

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TATLI FESLEĞEN FENOLİKLERİN ULTRASES EKSTRAKSİYON
OPTİMİZASYONU, İYONİK JELASYON YÖNTEMİ İLE
ENKAPSÜLASYONU, ANTİDİYABETİK VE ANTİOKSİDAN
AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ceylan DEMİRCAN

**Danışman
Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN**

**II. Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Ebru AYDIN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2020**



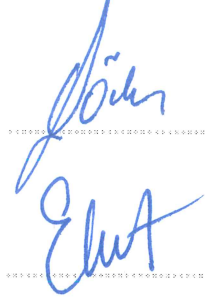
© 2020 [Ceylan DEMİRCAN]

TEZ ONAYI

Ceylan DEMİRCAN tarafından hazırlanan "Tatlı Fesleğen Fenoliklerin Ultrases Ekstraksiyon Optimizasyonu, İyonik Jelasyon Yöntemi ile Enkapsülasyonu, Antidiyabetik ve Antioksidan Aktivitesinin Değerlendirilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN
Süleyman Demirel Üniversitesi



II. Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ebru AYDIN
Süleyman Demirel Üniversitesi

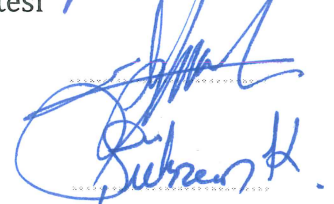
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Yusuf YILMAZ
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Erkan KARACABEY
Süleyman Demirel Üniversitesi



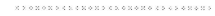
Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Şükran KULEŞAN
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Şule Sultan UĞUR



TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Ceylan DEMİRCAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Fesleğen ve Özellikleri	5
2.2. Ekstraksiyon, Antioksidan ve Antidiyabetik Aktivite	6
2.3. Enkapsülasyon ve Özellikleri	13
3. MATERYAL-METOT	16
3.1. Materyal.....	16
3.2. Metotlar	16
3.2.1. Ultrasonik su ekstraksiyon işlem koşullarının optimizasyonu	16
3.2.2. Ekstraksiyon verim miktarının belirlenmesi.....	19
3.2.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	19
3.2.4. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının HPLC ile fenolik bileşiminin belirlenmesi	20
3.2.5. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının GS-MS ile uçucu yağ bileşiminin belirlenmesi	21
3.2.6. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.2.7. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının antidiyabetik aktivitesinin belirlenmesi	23
3.2.8. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının iyonik jelasyon ve kitosan sistemi ile enkapsüle edilmesi	24
3.2.9. Enkapsülasyon etkinliği (% EE)	25
3.2.10. Enkapsüle örneklerin nem analizi.....	26
3.3. İstatistiksel Analizler	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	28
4.1. Tatlı Fesleğen Ekstraktlarının Verim ve Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Ekstraksiyon Modellemesi	28
4.2. Tatlı Fesleğen Ekstraktlarının Verim ve Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Optimizasyonu ve Model Doğrulanması.....	34
4.3. Optimum Koşullarda Ekstrakte Edilen Tatlı fesleğen Su Ekstraktının Fenolik ve Uçucu Bileşiminin Belirlenmesi	34
4.4. Optimum Koşullarda Ekstrakte Edilen Tatlı fesleğen Su Ekstraktının Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi.....	37
4.5. Optimum Koşullarda Ekstrakte Edilen Tatlı fesleğen Su Ekstraktının Enkapsülasyonu ve Fizikokimyasal Özellikleri	39
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TATLI FESLEĞEN FENOLİKLERİNİN ULTRASES EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU, İYONİK JELASYON YÖNTEMİ İLE ENKAPSÜLASYONU, ANTİDİYABETİK VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ceylan DEMİRCAN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ebru AYDIN

Son yıllarda sağlıklı beslenmeye önem veren tüketici sayısındaki artışla birlikte fenolikler ve uçucu antioksidan bileşenlerce zengin fonksiyonel doğal gıdalara ve takviyelere yönelim artmıştır. Tatlı fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) fenolik ve antioksidan uçucu bileşenleri içermesi nedeniyle sağlık açısından olumlu etkileri bulunan ve yaprakları geleneksel bitki çayı ve baharat olarak kullanılan ve ek olarak yiyecek ve içecek endüstrisinde de kullanım potansiyeli bulunan önemli bir tıbbi aromatik bitkidir. Aynı zamanda Asya'dan Avrupa'ya kadar geniş alanlarda yetişen tatlı fesleğen Lamiacea familyasına aittir.

Bu çalışmanın öncelikli amacı, tatlı fesleğen yapraklarının ultrases su ekstraksiyon işleminde kullanılan bazı faktörlerinin yanıt yüzey metodu (RSM) kullanılarak optimize edilmesidir. RSM proses değişkenlerinin optimize edilmesinde kullanılan istatistiksel bir metottur ve amacı birçok değişken tarafından etkilenen yanıtın optimum yapılması ve yanıtı optimum yapan bağımsız değişkenlerinin değerlerinin belirlenmesidir. Çalışmada genlik, ekstraksiyon süresi ile bitki/çözücü oranı bağımsız değişkenler olarak kullanılmıştır ve ekstraksiyon verimi ve tatlı fesleğen yapraklarının toplam fenolik madde içeriği ise yanıt olarak düşünülmüştür. Deney parametreleri tatlı fesleğen yapraklarının maksimum ekstraksiyon verimi (%) ve toplam fenolik madde içeriği (mg GAE/100 g bitki) olarak optimize edildiğinde, genlik, süre ve bitki/çözgen oranı optimum değerleri sırasıyla; % 100, 45 dk, 1.06 g/100 mL olarak bulunmuştur. Model çalışılan yanıtlardaki farklılığı açıklamak için yüksek tahmin performansı göstermiştir ($R^2 > 0.98$). Aynı zamanda, metot doğrulaması yapılarak teorik ve deneysel veriler kıyaslanmıştır.

Çalışmanın diğer amaçları ise sırasıyla; fesleğen yapraklarından optimum ultrases ekstraksiyon koşullarında elde edilen su ekstraktlarının polifenol ve uçucu bileşen içeriğinin, serbest radikalleri yakalama ve antidiyabetik aktivitelerinin belirlenmesi ve bu ekstraktların iyonik jelasyon-kitosan sistemiyle mikroenkapsülasyondur.

Ekstraktın toplam fenolik madde bileşenleri HPLC ile rosmarinik asit, kafeik asit, rutin, gallik asit, kamferol, protokateşik asit ve şirincik asit olarak belirlenirken; uçucu bileşenleri ise GC/MS kullanılarak E-sitral, Z-sitral, limonen, anetol, 2-metil-2 feniltridekan, simol, nonanal, 1,8-sineol, delta-4-karen, cis-sabinenehidrat, 3-bütün-1-ol, propenal dimetilhidrazon, n-dekanal ve cis-osimen olarak bulunmuştur. Fenolik bileşikler olarak rosmarinik asit (32.2 mg/g) ve uçucu madde olarak ise E-sitral (% 44.28) ve Z-sitral (% 29.24) sulu ekstrakt içerisinde en yüksek miktarlarda tespit edilen bileşenlerdir. Ekstraktın fonksiyonel özelliklerinden serbest radikalleri yakalama aktivitesi ve antidiyabetik aktivite IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.14 mg/mL ve 2.30 mg/mL olarak hesaplanmıştır.

Enkapsülasyon çeşitli fenolikler ve uçucu antioksidan bileşikler gibi biyoaktif maddelerin kapsüller içine hapsedilerek çevresel etkenlerden korunmasını sağlarken, belirli koşullar altında içeriğindeki maddelerin ortama salınmasını sağlayan teknolojidir. İyonik jelasyon kitosan yöntemi ise asidik mide koşullarına dayanıklı ve ince bağırsak koşullarında tamamen çözünebilen, ürün enkapsülasyonunda yaygın ve sık olarak kullanılan, ekonomik ve kolay uygulanabilir yöntemlerden bir tanesidir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, tatlı fesleğenin ultrases destekli ekstraksiyonundan elde edilen fenolikçe zengin ve suda çözünür ekstraktlarının enkapsülasyonunda, iyonik jelasyon ve kitosan sistemi kullanılmış olup, elde edilen hidrojel boncuklarının nem miktarı ve enkapsülasyon etkinliği ise sırasıyla % 99.60 ve % 80.12 olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak antioksidan ve antidiyabetik fonksiyonel özellikleri tespit edilen tatlı fesleğenin enkapsülasyonu sonucu elde edilen hidrojel boncuklarının fonksiyonel gıda üretiminde ya da gıda takviyesi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Tatlı Fesleğen, Ultrases, Optimizasyon, Antioksidan, Antidiyabetik, Enkapsülasyon

2020, 50 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ULTRASONIC EXTRACTION OPTIMIZATION OF SWEET BASIL PHENOLICS, ENCAPSULATION BY IONIC GELATION METHOD, ANTIDIABETIC ACTIVITY, ANTIOXIDANT ACTIVITY

Ceylan DEMİRCAN

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering**

Supervisor: Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN

Co-Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ebru AYDIN

In recent years, with the increasing importance given to healthy nutrition, consumers have started to focus on functional and natural foods rich in phenolics and volatile antioxidant components and supplements. Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is an important medicinal aromatic plant that has positive health effects due to its phenolic and antioxidant volatile components and its leaves are used as traditional herbal tea and spices also have potential for use in the food and beverage industry. It also belongs to the Lamiacea family, sweet basil, which grows in large areas from Asia to Europe.

