ANOVA analizleri Tablo 4.19'da verilmiştir.

Tablo 4.17: Mandalina yapraklarının MDE için belirlenen bağımsız değişkenlerin seviye ve sembolleri.

Bağımsız Değişkenler	Birim	Bağımsız Değişken Sembolleri	Kodlanmış Değerler		
			-1	0	1
Ekstraksiyon süresi	s	X_1	45	75	105
Mikrodalga gücü	W	X_2	275	300	325
Kuru yaprak miktarı	g	X_3	2	4	6

Design Expert programı kullanılarak, mandalina yapraklarından elde edilen TPM ve TFM için ANOVA analizleri Tablo 4.19'da verilmiştir. Yapılan analiz sonuçlarından yararlanılarak bağımsız değişkenlerin ekstrakte edilen TPM ve TFM değerleri üzerine etkisi ANOVA ile belirlenmiştir. p değeri 0.05'ten büyük olan etkiler önemsiz kabul edilmiştir. Regrasyon (bağlantı) analizleri %95 güven aralığında yapılmıştır. Tablo 4.19'a göre, yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi göstermek için TPM ve TFM için türetilen modellerin her ikisi de anlamlı ($p<0.05$) bulunmuştur. ANOVA sonuçları aynı zamanda, deneysel veriler ile hesaplanan modellerin 0.828 ve 0.890 korelasyon katsayılarına (R^2) sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 4.20). Ayrıca mandalina yapraklarından ekstrakte edilen TPM için X_3, X_1X_3 ve X_3^2 anlamlı ($p<0.05$) parametreler iken, X_2, X_1X_2, X_2X_3, X_1^2 ve X_2^2 anlamsız parametreler olarak bulunmuştur. TFM için X_1, X_3, X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3ve X_3^2 anlamlı ($p<0.05$) parametreler iken, X_2, X_1^2 ve X_2^2 anlamsız parametreler olarak bulunmuştur (Tablo 4.19).

Tablo 4.18: MDE ile elde edilen TPM ve TFM için FCCD deneme planı ve sonuçları.

Deney No	Bağımsız Değişkenler			Deneysel Sonuçlar	
	X_1 (s)	X_2 (W)	X_3 (g)	TPM (mg-GAE/g-KY)	TFM (mg-KE/g-KY)
1	75	300	2	13.366	1.456
2	75	300	4	6.302	0.606
3	75	300	4	6.302	0.606
4	45	325	6	3.889	0.434
5	105	325	6	4.607	0.506
6	75	275	4	4.834	0.499
7	45	275	6	4.622	0.481
8	105	300	4	5.481	0.536
9	105	325	2	6.391	0.673
10	105	275	6	4.896	0.441
11	105	275	2	7.280	0.678
12	45	300	4	4.673	0.407
13	75	325	4	6.278	0.502
14	75	300	4	6.302	0.606
15	45	325	2	12.004	0.845
16	75	300	4	6.302	0.606
17	75	300	4	6.302	0.606
18	75	300	4	6.302	0.606
19	75	300	6	6.107	0.539
20	45	275	2	18.665	1.858

X_1: Ekstraksiyon süresi, X_2: Mikrodalga gücü, X_3: Kuru yaprak miktarı, KY: Kuru yaprak.

Tablo 4.19: Mandalina yapraklarına uygulanan MDE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

Kaynak	Kareler toplamı	Dağılma faktörü	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri
Model (**TPM**)	226.06	9	25.12	13.85	0.0002
X_1-Ekstraksiyon süresi	23.10	1	23.10	12.74	0.0051
X_2-Mikrodalga gücü	5.08	1	5.08	2.80	0.1251
X_3-Kuru yaprak miktarı	112.80	1	112.80	62.22	<0.0001
X_1X_2	4.83	1	4.83	2.66	0.1338
X_1X_3	40.46	1	40.46	22.31	0.0008
X_2X_3	5.33	1	5.33	2.94	0.1173
X_1^2	4.06	1	4.06	2.24	0.1656
X_2^2	1.49	1	1.49	0.82	0.3864
X_3^2	32.64	1	32.64	18.00	0.0017
Kalıntı	18.13	10	1.81		
Model Uygunsuzluğu	18.13	5	3.63		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	244.19	19			
Model (**TFM**)	2.15	9	0.24	9.02	0.0010
X_1-Ekstraksiyon süresi	0.14	1	0.14	5.35	0.0433
X_2-Mikrodalga gücü	0.100	1	0.100	3.76	0.0812
X_3-Kuru yaprak miktarı	0.97	1	0.97	36.48	<0.0001
X_1X_2	0.16	1	0.16	5.91	0.0354
X_1X_3	0.24	1	0.24	9.06	0.0131
X_2X_3	0.13	1	0.13	5.06	0.0483
X_1^2	0.055	1	0.055	2.08	0.1801
X_2^2	0.034	1	0.034	1.30	0.2811
X_3^2	0.41	1	0.41	15.38	0.0029
Kalıntı	0.27	10	0.27		
Model Uygunsuzluğu	0.27	5	0.27		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	2.42	19			

X_1: Ekstraksiyon süresi, X_2: Mikrodalga gücü, X_3: Kuru yaprak miktarı.

Tablo 4.20: MDE yöntemi kullanılarak mandalina yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

Bağımlı Değişkenler	R^2	R^2_a	CV	AP	SD.
TPM (mg-GAE/g-KY)	0.828	0.782	23.74	13.411	1.67
TFM (mg-KE/g-KY)	0.890	0.792	24.14	12.578	0.16

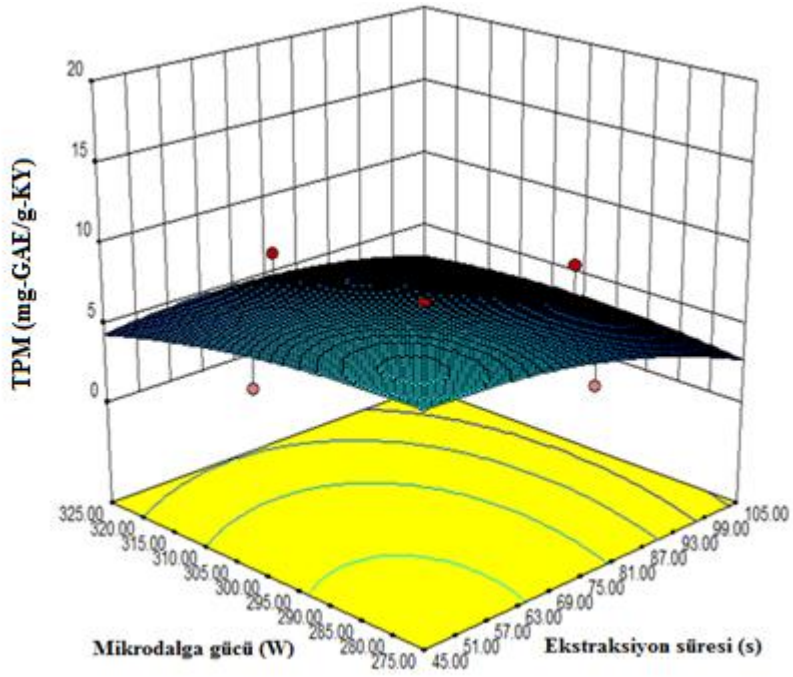
YYM kullanılarak, mandalina yapraklarından MDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların TPM ve TFM için kuadratik modeller sırasıyla verilmiştir. TPM ve TFM için bulunan kuadratik denklemler Denklem 4.10 ve Denklem 4.11'de verilmiştir:

$$\mathrm{TPM} = +36.769 - 0.2006X_1 - 9.041X_3 + 0.038X_1X_3 + 0.569X_3^2 \quad (4.10)$$

$$\mathrm{TFM} = -4.556 - 0.048X_1 + 0.079X_2 - 1.919X_3 + 0.0002X_1X_2 + 0.003X_1X_3 + 0.003X_2X_3 - 0.0002X_1^2 - 0.0002X_2^2 + 0.096X_3^2 \quad (4.11)$$

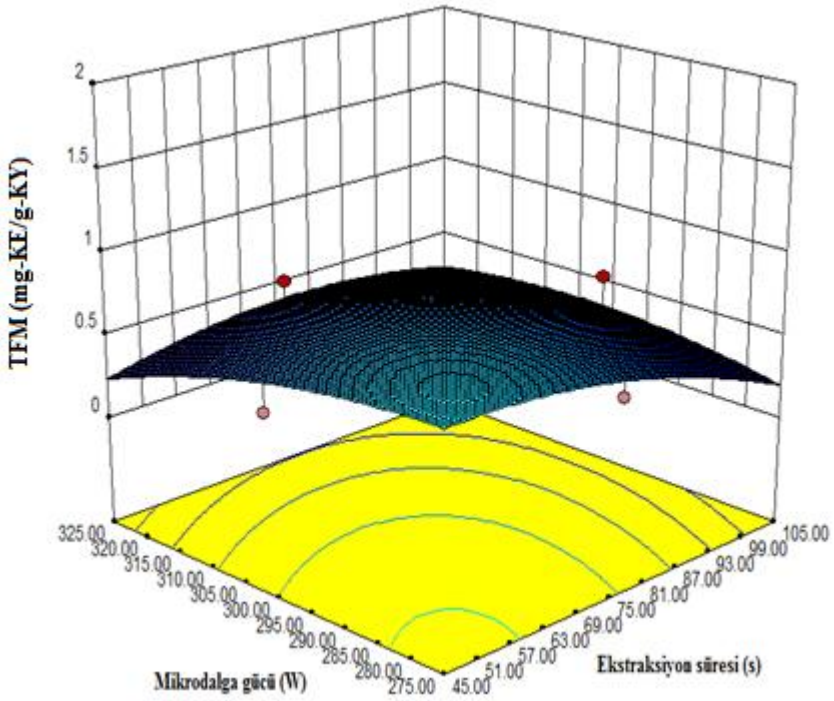
Farklı bağımsız değişkenler ve onların cevap üzerine etkisi arasındaki etkileşimi tahmin etmek için, üç boyutlu yanıt yüzey eğrileri Şekil 4.25 – Şekil 4.30 sırasıyla Denklem 4.10 – Denklem 4.11'e göre çizilmiştir.

Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da, mandalina yapraklarından MDE yöntemiyle elde edilen TPM ve TFM üzerine sabit kuru yaprak miktarında (2 g), mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresi arasındaki etkileşimin etkisi gösterilmiştir.



Şekil 4.25: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit kuru malzeme miktarında (2 g) kullanılan süreye bağlı olarak mikrodalga gücünün ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.

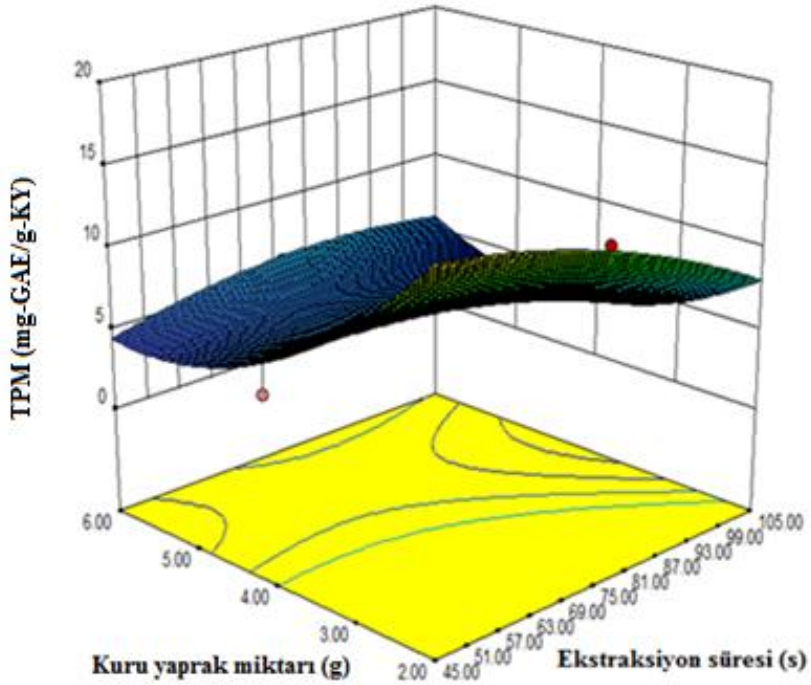
Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'ya göre, TPM ve TFM için ekstraksiyon verimleri belirli bir noktaya kadar mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin artışıyla artan bir eğilim göstermiştir. Ancak ilgili bağımsız değişkenlerin daha da artışıyla TPM ve TFM verimleri düşmeye başlamıştır. Périno-Issartier ve diğ. [112]'nin yalancı iğde bitkisinin (*Hippophae rhamnoides*) yan ürünlerinde MDE sonucunda elde edilen antioksidanları için aynı eğilimi gözlemlemişlerdir. Hayat ve diğ. [72] mandalina kabuklarından MDE ile başlangıçta mikrodalga gücünün 100' den 160 W'a artışıyla fenolik asitlerin arttığını, 160 W'ın üzerinde verimin düştüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmada olduğu gibi MDE sürecine ekstraksiyon süresinin etkisi ile ilgili olarak Pan ve diğ. [34] ve Karabegović ve diğ. [113] de benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Pan ve diğ. [34], yeşil çay yapraklarından kafein ekstraksiyonunda 4. dakikadan sonra düşüş belirlemişlerdir. Karabegović ve diğ. [113], karayemiş meyvesinin ektraksiyon verimininin 10. dakikadan 25. dakikaya ekstraksiyon süresinin artışı ile arttığını sonrasında süre artışıyla düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir.



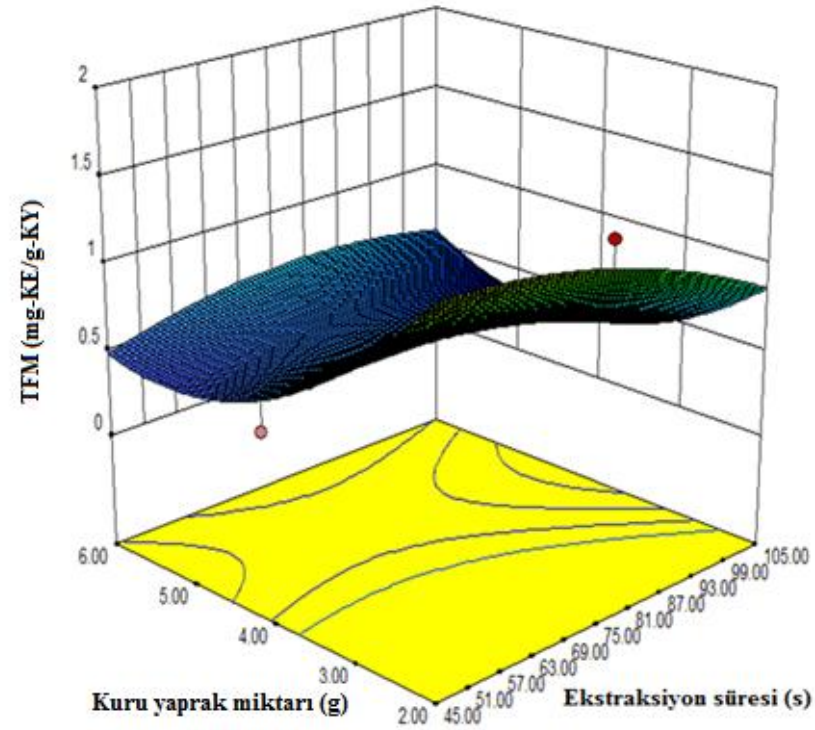
Şekil 4.26: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit kuru malzeme miktarında (2 g) kullanılan süreye bağlı olarak mikrodalga gücünün ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.

Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de, mandalina yapraklarından MDE yöntemiyle elde edilen TPM ve TFM üzerine sabit mikrodalga gücünde (275 W), ekstraksiyon süresi ve kuru yaprak miktarının etkisi gösterilmiştir. Ballard ve diğ. [76]'nin sonuçları ile uyumlu olarak, bu çalışmada TPM ve TFM verimlerinin ikisinde de kuru malzeme miktarının artışı ile düşüş görülmüştür. Ballard ve diğ. [76], yer fıstığı kabuklarının 1.5 g'dan 3.5 g'a artışı ile ekstraktlardaki TPM yüzdesinin %35.8 azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu olgu örnek kütlesini artırmanın ekstraksiyon sürecinde temas yüzey alanını azalttığı gerçeğiyle açıklanmıştır.

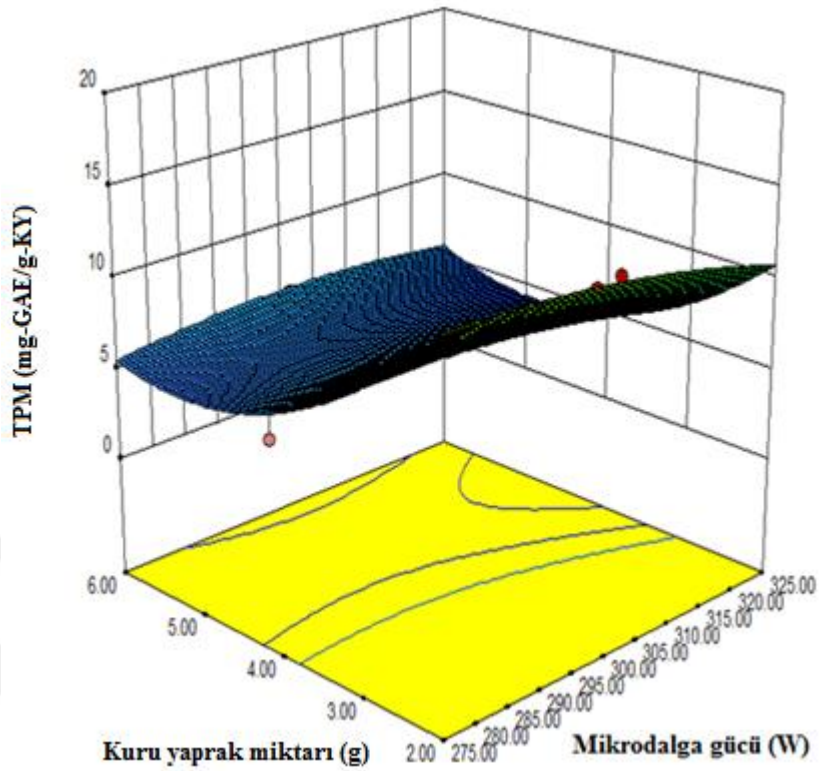
MDE ile mandalina yapraklarından elde edilen ekstraktların TPM ve TFM verimine, sabit ekstraksiyon süresinde (45 s), mikrodalga gücü ve kuru yaprak miktarının etkisi Şekil 4.29 ve Şekil 4.30'da gösterilmiştir. Analiz edilen TPM ve TFM veriminin her ikisi de daha önceki paragrafta açıklandığı gibi kuru yaprak miktarının artışıyla azalırken, mikrodalga gücü ile artmaktadır.