The primary objective of this study was to optimize some of the factors used in ultrasound water extraction of sweet basil leaves by using the response surface methodology (RSM). RSM is a useful statistical method to optimize process variables and the aim of it is to optimize the response, affected by various variables and decide to optimum independent variables. In the study, ultrasonic amplitude, extraction time and plant/solvent ratio were used as independent variables and extraction yield and total phenolic content of sweet basil leaves were considered as the responses. When the experimental parameters were optimized as maximum extraction yield (%) and total phenolic content (mg GAE/100 g leaves) of sweet basil leaves, optimum values of amplitude, time and plant/solvent ratio were found as 100 %, 45 min, 1.06 g/100 mL, respectively. The model showed high predictive performance to explain the differences in the responses studied ($R^2 > 0.98$). At the same time, method validation was done by comparing experimental and predicted results.

Other objectives of the study were to determine polyphenol and volatile components, free radical scavenging and the content of antidiabetic activities of water extracts from basil leaves under optimum ultrasound extraction conditions, and to microencapsulate of these extracts with ionic gelation-chitosan system. The phenolic components of the extract were determined by HPLC as rosmarinic acid, caffeic acid, rutine, gallic acid, kaempferol,

protocatechin acid and syringic acid while the volatile components of extract included E-citral, Z-citral limonene, anethole, 2-methyl-2 phenyltridecane, simol, nonanal, 1,8-cineol, delta-4-carene, cis-sabinenehydrate, propenal dimethylhydrazone, n -decanal and cis-oximene using GC/MS. Rosmarinic acid (32.2 mg/g extract) as phenolic compounds and E-citral (44.28 %) and Z-citral (29.24 %) as volatile substances were the highest components detected in the aqueous extract. Based on the functional properties of extract the IC₅₀ values of the free radical scavenging and antidiabetic activities were calculated as 0.14 mg/mL and 2.30 mg/mL, respectively.

Encapsulation is a technology that allows bioactive substances such as various phenolics and volatile antioxidant compounds to be encapsulated in capsules to protect them from environmental influences and to release the form of the substances under certain conditions. Ionic gelation chitosan method is one of the economical and easily applicable methods that are widely and frequently used in product encapsulation, which is resistant to acidic stomach conditions and completely soluble under small intestine conditions. Therefore, in this thesis, ionic gelation and chitosan system have been used in the encapsulation of phenolic rich and water soluble extracts obtained from ultrasound assisted extraction of sweet basil, and the moisture content of the hydrogel beads and the encapsulation efficiency were determined as 99.6 % and 80.12 %, respectively.

As a result, hydrogel beads obtained from encapsulation of sweet basil extracts have antioxidant and antidiabetic activities therefore they may be used to produce new functional foods or food supplements.

Key Words: Sweet Basil, Ultrasonic, Optimization, Antioxidant, Antidiabetic, Encapsulation

2020, 50 pages

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans tez çalışmalarında danışmanlığımı yaparak beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan ve her aşamada yol gösteren, çok değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Gülcan ÖZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmamda ve tez yazım aşamasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen eş danışmanım Dr. Öğr Üyesi Ebru AYDIN'a teşekkür ederim. Yüksek lisans hayatımın başlangıcından bitimine kadar her konuda yardımlarını, desteğini esirgemeyen Yüksek Gıda Mühendisi Muhammed Mustafa ÖZÇELİK'e teşekkürü bir borç bilirim. Çalışmamda tatlı fesleğen numunelerinin temininde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Sabri ERBAŞ'a teşekkür ederim. Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin değerli çalışanlarına da çok teşekkür ederim.

17/30119053 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan her zaman yanımda olup maddi ve manevi desteğini esirgemeyen anneme, babama ve tüm aileme sonsuz sevgilerimi sunarım.

Ceylan DEMİRCAN
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Ultrases destekli ekstraksiyon sistemi.....	8
Şekil 3.1. Glikozun belirlenilmesinde yararlanılan kimyasal reaksiyon aşamaları	24
Şekil 4.1.Tatlı fesleğenin ultrases destekli sulu ekstraktının ekstraksiyon verim değerinde, ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden genlik ve sürenin etkisine (a), genlik ve bitki/çözücü oranı etkisine (b), süre ve bitki/çözücü oranı (c), etkisine bağlı değişimi	30
Şekil 4.2.Tatlı fesleğenin ultrases destekli sulu ekstraktının toplam fenolik madde miktarının ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden genlik ve sürenin etkisine (a), genlik ve bitki/çözücü oranı etkisine (b), süre (dakika) ve bitki/çözücü oranı (c) etkisine bağlı değişimi	33
Şekil 4.3. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen fenolik ekstraktı yüklü hidrojel boncuklar	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Tatlı fesleğen bitki yapraklarından ultrasonik su ekstraksiyon ön deneme sonuçları (Bağımsız değişkenler: Genlik (%), Süre (dakika), Bitki/Çözücü Oranı (g/100 mL); Bağımlı değişkenler: Ekstraksiyon Verimi (%), Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g bitki)	17
Çizelge 3.2. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri	18
Çizelge 3.3. Box-Behnken deneysel tasarımı	18
Çizelge 4.1. Tatlı fesleğen ekstraktlarının, ekstraksiyon koşullarına ilişkin ekstraksiyon verimi (%) ve toplam fenolik madde (mg GAE/g bitki) değerlerinde meydana gelen değişimler	28
Çizelge 4.2. Tatlı fesleğen ekstraktlarının, ekstraksiyon koşullarına ilişkin ekstraksiyon verimi (%) ve toplam fenolik madde (mg GAE/g bitki) değerlerinde meydana gelen değişimlere ait model katsayılar değerlendirme parametreleri	30
Çizelge 4.3. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının fenolik bileşenleri	35
Çizelge 4.4. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının uçucu bileşenleri	36
Çizelge 4.5. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının fonksiyonel özelliklerine ilişkin değerler	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CDD	Merkezi karma tasarım sistemi
Cm	Santimetre
Dk	Dakika
DPPH	Serbest radikal yakalama aktivitesi
GC	Gaz kromatografisi
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HS	Tepe boşluğu
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kg	Kilogram
L	Litre
Mg	Miligram
mL	Militre
MS	Kütle spektrofotometre
mPa	Basınç birimi
nm	Nanometre
PAD	Darbeleri amperometrik dedektör
DAD	Diode array dedektör
rpm	Devir/dakika
RSM	Yanıt yüzey yöntemi
SPME	Katı faz mikro ekstraksiyon
W	Güç birimi
A	Alfa
B	Beta
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
% EE	Enkapsülasyon etkinliği
a	Ağırlık
v	Hacim

1. GİRİŞ

Ocimum basilicum L. (tatlı fesleğen) Lamiacea familyasının, *Ocimum* cinsinin *basilicum* türünün *Ocimum basilicum* L. alt türünü oluşturmaktadır. Baharat olarak kullanılan ve uçucu yağı değerli olan tıbbi aromatik bir bitkidir. Tatlı fesleğenin yaprakları ve çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ gıda aroması ve parfümeride (Simon vd., 1999; Javanmardi vd., 2002; Fufa vd., 2005; Aslan vd., 2017) kullanılmaktadır. Fesleğen uçucu yağında birçok bileşik bulunmakla birlikte linalol (Díaz-Maroto vd., 2004; Lee vd., 2005; Ismail, 2006; Klimankova vd., 2008; Dev vd., 2011; Nurzyńska-Wierdak vd., 2013; Carro vd., 2013; Hussain vd., 2017; Bayram ve Telci, 2017), sitral (Bayram ve Telci, 2017), metil kavikol, öjenol, metil sinamat ve kafur ana bileşen olup bu bileşenlerin yoğunluğuna bağlı olarak farklı kemotipler içermektedir (Telci ve ark., 2006). Linalol ve sitral bileşenleri oksijenli monoterpen olup, Bayram ve Telci (2017) yaptıkları çalışmada Türkiye’de sitral ve linalolce zengin iki farklı kemotip raporlamışlardır.

Fesleğen aynı zamanda fenolik bileşikler bakımından oldukça zengindir. Yapılan literatür çalışmalarında, tatlı fesleğen bitkisinin yapraklarında bulunan fenolik bileşenler sırasıyla rosmarinik asit (Jayasinghe vd., 2003; Lee vd., 2009; Kwee ve Niemeyer, 2011; Benedec vd., 2015; Złotek vd., 2016), *p*-kumarik asit (Wongsa vd., 2012), kafeik asit (Lee vd., 2009; Kwee ve Niemeyer, 2011; Wongsa vd., 2012), benzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, *o*-kumarik asit (Złotek vd., 2016), uçucu yağlarında ise sırasıyla; linalol (Díaz-Maroto vd., 2004; Lee vd., 2005; Ismail, 2006; Klimankova vd., 2008; Dev vd., 2011; Nurzyńska-Wierdak vd., 2013; Carro vd., 2013; Stanojevic vd., 2017), öjenol (Díaz-Maroto vd., 2004; Lee vd., 2005; Ismail, 2006; Dev vd., 2011), 1,8-sineol (Díaz-Maroto vd., 2004; Lee vd., 2005; Ismail, 2006; Klimankova vd., 2008; Dev vd., 2011; Nurzyńska-Wierdak vd., 2013), isopropil palmitat (Dev vd., 2011), limonen (Klimankova vd., 2008; Carro vd., 2013), geraniol (Nurzyńska-Wierdak vd., 2013), α -pinen (Díaz-Maroto vd., 2004; Carro vd., 2013), terpineol (Díaz-Maroto vd., 2004; Carro vd., 2013), seskiterpen, kâfur, linalil asetat, trans-geraniol (Díaz-Maroto

vd., 2004), estragol (Lee vd., 2005), metil sinamat (Lee vd., 2005; Ismail, 2006) ve β -pinen (Carro vd., 2013) bileşenleri tespit edilmiştir.

Tatlı fesleğen yaprakları bileşiminden dolayı gıda sanayinde hem taze hem de kuru şekilde tüketime sunulmaktadır. Dünya çapında mutfaklarda bitki çayı ve yemeklerde lezzet verici olarak (Kaya vd., 2008; Koç vd., 2010) geleneksel tıpta ise öksürük, bronşit, baş ağrısı, mide bulantısını önlemek ve antiseptik gibi amaçlar için kullanılmaktadır (Simon vd., 1999; Vieira ve Simon, 2000). Diğer taraftan tatlı fesleğen fonksiyonel özellikler bakımından değerlendirildiğinde ise, yapılan bilimsel çalışmalarda antioksidan (Jayasinghe vd., 2003; Lee vd., 2005; Cruz-Vega vd., 2009; Kwee ve Niemeyer, 2011; El-Beshbishy ve Bahashwan, 2012; Wongsu vd., 2012; Benedec vd., 2015), antidiyabetik (El-Beshbishy ve Bahashwan, 2012; Wongsu vd., 2012; Ademiluyi vd., 2016) antimikrobiyal (Opalchenova ve Obreshkova, 2003; Sartoratto vd., 2004; Kaya vd., 2008; Daneshian vd., 2011; Shafique vd., 2011) etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir.

Bitkilerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyon işlemi farklı şekillerde uygulanmaktadır. Ekstraksiyon, katı yada sıvı fazda bulunan bir yada birden fazla bileşiğin farklı çözünürlük özelliklerinin kullanılmasıyla diğer bir faza ayrılması işlemine denir (Soysal ve Soysal, 2016). Ekstraksiyon işlemi geleneksel ekstraksiyon ve modern ekstraksiyon şeklinde sınıflandırılmaktadır. Yapılan araştırmalarda genellikle metanol, aseton, etanol, hekzan, su veya bu çözücülerin farklı oranlardaki karışımları ile geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden damıtma, bekletme, ezme, maserasyon, kaynatma, karıştırma, basınç altında ekstraksiyon ile (Jayasinghe vd., 2003; Díaz-Maroto vd., 2004; Chiang vd., 2005; Lee vd., 2005; Cruz-Vega vd., 2009; Kwee ve Niemeyer, 2011; El-Beshbishy ve Bahashwan, 2012; Wongsu vd., 2012; Carro vd., 2013; Benedec vd., 2015; Złotek vd., 2016) modern ekstraksiyon tekniklerinden mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon (Carro vd., 2013; Izadiyan ve Hemmateenejad, 2016) cihazları kullanılarak fenolik ekstraksiyonu yapılmıştır.

Geleneksel ekstraksiyon uygulamalarının dezavantajı; yüksek maliyetli olması, fazla miktarda çözücü kullanılması, ekstraksiyon süresinin uzun olmasıdır (Zhang vd., 2011; Cavuldak vd., 2016). Buna bağlı olarak, son yıllarda gelişmiş ekstraksiyon tekniklerinin otomasyona uygun olması, çözücü tüketiminin az olması, ekstraksiyon süresinin kısa olması, örnek hazırlama maliyetinin düşük olması gibi birçok avantajından dolayı bu tekniklerin kullanımına da artışın olduğu bilinen bir gerçektir (Wan ve Wong, 1996; Eskilsson ve Björklund, 2000). Alternatif bir teknoloji olan ultrases destekli ekstraksiyon yöntemine giderek artan bir talep söz konusudur. Ultrases ile oluşturulan kavitasyon ham maddelerde fiziksel ve kimyasal değişiklikler oluşturarak ekstraksiyon işlemini kolaylaştırmaktadır. Ultrases ile hücre duvarları tahrip edildiğinden, diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha hızlı bir yöntemdir (Baysal, 2013). Yapılan literatür taramalarında, tatlı fesleğenden (*Ocimum basilicum* L.) su ekstraksiyonu ısıtma, karıştırma, kaynatma ve clevenger tipi aparatlar kullanılarak yapılmış olup, ultrases destekli hekzan ekstraksiyonu dahil üç farklı ekstraksiyon metodunun karşılaştırıldığı bir çalışma (Carro vd., 2013), su-metanol karışımları ile İran fesleğeni kullanılarak yapılmış bir ultrases destekli ekstraksiyon çalışmasına (Izadiyan ve Hemmateenejad, 2016) rastlanılmıştır. Ancak literatürlerde ultrases destekli su ekstraksiyonu ve Box-Behnken deney tasarımı ile ilgili çalışmaların mevcut olmadığı görülmüştür. RSM çalışmalarında mühendislik çalışmaları için en yaygın kullanılan deneysel tasarımlardan birisi Box-Behnken tasarımıdır (Meyers, 1995; Radojković vd., 2012). Box-Behnken tasarımları merkezi bileşik tasarımlara kıyasla daha ekonomik bir tasarım sınıfıdır (Meyers, 1995).

Tez çalışmamızda aynı zamanda ekstraksiyon optimizasyonu yapılan tatlı fesleğen biyoaktif fenolik bileşiklerinin mikroenkapsülasyonu yapılmıştır. Enkapsülasyon çeşitli biyoaktif maddelerin kapsüller içine hapsedilerek çevresel etkenlerden korunmasını ve belirli koşullar altında içeriğindeki maddelerin ortama salınmasını sağlayan bir teknolojidir (Aguiar vd., 2016). Mikroenkapsülasyon tekniklerinden, iyonik jelasyon yönteminde kalsiyum ve sodyum aljinat hidrojellerin biyolojik olarak kolay üretilibilmeleri, termal ve kimyasal olarak dirençli olmaları ve toksik olmamaları sebebiyle daha fazla

tercih edilmektedir (Chan vd., 2010). Yapılan literatür taramalarında fesleğen bitkisinin sadece uçucu yağlarının enkapsüle edildiği çalışmalara rastlanılmıştır (Garcia vd., 2012; Saha vd., 2014). Tatlı fesleğen su ekstraktlarından iyonik jelasyon metodunun kullanıldığı herhangi bir mikroenkapsülasyon çalışmasına rastlanmamıştır.