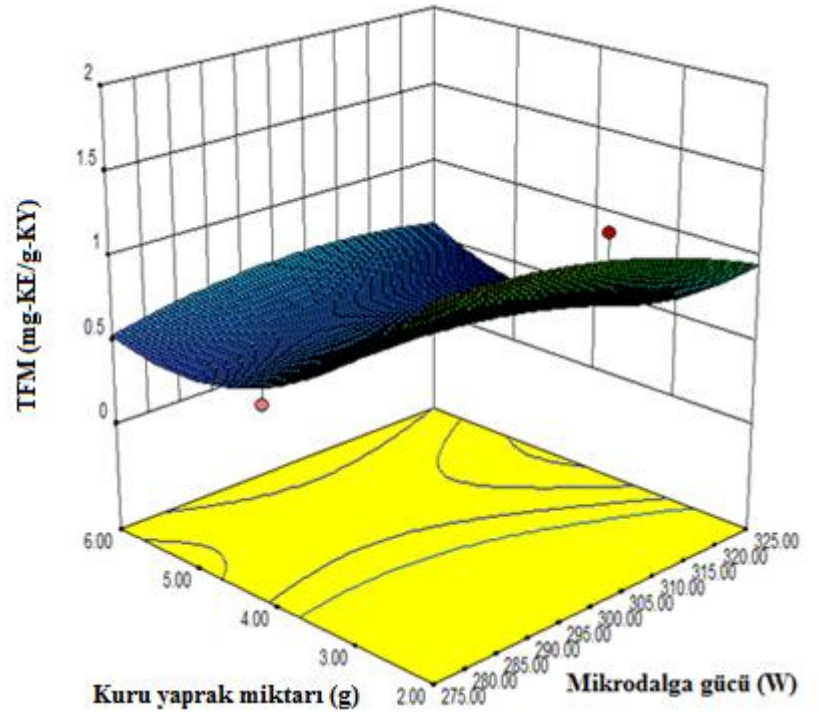
Şekil 4.27: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit mikrodalga gücünde (275 W) kullanılan süreye bağlı olarak kuru yaprak miktarının ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



Şekil 4.28: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit mikrodalga gücünde (275 W) kullanılan süreye bağlı olarak kuru yaprak miktarının ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.



Şekil 4.29: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit ekstraksiyon süresinde (45 s) kullanılan mikrodalga gücüne bağlı olarak kuru yaprak miktarının ektrakte edilen TPM miktarına etkisi.



Şekil 4.30: Mandalina yapraklarından MDE ile ekstraksiyonunda sabit ekstraksiyon süresinde (45 s) kullanılan mikrodalga gücüne bağlı olarak kuru yaprak miktarının ektrakte edilen TFM miktarına etkisi.

Ayrıca mandalina yaprakları için YYM ile yapılan optimizasyonda TPM ve TFM, DPPH, ABTS ve CUPRAC değerleri optimum nokta olarak seçilmiş ve istenilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum noktalar bulunmuştur (Tablo 4.21).

Tablo 4.21: Mandalina yaprakları için MDE'de istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.

No	X_1 (s)	X_2 (W)	X_3 (g)	TPM (mg-GAE/g)	TFM (mg-KE/g)	DPPH (mg-TEAK/g)	ABTS (mg-TEAK/g)	CUPRAC (mg-TEAK/g)	İstenilirlik
1	45.000	275.000	2.000	15.310	1.713	0.591	0.456	2.069	0.868

4.3.1. MDE ile Mandalina Yapraklarından CUPRAC, DPPH ve ABTS Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi

Antioksidan aktivite, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla meydana gelen karmaşık bir proses olduğu için bu çalışmada DPPH, ABTS ve CUPRAC olarak üç tamamlayıcı analizler gerçekleştirilmiştir [109]. Tablo 4.22, mandalina yapraklarından MDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların istatistiksel analizleriyle elde edilen antioksidan aktivitelerini göstermektedir. Elde edilen DPPH, ABTS ve CUPRAC verileri troloks eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir. Mandalina yapraklarından çeşitli koşullar altında mikrodalga yöntemiyle elde edilen ekstraktlar için CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan kapasitesi 0.399 ve 2.302 mg-TEAK/g-KY arasında değişmiştir. Aynı koşullar altında, DPPH değerleri 0.070-0.654 arasında iken, ABTS değerleri 0.113'den 0.492 mg-TEAK/g-KY arasında değişim göstermiştir. CUPRAC analizi sonucunda elde edilen antioksidan aktivitesi değerleri DPPH ve ABTS'ye göre daha yüksek olduğu görülmüştür [110,111].

Tablo 4.22: Mandalina yapraklarından MDE yöntemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite analiz sonuçları.

Deney No	Bağımsız Değişkenler			Deneysel Sonuçlar		
	X_1 (s)	X_2 (W)	X_3 (g)	CUPRAC (mg-TEAK/g-KY)	DPPH (mg-TEAK/g-KY)	ABTS (mg-TEAK/g-KY)
1	75	300	2	1.584	0.630	0.385
2	75	300	4	0.675	0.210	0.189
3	75	300	4	0.675	0.210	0.189
4	45	325	6	0.440	0.166	0.149
5	105	325	6	0.550	0.191	0.154
6	75	275	4	0.504	0.196	0.143
7	45	275	6	0.539	0.197	0.188
8	105	300	4	0.583	0.227	0.143
9	105	325	2	0.695	0.256	0.176
10	105	275	6	0.474	0.182	0.128
11	105	275	2	0.597	0.087	0.185
12	45	300	4	0.399	0.070	0.113
13	75	325	4	0.562	0.136	0.162
14	75	300	4	0.675	0.210	0.189
15	45	325	2	1.011	0.250	0.229
16	75	300	4	0.675	0.210	0.189
17	75	300	4	0.675	0.210	0.189
18	75	300	4	0.675	0.210	0.189
19	75	300	6	0.707	0.201	0.144
20	45	275	2	2.302	0.654	0.492

4.4. SAE ile Mandalina Yapraklarından Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi

Bağımsız değişken olarak seçilen 3 faktör ve YYM ile belirlenmiş seviyeleri (alt, orta ve üst) ve kodlanmış değerleri Tablo 4.23'de verilmiştir. Optimizasyon için gerekli deney düzeni Design Expert programı kullanılarak FCCD deneme planı ile Tablo 4.24'de gösterilmiştir. Design Expert programı kullanılarak, TPM ve TFM için ANOVA analizleri Tablo 4.25'de verilmiştir.

Tablo 4.23: Mandalina yapraklarının SAE için belirlenen bağımsız değişkenlerin seviye ve sembolleri.

Bağımsız Değişkenler	Birim	Bağımsız Değişken Sembolleri	Kodlanmış Değerler		
			-1	0	1
Ekstraksiyon sıcaklığı	ºC	X_1	50	75	100
Ekstraksiyon basıncı	bar	X_2	100	150	200
Etanol debisi	mL/dk	X_3	0.25	0.50	0.75

Design Expert programı kullanılarak, mandalina yapraklarından elde edilen TPM ve için ANOVA analizleri Tablo 4.25'de verilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı, SAE ile elde edilen TPM'yi etkileyen en önemli bağımsız değişken olurken (p<0.0001), bu durumu takip eden diğer interaksiyon ve kuadradik değişkenler X_1X_2, X_1X_3 ve X_1^2'sidir (p<0.05). Diğer yandan TFM ekstraksiyonunu etkileyen tek ve en önemli bağımsız değişken ekstraksiyon sıcaklığıdır (p<0.05). ANOVA sonuçları aynı zamanda, deneysel veriler ile hesaplanan modeller TPM için 0.904 ve TFM için 0.569 korelasyon katsayılarına (R^2) sahip olduğunu göstermiştir (Tablo 4.26).

Tablo 4.24: SAE ile elde edilen TPM ve TFM için FCCD deneme planı ve sonuçları.

Deney No	Bağımsız Değişkenler			Deneysel Sonuçlar	
	X_1 (ºC)	X_2 (bar)	X_3 (mL/dk)	TPM (mg-GAE/g-KY)	TFM (mg-KE/g-KY)
1	50	100	0.25	43.054	8.836
2	100	100	0.25	17.582	1.953
3	50	200	0.25	94.992	7.670
4	100	200	0.25	15.879	1.666
5	50	100	0.75	29.217	4.167
6	100	100	0.75	42.267	5.377
7	50	200	0.75	61.465	12.097
8	100	200	0.75	26.945	3.596
9	50	150	0.50	45.259	6.087
10	100	150	0.50	20.602	2.214
11	75	100	0.50	31.707	3.010
12	75	200	0.50	17.380	5.223
13	75	150	0.25	12.209	1.382
14	75	150	0.75	27.952	9.179
15	75	150	0.50	25.603	4.715
16	75	150	0.50	25.603	4.715
17	75	150	0.50	25.603	4.715
18	75	150	0.50	25.603	4.715
19	75	150	0.50	25.603	4.715
20	75	150	0.50	25.603	4.715

X_1: Ekstraksiyon sıcaklığı, X_2: Ekstraksiyon basıncı, X_3: Etanol debisi, KY: Kuru Yaprak.

Tablo 4.25: Mandalina yapraklarına uygulanan SAE için TPM ve TFM üzerine uygulanan lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerin etkisini gösteren ANOVA tablosu.