Yukarıdaki bilgilerden yola çıkarak bu tez çalışmasında, tatlı fesleğen yapraklarından ultrases cihazı ile yanıt yüzey metodu kullanılarak su ekstraksiyon optimizasyonu yapılması ve optimum şartlarda elde edilen ekstraktların ise polifenol içeriğinin, biyofonksiyonel özelliklerinden antioksidan ve antidiyabetik aktivitelerinin belirlenmesi ve ekstraktların iyonik jelasyon-kitosan sistemi ile mikroenkapsülasyonu amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Fesleğen ve Özellikleri

Tatlı fesleğen (*Ocimum basilicum* L.), dünyada en fazla ekonomik alana sahip olan tıbbi aromatik bitki türlerinden biridir (Şekil 2.1). Tek yıllık, kendine özgü aroması olan, hoş kokulu bir bitkidir. Dallanmış durumda olup, bitkilerin sapları 50-60 cm yüksekliğe sahiptir. Tatlı fesleğen yaprakları genotiplere bağlı olarak değişmekle birlikte, temel kısımları küt, az miktarda diş ve saplara sahiptir. Yaprakları renklerine göre yeşil ve mor fesleğen olarak iki kısma ayrılmaktadırlar (Çelebi, 2010; Karık vd. 2014). Doğu illerinde mor fesleğen daha fazla miktarlarda görülmekte olup, reyhan olarak adlandırılmaktadır. Yabancı literatür kaynaklarında ise yeşil renkli fesleğen tatlı fesleğen (sweet basil) olarak bilinmektedir (Arslan, 2005). Günümüzde yaklaşık 150 adet fesleğen türünün bulunduğu raporlanmıştır (Fufa vd., 2005; Çelebi, 2010).



Şekil 2.1. Tatlı fesleğen bitkisi

Tatlı fesleğen değerli fenolik bileşiklere, uçucu yağlara sahip olması ve güzel kokusundan dolayı gıda sanayinde baharat ve uçucu yağ olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir (Simon vd., 1999; Labra vd., 2004).

Gıda sanayinde baharat ve uçucu yağları fırın ürünleri, alkolsüz içecekler, şekerlemeler, et ürünlerinde ve ilaç sanayilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Aslan vd., 2017). Ayrıca gıda sanayinde, mor renge sahip olanlar antioksidan kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Simon vd., 1999).

Tatlı fesleğenin diğer biyoaktif bileşeni olan uçucu yağ verimi ve uçucu yağ bileşimini belirlemeye yönelik; uçucu yağ miktarının % 0.5 ile % 1.5 arasında değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Özek vd., 1995; Simon vd., 1999). Yapılan çalışmalar incelendiğinde tatlı fesleğen uçucu yağının bileşenlerinin oranlarını sırasıyla 23.0 µg/g; 3.94 mg/g; % 10.7-64.7 linalol (Díaz-Maroto vd., 2004; Lee vd., 2005; Nurzyńska-Wierdak vd., 2013; Carro vd., 2013), 0.896 mg/g; % 8.59-61.76 öjenol (Lee vd., 2005; Ismail, 2006; Dev vd., 2011), 0.288 mg/g; % 4.1-13.65 1,8-sineol (Lee vd., 2005; Ismail, 2006; Nurzyńska-Wierdak vd., 2013), % 11.36 isopropil palmitat (Dev vd., 2011), 1.1 µg/g; % 1.3-15.0 limonen (Klimankova vd., 200; Carro, vd., 2013), % 12.6 geraniol (Carro vd., 2013), 2.9 µg/g; % 9.8 α-pinen (Díaz-Maroto vd., 2004; Carro vd., 2013), 3.5 µg/g; % 7.2 terpineol (Díaz-Maroto vd., 2004; Carro vd., 2013), % 7.1 seskiterpen, % 6.9 kâfur, % 6.4 linalil asetat, % 5.6 trans-geraniol (Díaz-Maroto vd., 2004), 1.28 mg/g; % 4.26 metil sinamat (Lee vd., 2005; Ismail, 2006), 2.03 mg/g estragol (Lee vd., 2005), 7.5 µg/g β-pinen (Carro vd., 2013) olarak tespit etmişlerdir. Bu literatür çalışmaları incelendiğinde fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) uçucu yağının ana bileşeninin linalol olduğu anlaşılmaktadır.

2.2. Ekstraksiyon, Antioksidan ve Antidiyabetik Aktivite

Bu tez çalışmasının ilk adımında geleneksel olarak antidiyabetik bitki çayı olarak kullanılan tatlı fesleğenden fenolik biyoaktif bileşenlerinin maksimum oranda ultrases destekli ekstraksiyon tekniği ile ekstraksiyon optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ultrases, mekaniksel bir enerji şekli olup, ısısal olmayan ve hücre duvarlarını parçalayabilme özelliğine sahip bir ekstraksiyon metodudur. Bu yöntem ile ekstraksiyon uygulamasında, hücre duvarlarının parçalanması sağlanmaktadır (Zayas, 1989). Hücre duvarının yok olması ile partikül çapı azalmakta ve etkileşimin artması ile de çözücünün dokulara doğru olan dağılımı

hızlandırmaktadır. Buna bağılı olarak ekstraksiyon işlemleri daha kısa sürelerde gerçekleştirilmektedir (Da Porto vd., 2013). Ekstraksiyon uygulaması sıvı sistemlerde daha etkili bir yöntem olup, bu etki başlıca kavitasyon ile sağlanmaktadır. Sıvı içerisinde gönderilen ses dalgaları, moleküllerin titreşmesi ve bu titreşimin komşu moleküllere aktarılması ile meydana gelmektedir. Bu şekilde enerji aktarımı ile ortamdaki moleküllerde sıkışma ve gevşemeler olup, sıkışma ile moleküller birbirine yaklaşırken, gevşeme ile de uzaklaşmaya başlayan moleküller arasında oluşan çekim ile kabarcıklar meydana gelmektedir. Moleküller, uzaklaşma aşamasından, yaklaşma aşamasına geçerken kabarcıklar birbirine yaklaşan moleküller arasında ani olarak patlayıp, kabarcıkların etrafında 5500 °C'ye kadar bir sıcaklık ve 50 mPa bir basınç oluşmaktadır. Kavitasyon ile serbest kalan enerji miktarı, kabarcık büyüme kinetiği ve çöküşü üzerindeki etkiye bağılıdır. Katı-sıvı ara yüzeylerine yakın kavitasyon ile iç kısımlara doğru çok hızlı bir sıvı akımları oluşmaktadır. Bu durum da kütle transferini oluşturmaktadır. (Knorr vd. 2004; Soria ve Villamiel, 2010; Donnell vd., 2010; Piyasena vd., 2003). Diğer ekstraksiyon yöntemleri daha uzun sürede gerçekleştirildiğinden aroma maddesi kaybına neden olmaktadır. Ultrases destekli ekstraksiyon tekniği kapalı bir sistem içerisinde kısa sürede gerçekleştirildiğinden ekstrakta özelliğini veren aktif bileşenlerin kaybı diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre minimum düzeyde tutulmuştur. Ekstraksiyonda kullanılan metotlar ve proseslerdeki parametreler çok çeşitli olduğundan yanıt yüzey metodu (RSM) ile proses değişkenlerinin optimize edilmesi sağlanmıştır. Yanıt yüzey metodunda amaç birçok değişken tarafından etkilenen tepkinin optimum yapılması ve tepkiyi optimum yapan karar değişkenlerinin değerlerinin belirlenmesidir. Aşağıda geleneksel ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak farklı çözümler ile tatlı fesleğenden ekstraksiyon çalışmaları verilmiştir:



Şekil 2.1. Ultrases destekli ekstraksiyon sistemi

Jayasinghe vd. (2003), kurutularak öğütülmüş, ince toz halindeki tatlı fesleğenin fenolik kompozisyonunu ve antioksidan aktivitesini incelendikleri çalışmalarında yaprakları 1:5 (w/v) katı-sıvı oranında ve farklı çözücüler kullanarak oda sıcaklığında 5 dakika boyunca ekstrakte etmişlerdir. En yüksek ekstraksiyon verimi metanolde (% 6.12) bulunmuş olup, HPLC-PAD ile ekstraktlarda fenolik bileşenlerden rosmarinik asitin en yüksek oranda bulunduğunu ve bunu kafeik ve ferulik asitin takip ettiğini saptamışlardır. Serbest radikal yakalama aktivitesi (DPPH) ise % 61 olarak belirlenmiştir.