Kaynak	Kareler toplamı	Dağılma faktörü	Kareler ortalaması	F değeri	p-değeri
Model (**TPM**)	6088.99	9	676.55	10.42	<0.0005
X_1-Ekstraksiyon sıcaklığı	2271.42	1	2271.42	35.00	<0.0001
X_2-Ekstraksiyon basıncı	279.13	1	279.13	4.30	<0.0649
X_3-Etanol debisi	1.71	1	1.71	0.026	0.8744
X_1X_2	1280.47	1	1280.47	19.73	0.0013
X_1X_3	863.53	1	863.53	13.31	0.0045
X_2X_3	138.69	1	138.69	2.14	0.1745
X_1^2	451.25	1	451.25	6.95	0.0249
X_2^2	53.79	1	53.79	0.83	0.3840
X_3^2	0.004431	1	0.004431	0.00006827	0.9936
Kalıntı	649.00	10	64.90		
Model Uygunsuzluğu	649.00	5	129.80		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	6737.99	19			
Model (**TFM**)	79.29	3	26.43	7.04	0.0031
X_1-Ekstraksiyon sıcaklığı	57.85	1	57.85	15.40	0.0012
X_2-Ekstraksiyon basıncı	4.78	1	4.78	1.27	0.2761
X_3-Etanol debisi	16.66	1	16.66	4.44	0.0513
Kalıntı	60.09	16	3.76		
Model Uygunsuzluğu	60.09	11	5.46		
Saf hata	0.000	5	0.000		
Toplam	139.38	19			

X_1: Ekstraksiyon sıcaklığı, X_2: Ekstraksiyon basıncı, X_3: Etanol debisi.

Tablo 4.26: SAE yöntemi kullanılarak mandalina yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

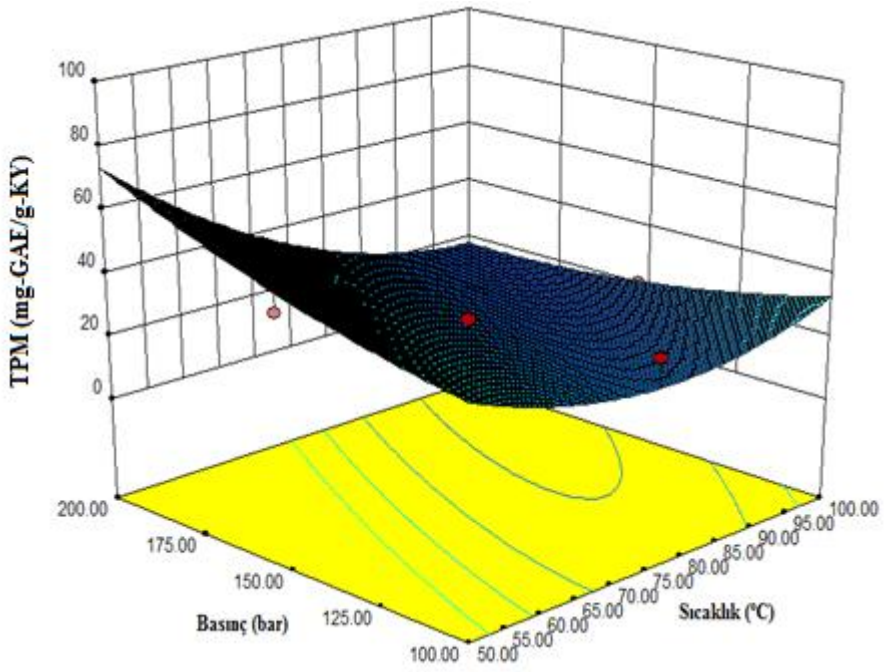
Bağımlı Değişkenler	R^2	R^2_a	CV	AP	SD.
TPM (mg-GAE/g-KY)	0.904	0.817	25.17	13.381	8.06
TFM (mg-KE/g-KY)	0.569	0.488	38.47	10.124	1.94

YYM kullanılarak, mandalina yapraklarından SAE yöntemiyle elde edilen ekstraktların TPM ve TFM için kuadratik modeller sırasıyla verilmiştir. TPM ve TFM için bulunan kuadratik denklemler Denklem 4.12 ve Denklem 4.13'de verilmiştir:

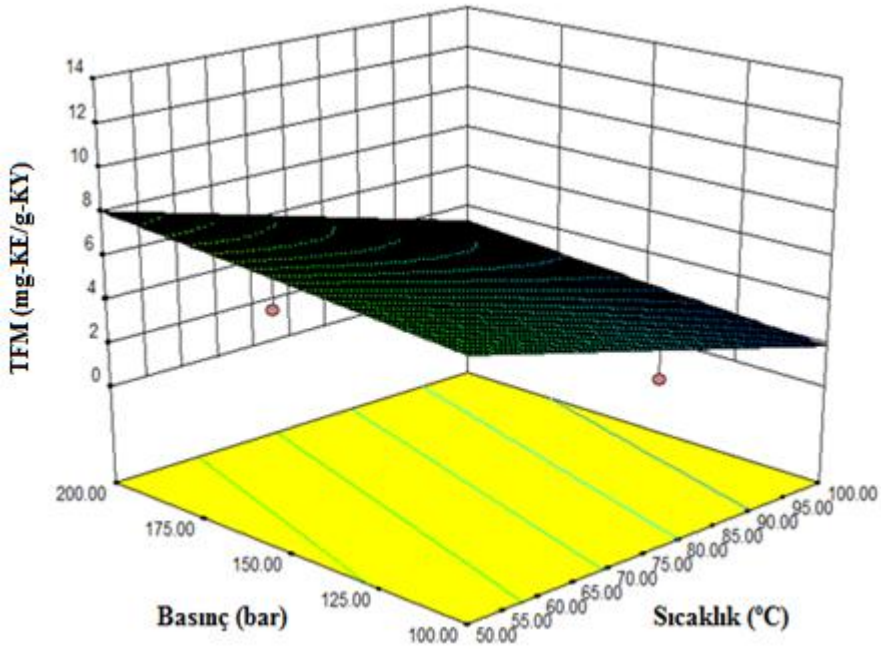
$$TPM = +130.372 - 2.990X_1 + 0.501X_2 - 72.415X_3 - 0.010X_1X_2 + 1.662X_1X_3 - 0.333X_2X_3 + 0.021X_1^2 + 0.002X_2^2 - 0.642X_3^2 \quad (4.12)$$

$$TFM = +7.598 - 0.096X_1 + 0.014X_2 + 5.163X_3 \quad (4.13)$$

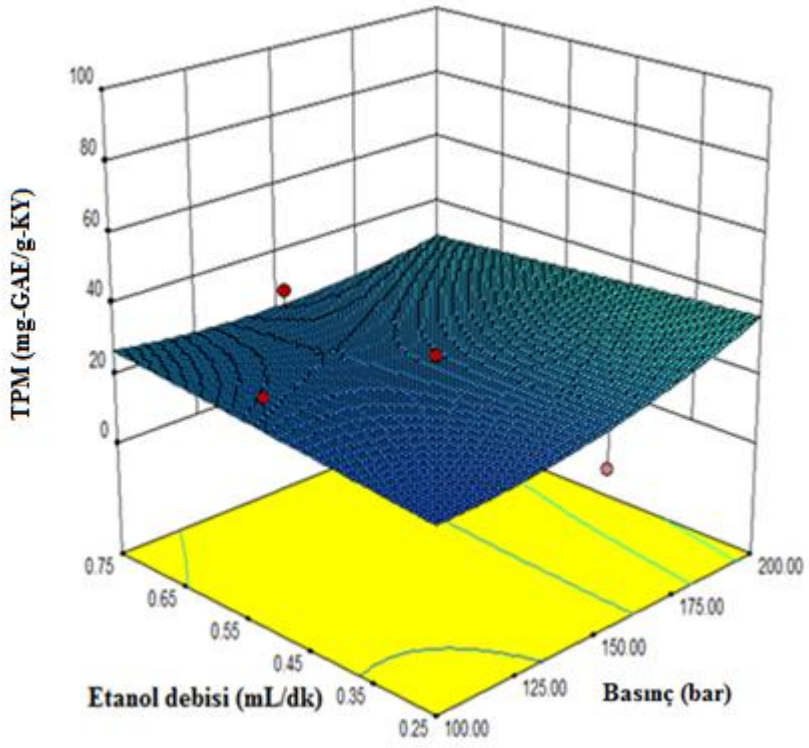
Farklı bağımsız değişkenler ve onların cevap üzerine etkisi arasındaki etkileşimi tahmin etmek için, üç boyutlu yanıt yüzey eğrileri Şekil 4.31 - Şekil 4.35 sırasıyla Denklem 4.12 - Denklem 4.13'e göre çizilmiştir.



Şekil 4.31: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit etanol debisinde (0.50 mL/dk) kullanılan sıcaklığa bağlı olarak basıncın ektrakte edilen TPM miktarına etkisi.



Şekil 4.32: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit etanol debisinde (0.50 mL/dk) kullanılan sıcaklığa bağlı olarak basıncın ektrakte edilen TFM miktarına etkisi.