Díaz-Maroto vd. (2004) yaptıkları çalışmada bir partisi taze, diğer üç partisi kurutulmuş tatlı fesleğen yapraklarında (45 °C'de fırında kurutma, oda sıcaklığında hava kurutması ve dondurarak kurutma) kimyasal ve duyuşal açıdan aroma bileşenlerinin kurumaya bağlı olarak değişimini incelemişlerdir. Oda sıcaklığında kurutulmuş 1 g tatlı fesleğen yapraklarına 60 mL saf su ve 100 µL etil pelargonat ekleyip, damıtarak ekstrakte etmişlerdir. GC ile ekstraktlarda öjenol (% 16.5), linalol (% 10.7), α-pinen (% 9.8), 1,8-sineol (% 9.6), α-terpineol (% 7.2), seskiterpen (% 7.1), kâfur (% 6.9), trans-kadinol (% 6.5), linalil asetat (% 6.4), trans-geraniol (% 5.6) bileşenlerini bulmuşlardır.

Başka bir çalışmada ise 20 g kurutulmuş, tatlı fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) ve kekik yaprakları (*Thymus vulgaris* L.) 1 litre deiyonize su ile 3 saat boyunca 55 °C ve 95 mm basınç altında ekstrakte edildikten sonra, 100 mL diklorometan ile tekrar ekstrakte edilmiştir. Fesleğen ve kekik örneklerinin antioksidan aktiviteye sahip aroma bileşenlerinin analizinde GC kullanılarak aroma bileşenleri teşhis edilmiştir. Tatlı fesleğende sırasıyla; linalol (3.94 mg/g), estragol (2.03 mg/g), metil sinamat (1.28 mg/g), öjenol (0.896 mg/g) ve 1,8-sineol (0.288 mg/g), kekikte ise sırasıyla timol, kavrakrol, linalol, 1,8-sineol bileşenleri antioksidan aktiviteye sahip bileşenler olarak saptanmıştır (Lee vd., 2005).

Lee vd. (2009) yaptıkları çalışmada tatlı fesleğen ve tay fesleğen (*Ocimum basilica*) bitkilerinde rosmarinik asit, çikorik asit ve kafeik asit varlığını belirlemek için, bitkilerin yenilebilir kısımlarını (çoğunlukla yapraklar) saplarından ayırıp sıvı azot ile dondurmuşlardır. 5 g öğütülmüş örnekler metanol (% 0.1 formik asit, v/v) ile 5 dakika kaynar su banyosunda bekletip, ikinci aşamada 10 dakika boyunca buz banyosunda soğutarak, su ile son hacmi 25 mL'ye tamamlamışlardır. Araştırma sonucunda HPLC ile tatlı fesleğen ekstraktında, rosmarinik asit (1.86 mg/g), kafeik asit (1.18 mg/g), çikorik asit (0.65 mg/g) ve diğer minör bileşenler (0.23 mg/g) tespit edilmiştir. Tay fesleğen bitkisinde ise çikorik asit en baskın bileşen olarak bulunmuştur.

Cruz-Vega vd. (2009) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise değirmen kullanarak ince toz haline getirilmiş tatlı fesleğen yaprakları su ve etanol çözücülerini ile iki farklı şekilde ekstrakte edilip, antioksidan aktiviteleri araştırılmıştır. İlk olarak 25 g tatlı fesleğen yaprakları 100 mL etanol ile beş kez karıştırılarak ekstrakte edildikten sonra; tatlı fesleğen yapraklarının (25 g) ikinci ekstraksiyonu ise 500 mL kaynar su ile manyetik karıştırıcıda 10 dakika karıştırılarak yapılmıştır. Çalışma sonucunda su ve etanol ekstraktlarının 50 µg/mL konsantrasyonunda serbest radikal yakalama aktivitelerini (DPPH) sırası ile % 55 ve % 65 olarak bulmuşlardır.

Kwee ve Niemeyer (2011), yaptıkları çalışmada farklı fesleğen çeşitlerinin (Ararat, Blue Spice, Cinnamon, Envigor, Gecofure, Subja, Mrs. Burns, Nufar, Osmin, Petra Dark, Siam Queen, Americanum hybrid, Sweet dani, Sweet basil) fenolik kompozisyonlarını ve antioksidan aktivitelerini belirlemişlerdir. Taze fesleğen yapraklarını sıvı azot içerisinde dondurarak muhafaza edip sonrasında havanda öğütülerek ince toz haline getirilen 0.10-0.15 g ağırlığındaki örnekleri 1 mL metanol (% 80) kullanarak oda koşullarında 15 saat boyunca çalkalayıcı ile ekstrakte etmişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre; tatlı fesleğen ekstraktlarında HPLC ile rosmarinik asit (0.10 mg/g), çikoric asit (0.43 mg/g) ve kafeik asit (0.20 mg/g) bileşenlerini tespit edip, serbest radikal yakalama aktivitesini (DPPH) ise 23 mM/100 g olarak bulmuşlardır.

Farklı bir çalışmada ise tatlı fesleğen taze yapraklarını Carro vd. (2013), ezerek üç farklı ekstraksiyon (buhar destilasyonu, ultrases destekli ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon) metodu kullanarak ekstrakte etmişlerdir. Ultrases destekli ekstraksiyonda 1 g fesleğen yaprağını 10 mL hekzan ile ekstrakte edip, 20 °C'de 10 dakika bekletilmiştir. Ultrases destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktın GC ile analizi sonucunda linalol (23.0 µg/g), β-pinen (7.5 µg/g), α-terpineol (3.5 µg/g), α -pinen (2.9 µg/g), limonen (1.1 µg/g) bileşenlerini tanımlamışlardır. Tanımlanan bileşikler için en iyi ekstraksiyon sonuçlarının mikrodalga ekstraksiyonu ile elde edildiğini belirtmişlerdir.

Tatlı fesleğen dahil 6 farklı (*Origanum vulgare* L., *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Salvia officinalis* L. and *Hyssopus officinalis* L.) bitki çeşidinin, rosmarinik asit içeriğinin belirlendiği bir başka çalışmada, bitkilerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bitkiler çiçeklenme döneminde toplanarak bitki antenleri kurutulup toz haline getirildikten sonra, 5.0 g örnek 50 mL etanol (% 70) içerisinde geri akış ile ekstrakte edilmiştir. Çalışmada HPLC ile tatlı fesleğen ekstraktlarında rosmarinik asit 3.59 mg/g, toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu metodu ile % 1.84, serbest radikal yakalama aktivitesi (DPPH) ise 113.47 µg/mL olarak bulunmuştur (Benedec vd., 2015).

2016 yılında yapılmış olan bir başka çalışmada tatlı fesleğen yapraklarına, su içerisinde çözündürülmüş araşidonik asit, jasmonik asit ve baminobütirik asit püskürtülerek fenolik kompozisyona etkisini incelemek için; 2 g yaprak 15 ml metanol ile ezilerek, 1 saat boyunca 4 °C'de ekstrakte edilmiştir. HPLC ile elde edilen sonuçlardan; rozmarinik asit (705.00 µg/g), benzoik asit (61.02 µg/g), p-hidroksibenzoik asit (5.37 µg/g), p-kumarik asit (5.25 µg/g) ve kafeik asit (5.00 µg/g) önemli fenolik bileşenler olarak tanımlanmış olup, ayırt edici bileşen rosmarinik asit olarak belirtilmiştir. Toplam fenolik içerik 3.54 mg GAE/g bitki olarak belirlenmiştir. En iyi sonuçlar araşidonik asit ile tedavi edilen bitkilerden elde edilmiştir (Złotek vd., 2016).

2016 yılında yapılmış bir diğer çalışmada ise İran fesleğenin ultrases destekli ekstraksiyonu yapılarak, merkezi karma tasarım (CCD) sistemi ile ekstraksiyon parametrelerinin (sıcaklık, su oranı yüzdesi ve süre) etkileri Izadiyan ve Hemmateenejad (2016) tarafından incelenmiştir. Kurutulmuş fesleğen yapraklarını 0.3 mm gözenek çaplı elekten geçirip, 0.2 g yaprak tozunu 20 mL metanol-su karışımı ile ultrases ile ekstrakte etmişlerdir. Ekstraksiyonda etkili parametrelerin metanol-su oranı yüzdesi ve ekstraksiyon sıcaklığının olduğunu, sürenin ise önemsiz bir faktör olduğunu tespit etmişlerdir. Yüksek sıcaklıkların hücre duvarı geçirgenliğini arttırdığından ekstraksiyon verimini arttırdığını, ancak aşırı sıcaklığın bileşenlerin yapısını bozabileceğini de belirtmişlerdir. Su oranı yüzdesi arttıkça ekstraksiyon veriminin arttığını bulmuşlardır. En yüksek ekstraksiyon verimi için optimum sıcaklık, metanol-su oranı (v/v) ve süre sırasıyla 35 °C, % 20 ve 20 dk iken serbest radikal yakalama aktiviteleri için 55 °C, % 62.8 ve 20 dk ve toplam polifenol miktarı için ise 55 °C, % 61.9 ve 20 dk olarak tespit etmişlerdir. Aynı zamanda, ekstraksiyon verimi, serbest radikal yakalama aktivitesi ile toplam polifenol miktarlarının üçünün birlikte maksimum miktarlarda elde edilmesi için yapılan optimizasyon sonucunda, optimum ekstraksiyon koşullarını 59 °C sıcaklık, % 65.2 metanol ile su oranı yüzdesi ve 20 dakika olarak saptamışlardır.