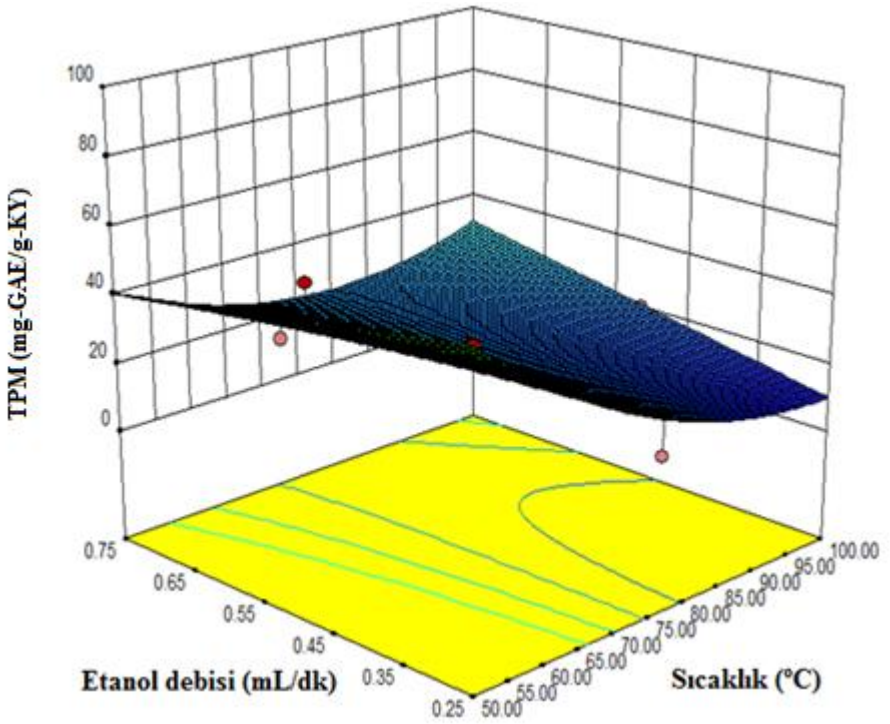


Şekil 4.33: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit sıcaklıkta (75 ºC) kullanılan basınca bağlı olarak etanol debisinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.

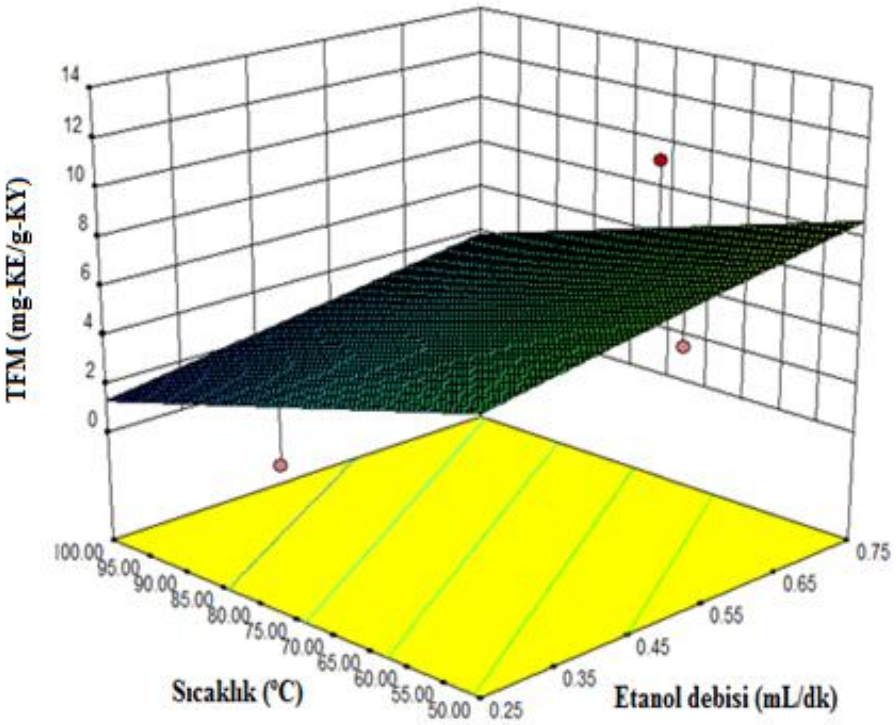
Şekil 4.31 ve Şekil 4.32' de, mandalina yapraklarından SAE yöntemiyle elde edilen TPM ve TFM üzerine sabit EtOH debisinde (0.50 mL/dk), ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon basıncı arasındaki etkileşimin etkisi gösterilmiştir. Şekil 4.31'de görüldüğü gibi, mandalina yapraklarındaki TPM verimi çözücü yoğunluğunun artışı sonucunda basıncın etkisi ile yükselmiştir. Ekstraksiyon, çözünme gücünün artışına neden olan basınç artışıyla geliştirilmiştir [114]. Diğer yandan, TPM içeriği başlangıçta sıcaklıkla azalmış ardından artmaya başlamıştır. Bu durum akışkan yoğunluğu ve çözünen buhar basıncı arasındaki karmaşık dengenin her ikisi de çözücü karışımının sıcaklık ve basıncı tarafından kontrol edilmesi sonucu ile açıklanabilir. Şekil 4.32, mandalina yapraklarındaki TFM verimi sıcaklık artışıyla düşüş göstermiştir. Bunun nedeni, ısı ve ışığa duyarlı flavonoid bileşenlerinin ısı etkisiyle bozunması ile açıklanabilir.

Şekil 4.33, mandalina yapraklarından SAE yöntemiyle elde edilen TPM üzerine sabit sıcaklıkta (75ºC), EtOH debisi ve basınç arasındaki etkileşimin etkisi gösterilmiştir. Genellikle ekstraksiyon verimi yardımcı çözücü olarak kullanılan EtOH'nin artışıyla artmıştır çünkü sıvı fazdaki çözünen-yardımcı çözücü etkileşimleri sonucunda çözünen CO_2 çözünürlüğü arttığı içindir. Bu nedenle hedef bileşenlerin desorpsiyonuna olanak sağlar [44,114-117].

Şekil 4.34 ve Şekil 4.35, mandalina yapraklarından SAE yöntemiyle elde edilen TPM ve TFM üzerine sabit basınçta (150 bar), EtOH debisi ve sıcaklık arasındaki etkileşimin etkisi gösterilmiştir. Bağımsız değişkenlerin her ikisi de yukarıda açıklandığı gibi TPM sisteminden etkilenmiştir (Şekil 4.34). Beklendiği gibi, sıcaklık SAE verimi için elverişsiz bir değişken iken, yardımcı çözücü olan etanol debisi artışı flavonoid içeriğini geliştirmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.34: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit basınçta (150 bar) kullanılan sıcaklığa bağlı olarak etanol debisinin ekstrakte edilen TPM miktarına etkisi.



Şekil 4.35: Mandalina yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda sabit basınçta (150 bar) kullanılan etanol debisine bağlı olarak sıcaklığın ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi.

Ayrıca mandalina yaprakları için YYM ile yapılan optimizasyonda TPM ve TFM, DPPH, ABTS ve CUPRAC değerleri optimum nokta olarak seçilmiş ve istenilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum noktalar bulunmuştur (Tablo 4.27).

Tablo 4.27: Mandalina yaprakları için SAE için istenilirlik fonksiyonu ile belirlenen optimum noktalar.

No	X_1 (°C)	X_2 (bar)	X_3 (mL/dk)	TPM (mg-GAE/g)	TFM (mg-KE/g)	DPPH (mg-TEAK/g)	ABTS (mg-TEAK/g)	CUPRAC (mg-TEAK/g)	İstenilirlik
1	50.000	200.000	0.250	87.749	6.843	0.379	0.324	0.917	0.658

4.4.1. SAE ile Mandalina Yapraklarından CUPRAC, DPPH ve ABTS Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyon Sonuçlarının İncelenmesi

Tablo 4.28, mandalina yapraklarından SAE yöntemiyle elde edilen ekstraktların istatistiksel analizleriyle elde edilen antioksidan aktivitelerini göstermektedir. ABTS (r=0.945/0.0.986, p=0.05) ve DPPH (r=0.865/0.941, p=0.05) ile karşılaştırıldığında, TPM/TFM ve CUPRAC (r=0.971/0.990, p=0.05)arasındaki yüksek etkileşim gözlemlenmiştir. SAE söz konusu olduğunda mandalina yapraklarındaki ABTS değeri TPM/TFM (r=0.690/0.833) ile yüksek etkileşim göstermiştir ve bunu DPPH (r=0.681/0.687) ve CUPRAC takip etmektedir (r=0.522/0.112).

Tablo 4.28: Mandalina yapraklarından SAE yöntemiyle elde edilen ekstraktların antioksidan kapasite analiz sonuçları.

Deney No	Bağımsız Değişkenler			Deneysel Sonuçlar		
	X_1 (^oC)	X_2 (bar)	X_3 (mL/dk)	CUPRAC (mg-TEAK/g-KY)	DPPH (mg-TEAK/g-KY)	ABTS (mg-TEAK/g-KY)
1	50	100	0.25	0.468	0.254	0.479
2	100	100	0.25	0.716	0.030	0.195
3	50	200	0.25	1.167	0.268	0.476
4	100	200	0.25	0.565	0.086	0.230
5	50	100	0.75	0.140	0.145	0.451
6	100	100	0.75	0.386	0.304	0.594
7	50	200	0.75	0.208	0.344	0.686
8	100	200	0.75	0.307	0.224	0.377
9	50	150	0.50	0.372	0.265	0.517
10	100	150	0.50	0.507	0.115	0.260
11	75	100	0.50	0.449	0.130	0.409
12	75	200	0.50	0.241	0.195	0.323
13	75	150	0.25	0.356	0.088	0.233
14	75	150	0.75	0.213	0.204	0.507
15	75	150	0.50	0.364	0.055	0.336
16	75	150	0.50	0.364	0.055	0.336
17	75	150	0.50	0.364	0.055	0.336
18	75	150	0.50	0.364	0.055	0.336
19	75	150	0.50	0.364	0.055	0.336
20	75	150	0.50	0.364	0.055	0.336

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, UDE, SAE ve MDE ile mandalina kabuk ve yapraklarından antioksidan maddelerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Modern ekstraksiyon yöntemleri olarak adlandırılan UDE, SAE ve MDE yöntemleri ile mandalina kabuk ve yapraklarından antioksidan maddelerin ekstraksiyonu YYM kullanılarak optimize edilmiştir.

Mandalina kabuk ve yapraklarından su ile yapılan UDE yöntemi ile elde edilen ekstraktlar için en yüksek TPM değerleri sırasıyla 68.419 mg-GAE/g-YK, 216.003 mg-GAE/g-KY ve TFM değerleri 3.200 mg-KE/g-YK ve 16.105 mg-KE/g-KY için optimum koşullar 6 cm prob dalma derinliği, %60 titreşim genliği, 3 saniye (açık/kapalı) titreşim süresi olarak saptanmıştır. TPM ve TFM miktarları üzerinde etkili en önemli parametre prob dalma derinliği olarak tespit edilmiştir. Buradaki en dikkat çekici nokta, mandalina yaprak ekstraktlarında bulunan antioksidan kapasitesinin kabuk ekstraktlarındaki kapasiteye kıyasla dört misli olarak gözlemlenmesidir. Bu durum mandalina yapraklarının yüksek fenolik ve flavonoid içeriğinden kaynaklanmaktadır. DPPH değeri, kabuk ekstraktındaki TPM ile yüksek derecede ilişki gösterirken, TFM ve ekstraktların antioksidan aktivitesi arasında çok zayıf bir ilişki olduğu gözlenmiştir, bu da mandalina kabuklarında bulunan toplam fenolik madde miktarının, antioksidan kapasitesine daha fazla katkıda bulunduğunu ortaya koymuştur. Yaprak ekstraktlarındaki TPM ve TFM değerleri, CUPRAC yöntemiyle elde edilen antioksidan kapasite değerleri ile yüksek oranda ilişkili iken, hem DPPH hem de ABTS yöntemleri ile bulunan değerler ile daha az ilişki göstermiştir.

Bir başka çözücü metanol ile mandalina kabuk ve yapraklarından UDE yöntemi ile elde edilen ekstraktlar için ise en yüksek TPM değerleri sırasıyla 42.623 mg-GAE/g-YK, 42.914 mg-GAE/g-KY ve TFM değerleri 1.079 mg-KE/g-YK ve 3.570 mg-KE/g-KY için optimum koşullar kabuklar için 5 cm prob dalma derinliği, %33.296 titreşim genliği, 3.754 saniye (açık/kapalı) titreşim süresi, yapraklar için için 5 cm prob dalma derinliği, %60 titreşim genliği, 3.453 saniye (açık/kapalı) titreşim süresi olarak saptanmıştır. Bu çalışmada kabuk ve yaprak ekstraktlarının TPM ve TFM miktarları üzerinde etkili en önemli parametrenin titreşim genliği olduğu saptanmıştır. Kabuk ve yapraklardan elde edilen antioksidan kapasite hemen hemen aynı iken, yaprakların TFM içeriği kabuklarınkinin 3.30 katıdır. CUPRAC analizi

sonucunda elde edilen antioksidan aktivitesi değerleri DPPH ve ABTS'ye göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Kabuk ekstraktlarındaki, TPM içeriği ile CUPRAC değeri arasında yüksek ilişki var iken bu ilişkiyi DPPH ve ABTS izlemiştir. Yaprak ekstraktlarındaki, TPM içeriği ile CUPRAC değeri arasında yüksek ilişki var iken bu ilişkiyi sırasıyla ABTS ve DPPH izlemiştir.

MDE yönteminde mandalina yapraklarının ekstraksiyonunda en yüksek oranda TPM 18.665 mg-GAE/g-KY ve TFM 1.858 mg-KE/g-KY değerlerinin elde edilmesi için gerekli optimum çalışma koşulları 275 W mikrodalga ışın gücü, 2 g kuru mandalina yaprağı ve 45 saniye süre olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bu kısmında ekstraksiyon süresi ($p<0.05$) ve kuru yaprak miktarının ($p<0.0001$) elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi üzerinde etkili en önemli parametreler olduğu belirlenmiştir. MDE ekstraktlarında belirlenen TPM ve TFM değerlerinin, antioksidan kapasite miktarları ile yüksek oranda ilişkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

SAE yöntemi açısından bakıldığında ise, mandalin yapraklarının ekstraksiyonunda en yüksek TPM 94.992 mg-GAE/g-KY ve TFM 12.097 mg-KE/g-KY değerlerini elde etmek için optimum koşullar 50 ºC sıcaklık, 200 bar basınç ve 0.25 mL/dakika yardımcı çözücü EtOH debisi olarak bulunmuştur. TPM ve TFM miktarları üzerinde etkili en önemli parametre ekstraksiyon sıcaklığı olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak;

UDE yönteminde, TPM ve TFM açısından en iyi performans çözücü olarak suyun yaprakların ekstraksiyonunda kullanıldığı denemelerde elde edilmiştir. Antioksidan aktivite açısından ise MeOH ün yapraklar için kullanıldığı denemeler en iyi sonucu vermiştir. Ancak çevre kirliliği veya çözücünün geri kazanımında gerekli ekipmanın sağlanması için gereken maliyet açısından çözücü olarak su seçiminin doğru olabileceğini söyleyebiliriz.

UDE yönteminin MDE yönteminden daha etkili olduğu belirlenmiştir. UDE yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktın TPM, TFM ve antioksidan aktivite değerlerinin, MDE yöntemiyle elde edilen TPM, TFM ve antioksidan aktivite değerlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak UDE yönteminde 40 mL çözücü harcanırken MDE yönteminde malzemenin nemlendirilmesi için çözücü kullanılmaktadır. Çözücü kullanımı açısından oldukça çevre dostu olan MDE yönteminde ekstrakt veriminin düşük çıkması açısından

çözücünün oldukça etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir. Ancak UDE yönteminde kullanılan prob ömrünün kısa ve prob maliyetinin yüksek olması ayrıca UDE uygulaması sırasında açığa çıkan sesin kullanıcı için işitme kaybına neden olabileceğini bilinmektedir. Bu iki yöntemden hangisinin tercih edileceği, üreticinin kullanım amacına göre değişecektir.

MDE yöntemi ve SAE yöntemini kıyaslayacak olursak, SAE yöntemiyle elde edilen TPM, TFM ve antioksidan aktivite değerleri açısından MDE yöntemine göre daha avantajlıdır. SAE yönteminde 15 mL yardımcı çözücü etanol kullanılırken MDE yönteminde çözücü kullanılmamaktadır. MDE yönteminin, solvent tüketimini kısıtlaması ve enerji kullanımını büyük miktarda azaltması yönünden SAE yöntemine göre oldukça avantajlıdır. Ancak MDE yöntemi sırasında açığa çıkan ısının kontrol edilmesi için soğutucu sistem gerekliliği maliyet gerektirir. Ayrıca ekstraksiyon hücrelerinin soğuması için uzun süre beklenilmesi ve temizlik işlemi gerektirmesi MDE yönteminin dezavantajlarındandır.

UDE yönteminin SAE yönteminden daha etkili olduğu belirlenmiştir. UDE yöntemi kullanılarak elde edilen ekstraktın TPM, TFM ve antioksidan aktivite değerlerinin, SAE yöntemiyle elde edilen TPM, TFM ve antioksidan aktivite değerlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Hem TPM ve TFM hem de antioksidan aktivite seviyeleri açısından tüm yöntemler içerisinde UDE yönteminin en iyi yöntem olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

[1]. Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E., 2006, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review, *Food Chemistry*, 98 (1), 136-148.

[2]. Serbest Radikal [online] https://bilimfili.com/serbest-radikal-nedir/, [Ziyaret Tarihi: 21 Haziran 2017].

[3]. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G.,1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2 (4), 152-159.

[4]. Contini, M., Baccelloni, S., Massantini, R., Anelli, G., 2008, Extraction of natural antioxidants from hazelnut (*Corylus avellana* L.) shell and skin wastes by long maceration at room temperature, *Food Chemistry*, 110 (3), 659-669.

[5]. Peschel, W., Sanchez-Rabaneda, F., Diekmann, W., Plescher, A., Gartzia, I., Jimenez, D., Lamuela-Raventos, R., Buxaderas, S., Codina, C., 2006, An Industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes, *Food Chemistry*, 97 (1), 137-150.

[6]. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri–industrial by–products: Antioxidant activity, occurance, and potential uses, *Food Chemistry*, 99 (1), 191-203.

[7]. Gökalp, N., 2006, *Doğal antioksidanlar*, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[8]. Hayouni, E. A., Abedrabba, M., BouixX, M., Hamdi, M., 2007, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*, 105 (3), 1126-1134.

[9]. Ma, Y.Q., Chen, J.C., Liu, D.H., Ye, X.Q., 2009, Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 57-62.

[10]. 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 acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Separation and purification technology*, 70, 63-70.

[11]. *Mandalina* [online] https://tr.wikipedia.org/wiki/Mandalina, [Ziyaret Tarihi: 10 Mayıs 2016].

[12]. *Citrus: World Markets and Trade* [online] https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf, [Ziyaret Tarihi: 10 Mayıs 2016].