2017 yılında yapılmış olan bir çalışmada, tatlı fesleğenin farklı genotiplerinde uçucu yağlardaki ana bileşenler tespit edilmiştir. Bu amaçla clevenger tipi bir aparat ile kuru yaprak örnekleri distilasyona tabi tutularak uçucu yağ ekstrakte edilmiştir. GC/MS ile linalol bakımından zengin olan genotiplerin % 38-60 aralığında değişiklik gösterdiği ve R16 nolu örneğin en yüksek linalol bileşen miktarına sahip olduğu belirlenmiştir. Sitalce zengin olan genotiplerin ise, % 57-66 aralığında değiştiği ve R10L nolu örneğin en yüksek sitral bileşen miktarına sahip olduğu raporlanmıştır (Bayram ve Telci, 2017).

Son yıllarda, diyabet hastalığının artması, tedavi masraflarının büyümesi, metformin gibi diyabet hastalığı tedavisinde kullanılan kimyasal ilaçların çeşitli yan etkilerinden (bulantı, kusma, hipoglisemi, çarpıntı, nefes darlığı vd) dolayı tüketicilerin doğal bitki kaynaklarına olan taleplerinde artış meydana gelmiştir. Sağlıklı beslenmeye verilen önemin artmasıyla tüketiciler sağlığa yararlı olduğu düşünülen doğal bitki kaynaklarına yönelmeye başlamışlardır. Geleneksel olarak antidiyabetik, antioksidan ve antimikrobiyal bitki çayı ve yemeklerde lezzet verici baharat olarak kullanılan tatlı fesleğen, biyoaktif bileşenlerce zengindir (Özek vd., 1995; Simon ve Morales, 1999; Vieira ve Simon, 2000; Kaya vd., 2008; Koç vd., 2010; Shafique, 2011). Tatlı fesleğenin antidiyabetik özelliği ile bu fonksiyonel özelliğini veren fenolik biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonunda kullanılan çözümler ve yöntemler ile ilgili çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

2012 yılında yapılmış olan bir çalışmada tatlı fesleğen yaprakları sabit bir ağırlığa gelinceye kadar kurutulup, 1 mm'lik elekten geçirilip 100 °C sıcaklığında 200 mL damıtılmış su ile 30 dakika infüze edilerek ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon verimi % 17 (w/w) olarak bulunmuştur. Elde edilen ekstraktın *in vitro* hipoglisemik aktivitesi araştırılıp, toplam polifenol içeriği ve serbest radikal yakalama aktivitesi tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda toplam polifenol içeriği 146 mg kateşin/g ekstrakt olarak belirlenmiştir.

Tatlı fesleğen ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki (20.0, 18.2, 16.3 ve 14.5 mg/mL) serbest radikal yakalama aktiviteleri (DPPH) ise sırasıyla % 43, % 49, % 54 ve % 60, inhibisyon etkinliği ise α -glukozidaz için IC₅₀ % 36.72 olarak bulunmuştur (El-Beshbishy ve Bahashwan, 2012).

2012 yılında yapılmış benzer bir çalışmada tatlı fesleğen dahil otuz farklı bitki çeşidinin fenolik bileşenlerinin tespiti ve inhibisyon etkinliğinin belirlenebilmesi için bitkiler kurutulup, 1 mm boşluğa sahip çekiçli değirmende öğütölmüşlerdir. Öğütölmüş 5 g örnek 100 mL distile su ile 95 °C'de 30 dakika boyunca kaynatılarak ekstrakte edilmiştir. HPLC ile tatlı fesleğen ekstraktlarında kafeik asit 0.30 mg/g, *p*-kumarik asit ise 2.79 mg/g olarak bulunmuştur. Tatlı fesleğen ekstraktının toplam fenolik madde içeriği 38.48 mg GAE/g bitki, serbest radikal yakalama aktivitesi (DPPH) % 80.38 olarak tespit edilmiştir. İnhibisyon etkinliği ise α -glukozidaz için % 61 olarak raporlanmıştır (Wongsa vd., 2012).

Kurutularak toz haline getirilmiş tatlı fesleğen yapraklarından uçucu yağ, Clevenger'da su distilasyonu ile elde edilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmada α -glukozidaz için IC₅₀ 3.06 mg/mL olarak belirlenmiştir. Fesleğen uçucu yağında GC-FID ile % 47.40 limonen, % 8.66 borneol, % 6.93 geraniol, % 5.71 neral, % 4.68 miren, % 4.68 β -karyofilen, % 4.60 α -terpineol, % 4.17 1,8-sineol, % 3.53 linalol ve % 2.21 terpinen-4-ol bileşenleri tespit edilmiştir (Ademiluyi vd., 2016).

2.3. Enkapsülasyon ve Özellikleri

Mikroenkapsülasyon teknolojisi gıda endüstrisinde enkapsüle edilecek maddenin dış etkenlerden korunması, taşınmasının kolaylaştırılması, tat ve kokusunun maskelenmesi ve başka bileşenler ile etkileşime girmesinin engellenmesi amaçları doğrultusunda kullanılmaktadır (Koç vd., 2010). Püskürtmeli kurutma (Gharsallaoui vd., 2007; Jafari vd., 2008; Kailasapathy, 2009; Zuidam ve Nedović, 2010; Fang ve Bhandari, 2010; Jyothi vd., 2010; Laohasongkram vd., 2011; Rathore vd., 2013), dondurarak kurutma (Fang ve

Bhandari, 2010; Zuidam ve Nedović, 2010), püskürtmeli soğutma (Champagne ve Fustier, 2007; Kailasapathy, 2009; Zuidam ve Nedović, 2010), akışkan yatak kaplama (Azeredo, 2005; Gharsallaoui vd., 2007; Zuidam ve Nedović, 2010), ekstrüzyon (Krasaekoopt vd., 2003; Azeredo, 2005; Rathore vd., 2013), koaservasyon (Azeredo, 2005; Kailasapathy, 2009; Fang ve Bhandari, 2010; Rathore vd., 2013), kokristalizasyon (Kailasapathy, 2009; Fang ve Bhandari, 2010), lipozom tutuklama (Kailasapathy, 2009; Fang ve Bhandari, 2010) ve iyonik jelasyon (Gazori vd., 2009; Jones vd., 2011; Shi vd., 2011; Nualkaekul vd., 2012) mikroenkapsülasyon teknolojisinde kullanılan yöntemlerdir. Çapraz bağlanma, iyonik jelasyon gibi isimlerle de anılan damlatma metodu ekonomik ve kolay uygulanabilir bir yöntem olması sebebiyle enkapsülasyon teknolojisinde tercih edilmektedir. Çalışmada kullanılan metotta polimer çözeltisi ile aktif madde homojenize edilerek peristaltik pompa vasıtasıyla hidrojen boncukları elde etmek amacıyla dağıtıcı faza (CaCl_2 gibi) damlatılır. Damlatma metodu hidrojel boncukların elde edilmesinde kullanılan metot olup, kalsiyum ile sodyumun bağlanması prensibine dayanmaktadır. Şekil 4.2.'de kalsiyum ve sodyum iyonları arasında çapraz bağlanma ve damlatma sistemi gösterilmiştir. Bu metot ile üretim yapmak kolay olup, hidrofilik, hidrofobik, ısıya duyarlı, akışkan veya viskoz, katı veya sıvı hemen hemen tüm bileşenlerin enkapsüle edilebilmesi mümkündür (Kurozawa ve Hubinger, 2017). Negatif yüklü aljinat ile zıt yüklü olan kitosan yarı geçirgen yapı oluşturarak hidrojellerin düzgün bir yapı oluşturulmasını sağlamaktadır. (Nualkaekul vd., 2012). Avantajlarının yanı sıra elde edilen hidrojel boncuklar gözenekli bir yapıya sahip olduğundan difüzyonuna oldukça müsaittir (Gouin, 2004).