[13]. *Mandarin Yetiştiriciliği* [online] http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/mandarin_yetistiriciligi.pdf, [Ziyaret Tarihi: 10 Mayıs 2016].

[14]. Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G.A. (Eds.), 2010, *Fruit and vegetable phytochemicals: Chemistry, nutritional value and stability*, United States: Wiley-Blackwell Publishing.

[15]. Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H., 2005,Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749-7759.

[16]. Mavi, A., Terzi, Z., Özgen, U., Yıldırım, A., Coşkun, M., 2004, Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae), *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27 (5), 702-705.

[17]. Prakash, A., 2001, Antioxidant activity, *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19 (2).

[18]. Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A., Adenan, I., 2007, Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans, *Food Chemistry*, 100, 1523-1530.

[19]. Wang, Y. and Ho, C.T., 2009, Polyphenolic chemistry of tea and coffee: A century of progress, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8109-8114.

[20]. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., Rahmat, A, 2010, Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *Molecules*, 15, 4324-4333.

[21]. Hall, E.D., Vaishnav, R.A., Mustafa, A.G., 2010, Antioxidant therapies for traumatic brain injury, *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, Inc., 17, 51-61.

[22]. Singleton, V.L, Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.

[23]. Jaganath, I.B. and Crozier A., 2010, *Dietary flavonoids and phenolic compounds, In: Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition, and pharmacology*, Fraga, C.G. (Ed.), pp. 5-27, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Publication.

[24]. Scalbert, A. and Williamson, G., 2000, Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, *The Journal of Nutrition*, 130 (8), 2073-2085.

[25]. Pietta, P.G., 2000, Flavonoids as Antioxidants, *Journal of Natural Products*, 63, 1035–1042.

[26]. Harborne, J.B. and Williams, C.A., 2000, Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55, 481–504.

[27]. Klejdus, B., Vitamvasova D., Kuban, V., 2001, Identification of isoflavone conjugates in red clover (Trifolium pratense) by liquid chromatography-mass spectrometry after two-dimensional solid-phase extraction, *Analytica Chimica Acta*, 450, 81-97.

[28]. Rauha, J.P., Vuorela H., Kostiainen R., 2001, Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure photoionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 1269-1280.

[29]. Tsao R. and Deng Z., 2004, Separation Procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals, *Journal of Chromatography B*, 812, 85-99.

[30]. de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A., 2006, Analytical separation and detection methods for flavonoids, *Journal of Chromatography A*, 1112 (1-2), 31-63.

[31]. Harnly, J.M., Doherty, R.F., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Bhagwat, S.A., Gebhardt, S.E., 2006, Flavonoid content of US fruits, vegetables, and nuts, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 54, 9966–9977.

[32]. Hurst, W.J. (Ed.), 2007, *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals*, Florida: CRC Press.

[33]. Anderson, O.M. and Jordheim, M., 2006, The anthocyanins, In: Anderson, O.M., Markham, K.R., editors, Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications, Boca Raton, *FL: CRC Press/Taylor & Francis Group*, pp. 472–551.

[34]. Pan, X., Niu, G., Liu, H., 2003, Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, *Chemical Engineering and Processing*, 42, 129-133.

[35]. Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999, Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, 401-436.

[36]. https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf, [Ziyaret Tarihi: 20 Mayıs 2016].

[37]. http://www.naturalremedies.org/gallic-acid/, [Ziyaret Tarihi: 20 Mayıs 2016].

[38]. http://www.livestrong.com/article/415007-what-nuts-have-ellagic-acid/, Ziyaret Tarihi: 20 Mayıs 2016].

[39]. Del Rio, D., Costa, L.G., Lean, M.E.J., Crozier, A., 2010, Polyphenols and health: What compounds are involved?, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 1, 20-6.

[40]. ://www.livestrong.com/article/504699-what-does-peanut-butter-do-to-an-alzheimers-patient/, [Ziyaret Tarihi: 20 Mayıs 2016].

[41]. Dastmalchi, K., Dorman, D., Oinonen, P.P., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R., 2008, Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract, *Elsevier-LWT*, 41, 391-400.

[42]. Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H., 2009, Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4988-4994.

[43]. Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006, Supercritical CO_2 extraction and purification of compounds with antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 54, 2441-2469.

[44]. Wang, L. And Weller, C. L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology,* 17, 300-312.

[45]. Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2010, Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples, *Molecules,* 15, 8813-8826.

[46]. Feng, H., Barbosa-Cánovas, G. V., Weiss, J., 2011, *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*, Springer, New York.

[47]. Kim, S. and Zayas, J., 1989, Processing parameters of chymosin extraction by ultrasound, *Journal of Food Science,* 54, 700-703.

[48]. Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G., 2003, Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, *Journal of Chromatography A,* 1012, 119-128.

[49]. Chowdhury, P., Viraraghavan, T., 2009, Sonochemical degradation of chlorinated organic compounds, phenolic compounds and organic dyes-a review, *Science of The Total Environment,* 407, 2474-2492.

[50]. Mitra, S., 2004, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley, New York.

[51]. Londoño-Londoño, J., de Limac, V.R., Laraa, O., Gila, A., Beatriz, T., Pasac, C., Arangoa, G.J., Pinedab, J.R.R., 2010, Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method, *Food Chemistry,* 119 (1), 81-87.

[52]. Şahin, S. and Şamlı, R., 2013, Optimization of Olive Leaf Extract Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction with Response Surface Methodology, *Ultrasonics Sonochemistry,* 20, 595-602.

[53]. Virot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C.M.C.G., Chema, F., 2010, Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction, *Ultrasonics Sonochemistry,* 17 (6), 1066-1074.

[54]. İlbay, Z., Şahin, S., Kırbaşlar, Ş.İ., 2013, Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2804–2809.

[55]. Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X., 2008, Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran, *Food Chemistry,* 106, 804-810.

[56]. Ötleş, S., 2009, *Handbook of Food Analysis Instruments*, CRC Press, Washington.

[57]. McHugh, M.A. and Krukonis, V.J., 1994, *Supercritical Fluid Extraction (2nd Edition)*, Butterworth-Heinemann, Boston.

[58]. Lang, Q. and Wai, C.M., 2001, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-a practical review, *Talanta*, 53, 771-782.

[59]. Dean, J. R., 2010, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, Wiley, New York.

[60]. Wheeler, J.R. and McNally, M.E., 1989, Supercritical Fluid Extraction and Chromatography of Representative Agricultural Products with Capillary and Microbore Columns, *Journal of Chromatographic Science*, 27, 534-539.

[61]. 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.

[62]. Adil, İ.H., Çetin, H.İ., Yener, M.E., Bayındırlı, A., 2007, Subcritical (carbon dioxide+ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts, *The Journal of Supercritical Fluids*, 43, 55-63.

[63]. Turner, C., 2006, *Modern extraction techniques: food and agricultural samples*, American Chemical Society.

[64]. Kirbaşlar, Ş.İ., Gök, A., Kirbaşlar, F.G., Tepe, S., 2012, Volatiles in Turkish clementine (Citrus clementina Hort.) peel, *Journal of Essential Oil Research*, 24 (2), 153-157.

[65]. Abbasi, H., Rezaei, K., Emamdjomeh, Z., Mousavi, S.M.E., 2008, Effect of various extraction conditions on the phenolic contents of pomegranate seed oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 435-440.

[66]. Şahin, S., Bilgin, M., Dramur, M.U., 2011, Investigation of Oleuropein Content in Olive Leaf Extract Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Soxhlet Methods, *Separation Science and Technology*, 46, 1829–1837.

[67]. Gelmez, N., Kıncal, N.S., Yener, M.E., 2009, Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts, *The Journal of Supercritical Fluids*, 48 (3), 217-224.

[68]. Ghafoor, K., Park, J., Choib,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.

[69]. Şahin, S. and Bilgin, M., 2012, Study on Oleuropein Extraction from Olive Tree (Olea europaea) Leaves by means of SFE: Comparison of Water and Ethanol as Co-Solvent, *Separation Scence and Technology*, 47, 2391-2398.

[70]. Camel, V., 2001, Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst*, 126, 1182-1193.

[71]. Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., Kung, F. W.-L., 2011, Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants, *Journal of Chromatography A*, 1218, 6213-6225.

[72]. 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 acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Separation and Purification Technology*, 70, 63.

[73]. Li, H., Denga, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R., 2012, Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes, *Food Chemistry*, 130 (4), 928-936.

[74]. Şahin, S., 2015, A novel technology for extraction of phenolic antioxidants from mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) leaves: Solvent-free microwave extraction, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 32 (5), 950-957.

[75]. Liazid, A., Guerrero, R.F., Cantos, E., Palma, M., Barroso, C.G., 2011, Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins, *Food Chemistry, 124 (3), 1238-1243.*

[76]. Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S., 2010, Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins, *Food Chemistry*, 120, 1185-1192.

[77]. Odabaş, H.İ., 2013, *Farklı Yöntemlerle Fındık Zarından Antioksidan Ekstaksiyonunun Optimizasyonu,* Yüksek Lisans, Ondokuz Mayıs Üniversitesi.

[78]. Koç, B. and Ertekin, F.K., 2010, Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, *Gıda,* 35, 63-70.

[79]. Box, G.E.P. and Wilson, K.B., 1951, On the experimental attainment of optimum conditions, *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13, 1-45.

[80]. Myers, R.H., Montgomery, D.C., Anderson-Cook, C.M., 2009, *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments,* Wiley, New York.

[81]. Malik, N.S.A. and Bradfort, J.M., 2006, Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives, *Science Horticulturae,* 110 (3), 274-278.

[82]. Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y., 2005, Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha), *Food Chemistry*, 89 (4), 569-575.

[83]. Yu, J., Wang, L.,Walzem, R.L., Miller, E.G., Pike, L.M., Patil, B.S., 2005, Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53 (6), 2009-2014.

[84]. Sun, Y., Ma, G., Ye, X., Kakuda, Y., Meng, R., 2010, Stability of all-trans-b-carotene under ultrasound treatment in a model system: Effects of different factors, kinetics and newly formed compounds, *Ultrasonics Sonochemistry,* 17, 654–661.

[85]. Pe´rez-Serradilla, J.A., Priego-Capote, F., de Castro, M.D.L., 2007, Simultaneous Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction of Polar and Nonpolar Compounds from Solid Plant Samples, *Analytical Chemistry,* 79 (17), 6767-6774.

[86]. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolarization assay, *Free Radical Biology and Medicine,* 26 (9-10),1231-1237.

[87]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S.E., 2008, Mechanism Of Antioxidant Capacity Assays And The Cuprac (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay, *Microchimica Acta,* 160 (4), 413-419.

[88]. Draper, N.R. and John, J.A., 1988, Response-surface designs for quantitative and qualitative variables, *Technometrics,* 30 (4), 423-428.

[89]. Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G.G., McHugh, T.H., 2011, Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 (5), 1249–1257.

[90]. İlbay, Z., Şahin,S., Kırbaşlar, Ş.İ., 2013, Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology, *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 93 (11), 2804–2809.

[91]. Suna, Y., Liub, Z., Wanga, J., 2011, Ultrasound-assisted extraction of five isoflavones from Iris tectorum Maxim, *Separation and Purification Technology,* 78 (1), 49–54.

[92]. Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, C.G., 2012, Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes, *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.

[93]. Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., 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.

[94]. Ahmad-Qasem, M.H., Cánovas, J., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Andrés Cárcel, J., García-Pérez, José V., 2013, Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound, *Innovative Food Science and Emerging Technology,* 17, 120–129.

[95]. Horžić, D., Jambrak, A.R., Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Lelas, V., 2012, Comparison of Conventional and Ultrasound Assisted Extraction Techniques of Yellow Tea and Bioactive Composition of Obtained Extracts, *Food and Bioprocess Technology,* 5 (7), 2858-2870.

[96]. Khan, M.K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, Anne-Sylvie, Dangles, O., Chemat, F., 2010, Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel, *Food Chemistry,* 119 (2), 851–858.

[97]. Ma, Y.Q., Chen, J.C., Liu, D.H., Ye, X.Q., 2008, Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel, *Journal of Food Science,* 73 (8), T115-T120.

[98]. Ma, Y., Ye, X., Hao, Y., Xu, G., Liu, D., 2008, Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel, *Ultrasonics Sonochemistry,* 15 (3), 227–232.

[99]. Wang, Y.-C., Chuang, Y.-C., Hsu, H.-W., 2008, The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan, *Food Chemistry,* 106 (1), 277–284.

[100]. Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Yu, D., 2011, Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans-β-carotene from citrus peels, *Ultrasonics Sonochemistry,* 18 (1), 243-249.

[101]. Hayat, K., Zhang, X., Farooq, U., Abbas, S., Xia, S., Jia, C., Zhong, F., Zhang, J., 2010, Effect of microwave treatment on phenolic content and antioxidant activity of citrus mandarin pomace, *Food Chemistry,* 123 (2), 423-429.

[102]. Hayat, K., Zhang, X., Chenc, H., Xia, S., Jia, C., Zhong, F., 2010, Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity, Separation and Purification Technology, 73 (3), 371-376.

[103]. Kırbaşlar, Ş.İ. and Kırbaşlar, F.G., 2006, Composition of Turkish Mandarin and Bergamot Leaf Oils, *Journal of Essential Oil Research,* 18 (3), 318327.

[104]. Bakar, J., Gadi, MA., Suhail, M., Md.Zaidul, I.S., Phenolics in Citrus hystrix leaves obtained using supercritical carbon dioxide extraction, *Food Research Journal,* 2011, 18 (3), 941-948.

[105]. Cavero, S., García-Risco, M.R., Marín, F.R., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns F.J., Reglero, G., Ibañez, E., 2006, Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano: Chemical and functional characterization via LC–MS and in vitro assays, *The Journal of Supercritical Fluids,* 38 (1), 62–69.

[106]. Roy, B.C., Hoshino, M., Ueno, H., Sasaki M., Goto, M., 2007, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of the Volatiles from the Peel of Japanese Citrus Fruits, *Journal of Essential Oil Research,* 19 (1), 78–84.

[107]. Beg, Q.K., Sahai, V., Gupta, R., 2003, Statistical media optimization and alkaline protease production from Bacillus mojavensis in a bioreactor, *Process Biochemistry,* 39 (2), 203-209.

[108]. Simpson, T.W., Poplinski, J.D.,. Koch, P.N, Allen, J.K., 2001, Metamodels for Computer-based Engineering Design: Survey and recommendations, *Engineering with Computers,* 17 (2), 129-150.

[109]. Chen, X., Zhang, Y., Zu, Y., Fu Y., Wang, W., 2011, Composition and biological activities of the essential oil from Schisandra chinensis obtained by solvent-free microwave extraction, *Food Science and Technology*, 44 (10), 2047-2052.

[110]. Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., Wang, H., 2008, Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods, *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6), 67-73.

[111]. Li, H., Wang, X., Li, P., Li, Y., Wang, H., 2009, Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines, *Food Chemistry*, 112 (2), 454-460.

[112]. Périno-Issartier, S., Zill-e-Huma, A.V., Abert-Vian, M., Chemat, F., 2011, Solvent Free Microwave-Assisted Extraction of Antioxidants from Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Food By-Products, *Food and Bioprocess Technology*, 4 (6), 1020-1028.

[113]. Karabegovic´, I.T., Stojičević, S.S., Veličković, D.T., Nikolić, N.Č., Lazić, M.L., 2014, Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Cherry Laurel Fruit, *Separation Science and Technology*, 49 (3), 416-423.

[114]. Martinez, J.L., 2007, *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*, Taylor and Francis Group, Boco Raton, FL.

[115]. Le Floch, F., Tena, M.T., Rios, A., Valcarcel, M., 1998, Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves, *Talanta*, 46 (5), 1123-1130.

[116]. Hsu, R.C., Lin, B.H., Chen, C.W., 2001, The Study of Supercritical Carbon Dioxide Extraction for Ganoderma Lucidum, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40 (20), 4478-4481.

[117]. Bayçın, D., Altıok, E., Ülkü, S., Bayraktar, O., 2007, Adsorption of Olive Leaf (*Olea europaea* L.) Antioxidants on Silk Fibroin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (4), 1227-1236.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Fadime ATEŞ
Doğum Yeri	İstanbul
Doğum Tarihi	10.06.1990
Uyruğu	☒ T.C. ❒ Diğer:
Telefon	5383241586
E-Posta Adresi	fadimegedikk@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Beykent Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik-Mimarlık Fakültesi
Bölümü	Kimya Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	2012

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Mühendisliği
Programı	Temel İşlemler ve Termodinamik2017
Mezuniyet Tarihi	15.12.2017

Makale ve Bildiriler

Fadime Ateş,_Selin Şahin, Zeynep İlbay, Ş.İ. Kırbaşlar," A Green Valorisation Approach Using Microwaves and Supercritical CO_2 for High-Added Value Ingredients from Mandarin (Citrus deliciosa Tenore) Leaf Waste", Waste and Biomass Valorization, DOI: 10.1007/s12649-017-0074-z.

Zeynep İlbay, Aydın Haşimoğlu, Oğuz Kaan Özdemir, Fadime Ateş, Selin Şahin, "Highly efficient recovery of biophenols onto graphene oxide nanosheets: Valorisation of a biomass", Journal of Molecular Liquids, DOI: 10.1016/j.molliq.2017.09.046.

Kerkez-Kuyumcu, Ö., Kibar, E., Dayıoğlu, K., ATEŞ (Gedik), F., Akın, A.N., Özkara-Aydınoğlu, Ş., 2015, A comparative study for removal of different dyes over M/TiO2 (M = Cu, Ni, Co, Fe, Mn and Cr) photocatalysts under visible

light irradiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 311, 176-185.

Fadime (GEDİK) ATEŞ, Selin ŞAHİN SEVGİLİ, Ş. İsmail KIRBAŞLAR, "Etanol Modifiyeli Süperkritik CO_2 Ekstraksiyon Yöntemi ile Satsuma Yapraklarından *(Citrus Unishiu* Marcow*)* Elde Edilen Toplam Polifenol Miktarının Yanıt Yüzey Metodolojisiyle Optimizasyonu" UKMK-11 Eskişehir, 2014.

Gökben KÖPRÜCÜ, Ufuk DÖNMEZ, Zeynep İLBAY, Fadime (GEDİK) ATEŞ, Ş. İsmail KIRBAŞLAR, "Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Rio Red Yapraklarından (*Citrus Paradise* Macf.*)* Elde edilen Toplam Polifenol ve Toplam Flavonoid Miktarının Yanıt Yüzey Metodolojisiyle Optimizasyonu" UKMK-11 Eskişehir, 2014.

Burcu KABASAKAL, Fadime (GEDİK) ATEŞ, Selin ŞAHİN SEVGİLİ **"**Mandalina (*Citrus deliciosa Tenore*) yapraklarının içeriğindeki fenolik maddelerin incelenmesi" UKMÖK-3 İstanbul, 2015.