Tatlı fesleğen ve diğer fesleğen türleri ile ilgili yapılan enkapsülasyon çalışmalarında su ekstraktı veya çözücü ekstraktı enkapsülasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamış olup, uçucu yağ enkapsülasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıda detaylı olarak özetlenmiştir:

2012 yılında yapılan bir çalışmada fesleğen yapraklarından buhar damıtma ile fesleğen esansiyel yağı elde edilmiştir. Çalışmada homojenleştirici (rotor-stator) ile toplam katı madde içeriği (arap zamkı ve fesleğen yağı) % 30 (w/w) olacak

şekilde 5 dakika 14.000 rpm'de 40 °C'de distile su kullanılarak arap zamkı tamamen çözündürülmüştür. Daha sonra oda sıcaklığında soğutulup, 5 °C'de saklanmıştır. Mikroenkapsüle parçacık üretiminde sprej püskürtme yöntemi kullanılarak, merkezi kompazisyon tasarım sistemi ile fesleğen yağı mikroenkapsülasyonunda optimum koşulların; yağ konsantrasyonunun % 10-14 arası, homojenizasyon basıncının 50 mPa'dan daha büyük olduğu durumlarda sağlandığı raporlanmıştır. Parçacık ortalama çapının 0.46 ila 0.91 mm arasında değiştiği bildirilmiştir. Nem içeriğini çözücü içerisindeki materyal miktarı ve duvar malzemesinin etkilediği belirtilerek, homojenizasyon basıncı ve yağ konsantrasyonun parçacık nem içeriğini etkilemediği sonucuna varılmıştır (Garci vd., 2012).

Bir diğer çalışmada kutsal fesleğen (*Ocimum sanctum* Linn.) uçucu yağları buhar ile damıtılarak elde edilmiştir. Farklı miktarlarda jelatin (% 4-16) içeren sulu jelatin 30 mL olacak şekilde 450 rpm'de 40 °C'de 25 dakika karıştırılarak elde edilmiştir. Daha sonra sodyum sülfat çözeltisi (% 20) eklenip 550 rpm'de karıştırılarak, 5 °C'ye soğutulmuştur. Son olarak 3.525 mL glutaraldehit çözeltisi eklenip sıcaklık 40 °C'ye yükseltilerek 60 dakika boyunca sürekli karıştırmayla çapraz bağlanma sağlanmıştır. Koaservasyon metodu ile çapraz bağlanma sağlanarak üretilen mikrokapsüller % 0.3 tween ile yıkanarak, RSM metodu ile optimum enkapsülasyon koşulları belirlenmiştir. Mikrokapsüllerin verimi, yağ içeriği ve enkapsülasyon etkinliği sırasıyla % 54.90–98.96, % 62.97-68.47 ve % 44.65–100.09 aralığında değişiklik göstermiş olup, optimum mikrokapsülleme değişkenleri; sertleşme süresi 60 dakika, karıştırma hızı 450 rpm, jelatin miktarı ve kuersetin konsantrasyonu sırasıyla 30 mL, 10 mM/g jelatin olarak belirlenmiştir (Sutaphanit ve Chitprasert, 2014).

3. MATERYAL-METOT

3.1. Materyal

Tatlı fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisi araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Kökeni Tokat olan R10L kodlu tatlı fesleğen genotipi Isparta ili (37° 45' K ve 30° 33' D, 997 m) Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi (TARUM) deneme alanlarında Prof. Dr. İsa Telci tarafından tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yetiştirilmiştir. Çiçeklenme döneminde hasat edilen örnekler 35 °C'de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulup, % nem miktarı nem tayin cihazı (Radway, Polonya) kullanılarak % 7.99 olarak belirlendikten sonra 2 mm'lik elekten geçecek şekilde öğütülerek analize hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasında analizlerde; nitrojen gazı (Yıldız azot, Isparta), sodyum karbonat, 2,2-dipenil-1-pikril-hidrazil, kitosan, sodyum sitrat-2-hidrat, aljinik asit, sitrik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, klorojenik asit, kafeik asit, kuersetin, luteolin, kamferol, protokateşik asit, kateşin, epikateşin, şirincik asit, *p*-kumarik, apigenin, Intestinal acetone rat powder (I1630) (Sigma-Aldrich Co., LTD., Amerika), galik asit, protokateşik asit, ferulik asit, rutin, hesperidin, rosmarinik asit (Fluka, Amerika), sodyum hidroksit, asetik asit (ISO-LAB, Almanya), Folin-Ciocalteu fenol reaktifi (Merck, Almanya) kimyasalları kullanılmıştır.

3.2. Metotlar

3.2.1. Ultrasonik su ekstraksiyon işlem koşullarının optimizasyonu

Tatlı fesleğen bitkisi yapraklarından fenolikçe zengin ultrases destekli (İvymen, İspanya) su ekstraksiyon optimizasyonu için Yanıt Yüzey Metodu (RSM) ve deneysel tasarım için Box-Behnken deney tasarımı tercih edilmiştir. Bağımsız değişkenler olan genlik (%), süre (dakika) ve bitki/çözücü oranının (g/100 mL) minimum ve maksimum faktör seviyelerini belirlemek için ön denemeler üçer tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Tatlı fesleğen bitki yapraklarından ultrasonik su ekstraksiyon ön deneme sonuçları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tatlı fesleğen bitki yapraklarından ultrasonik su ekstraksiyon ön deneme sonuçları (Bağımsız değişkenler: Genlik (%), Süre (dakika), Bitki/Çözücü Oranı (g/100 mL); Bağımlı değişkenler: Ekstraksiyon Verimi (%), Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/g bitki))

Uygulama No	Genlik	Süre	Bitki/Çözücü Oranı	Ekstraksiyon Verimi*	Toplam Fenolik Madde*
1.1	50	15	1	22.67±2.08 l	63.03±0.00 r
2.1	50	15	2	33.33±1.84 k	86.55±0.00 p
3.1	50	15	3	36.78±3.34 jk	92.87±0.00 n
4.1	50	15	4	50.17±2.63 f	103.13±0.27 l
1.2	100	15	1	34.20±2.59 k	88.14±0.54 o
2.2	100	15	2	41.00±1.00 hi	106.13±0.24 j
3.2	100	15	3	43.56±3.17 gh	113.88±0.32 g
4.2	100	15	4	55.25±2.54 e	121.48±0.45 d
1.3	50	45	1	39.00±1.00 ij	94.96±0.00 m
2.3	50	45	2	45.50±1.22 g	107.27±0.18 i
3.3	50	45	3	56.00±3.28 de	116.57±0.43 f
4.3	50	45	4	63.92±1.91 c	123.13±0.00 c
1.4	100	45	1	46.67±1.53 fg	104.26±0.00 k
2.4	100	45	2	59.83±2.75 d	118.43±0.54 e
3.4	100	45	3	68.78±2.12 b	130.21±0.24 b
4.4	100	45	4	75.92±2.96 a	135.01±0.32 a

*Aynı sütunda aynı harfle işaretlenen ortalama değerler, istatistik olarak birbirinden farklı değildir (p<0.05).

Çalışma sonuçlarına göre Çizelge 3.1 incelendiğinde, genlik, süre ile bitki/çözücü oranının bağımlı değişkenler olarak alındığı ekstraksiyon uygulamaları arasındaki farklılık istatistiksel olarak $p \leq 0.05$ seviyesinde önemli bulunmuştur. istatistiksel olarak en düşük ekstraksiyon verimi (% 22.67) ve toplam fenolik madde miktarı (63.03 mg GAE/g bitki) bağımsız değişkenlerden genliğin % 50, sürenin 15 dk ve bitki/çözücü oranının 1 g/100 mL olduğu değişkenlerde bulunmuştur. İstatistiksel olarak en yüksek ekstraksiyon verimi (% 75.92) ve toplam fenolik madde miktarı (135.01 mg GAE/g bitki) ise bağımsız değişkenlerden genliğin % 100, sürenin 45 dk ve bitki/çözücü oranının 4 g/100 mL olduğu değişkenlerde bulunmuştur.

Yukarıda verilen ön deneme sonuçlardan yola çıkarak Box-Behnken deneysel tasarımında kullanacağımız bağımsız değişkenlerin minimum (-1) ve maksimum (1) faktör seviyeleri sırasıyla genlik için % 50 ile 100, süre 15 ile 45 dk ve bitki/çözücü oranı için ise 1.0 ile 4.0 g/100 mL olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1’de bağımsız değişkenlere ait seviyeler kodlanmış ve kodlanmamış değerler olarak verilmiştir.

Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri

Bağımsız Değişkenler	Faktör Seviyeleri		
	-1	0	+1
X1: Genlik (%)	50	75	100
X2: Süre (dakika)	15	30	45
X3: Bitki/Çözücü Oranı (g/100 mL)	1.0	2.5	4.0

Tez çalışmamızda, tatlı fesleğen bitki yapraklarından ultrasonik su ekstraksiyonu için 3 adet merkezi nokta içeren 15 farklı uygulamaya ait Box-Behnken deney tasarımı ise Çizelge 3.2’ te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Box-Behnken deneysel tasarımı

Uygulama No ^a	X1	X2	X3	Genlik (%)	Süre (dk)	Bitki/Çözücü Oranı (g/100 mL)
1	0	-1	1	75	15	4.0
2	0	0	0	75	30	2.5
3	-1	0	-1	50	30	1.0
4	0	0	0	75	30	2.5
5	-1	1	0	50	45	2.5
6	1	-1	0	100	15	2.5
7	0	0	0	75	30	2.5
8	1	0	-1	100	30	1.0
9	-1	-1	0	50	15	2.5
10	0	1	1	75	45	4.0
11	0	-1	-1	75	15	1.0
12	1	1	0	100	45	2.5
13	0	1	-1	75	45	1.0
14	-1	0	1	50	30	4.0
15	1	0	1	100	30	4.0

a, Rastgele seçilmiş

Deney verileri Minitab İstatistiksel Analiz Yazılımı (Minitab 17.0) kullanılarak analiz edilip, model yeterliliği ve regresyon testleri R^2 ve düzeltilmiş- R^2 değerleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Yanıt yüzeyleri ve tasarımları yaklaşımında modeller iki değişkenli ikinci dereceden eşitliğe göre belirlenmiştir. Yanıt olarak ekstraktların toplam fenolik madde miktarları ve ekstraksiyon verimleri kullanılmıştır (Meyers vd., 2002; Radojković vd., 2012). Kontrol olarak ise geleneksel yöntemlerden sıcak su ile tatlı fesleğenden fenolik ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Öğütülmüş 5 g tatlı fesleğen yaprakları 100 mL distile su ile 95 °C'de 30 dakika boyunca ekstrakte edilmiştir (Ranilla vd., 2010; Wongsu vd; 2012).

3.2.2. Ekstraksiyon verim miktarının belirlenmesi

Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak bitkilerden ultrasonik su ekstraksiyonu ve sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen örnekler süzülüp santrifüj (Sigma, Almanya), edilmiştir. Süzüntüden alınan 5 mL örnek etüvde 105 °C'de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuştur. Tartım sonrası ekstraksiyon verim miktarı % (g kuru madde/100 g) olarak hesaplanmıştır. Analizler üçer tekerrür halinde yapılmıştır.

3.2.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak bitkilerden ultrasonik su ekstraksiyonu ve sıcak su ekstraksiyonu ile elde edilen örnekler süzülüp santrifüj edildikten sonra, örneklerin toplam fenolik madde miktarları Folin & Ciocalteu metodu kullanılarak belirlenmiştir (Li vd. 2017). Farklı oranlarda seyreltilmiş fenolik ekstraktlardan 0.4 mL alınarak bir tüp içerisine pipetlenip üzerine 10 kat seyreltilmiş 2 mL Folin-Ciocalteu ayırıcı eklenerek vorteks (Wisd, Kore) ile karıştırılmıştır. Daha sonra karışıma 1.6 mL % 7.5'lik Na_2CO_3 ilave edilerek tekrar karıştırılmıştır. Karışım karanlıkta bir saat bekletildikten sonra, çözeltinin absorbansı şahit çözeltiye karşı 765 nm dalga boyunda spektrofotometre (T70+UV/VIS spectrophotometer, PG Instruments, İngiltere) ile ölçülmüştür.

Sonuçlar gallik asitten hazırlanmış çözeltilerden elde edilen kalibrasyon eğrisi ($R^2=0.9967$) kullanılarak hesaplanmıştır. Analizler üçer tekerrür halinde yapılmıştır.

3.2.4. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının HPLC ile fenolik bileşiminin belirlenmesi

Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak bitkilerden ultrasonik su ekstraksiyonu ile optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen örnek süzülüp santrüfjü edildikten sonra, süzüntü mikropor filtreden geçirilerek (0.45 μm) DAD (Photodiode Array) dedektör içeren HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisine) (Shimadzu, Japonya) enjeksiyonu yapılmıştır. Çalışmada zıt faz (reversed-phase)-C18 (Agilent Eclipse XDB-C18 250x4,60 mm 5 mikron) analitik kolon, koruyucu kolon (Agilent Eclipse XDB-C18 4.6 x 12.5 mm 5 mikron) ile birlikte kullanılmıştır. Dalga boyu 278 nm, akış hızı 0.8 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 20 mikrolitre ve kolon fırın sıcaklığı 30 °C olacak şekilde ayarlanmıştır. Fenolik maddelerin profilini belirlemek için kademeli elüsyon (gradient) programı kullanılmıştır (Caponio vd., 1999).

Kademeli elüsyon profilinde mobil faz olarak, asetik asitin- suda %3'lük çözeltisi (Çözücü A) ve kromatografik saflıkta metanol (Çözücü B) çözeltileri kullanılmıştır. Standartların tespit limiti (limit of detection- LOD) ve tayin limiti (limit of quantification-LOQ) alıkonma zamanı sırasıyla gallik asit için 0.01 ve 0.02 $\mu\text{g/mL}$, protokateşik asit için 0.05 ve 0.16 $\mu\text{g/mL}$, kateşin için 0.05 and 0.16 $\mu\text{g/mL}$, p-hidroksibenzoik asit için 0.005 and 0.01 $\mu\text{g/mL}$, klorojenik asit için 0.02 and 0.07 $\mu\text{g/mL}$, kafeik asit için 0.02 and 0.05 $\mu\text{g/mL}$, (-)-epicateşin için 0.05 and 0.15 $\mu\text{g/mL}$, şirincik asit için 0.01 and 0.02 $\mu\text{g/mL}$, p-kumarik asit için 0.01 and 0.03 $\mu\text{g/mL}$, ferulik asit için 0.01 and 0.02 $\mu\text{g/mL}$, benzoik asit için 0.06 and 0.19 $\mu\text{g/mL}$, o-kumaric acid için 0.005 and 0.01 $\mu\text{g/mL}$, rutin için 0.06 and 0.18 $\mu\text{g/mL}$, hesperidin için 0.02 and 0.06 $\mu\text{g/mL}$, rosmarinik asit 0.03 and 0.19 $\mu\text{g/mL}$, eriodiktiol için 0.03 and 0.08 $\mu\text{g/mL}$, sinamik acid 01 and 0.03 $\mu\text{g/mL}$, kuersetin 0.11 and 0.32 $\mu\text{g/mL}$, luteolin için 0.03 and 0.10 $\mu\text{g/mL}$, kamferol için 0.02 and 0.06 $\mu\text{g/mL}$, apigenin için 0.03 and 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 'dir.

Ekstrakta bulunan fenolik bileşiklerin miktarı ise kalibrasyon eğrileri kullanılarak mg/g olarak hesaplanmıştır. Analizler üçer tekerrür halinde yapıp, HPLC kademeli elüsyon programı Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. HPLC kademeli elüsyon programı

Zaman	Metanol	Sulu asetik asit (% 3)
3	7	93
20	28	72
28	25	75
35	30	70
45	33	67
60	33	67
62	42	58
70	50	50
75	80	20
80	10	90

3.2.5. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının GS-MS ile uçucu yağ bileşiminin belirlenmesi

Tatlı fesleğen uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesinde HS-SPME (Tepe Boşluğu-Katı Faz Mikro Ekstraksiyon) tekniği, Shimadzu (Japonya) GC-MS (Gaz Kromatografisi Kütle Spektroskopisi) cihazı kullanılmıştır. SPME örnek şişesine tartılan 2 g yağ örneği silikon septa ile kapatılmış ve ısıtıcıya yerleştirilip 45 °C 15 dakika tutularak örneğin dengeye gelmesi sağlanmıştır. CAR/PDMS (Karboksen /Polidimetil Siloksan) fiber şişeye daldırıldıktan sonra ise 45 dakika beklenerek, tepe boşluğundaki uçucu bileşenlerinin fibere adsorbe edilmesi sağlanmıştır. Daha sonra gaz kromatografi cihazının enjeksiyon bloğunda 5 dakika bekletilerek, adsorbe edilen uçucu yağ bileşenleri desorbsiyonla kolona gönderilmiştir. Cihaz şartları aşağıda verilmiştir:

Kullanılan Dedektör: GCMS-QP2010 SE

Enjeksiyon bloğu sıcaklığı: 250 °C

Dedektör sıcaklığı: 250 °C

Taşıyıcı Gaz: Helyum

Akış Hızı (mL/dakika): 1.61

İyonlaşma türü: EI (Elektron Impact)

Kullanılan Kolon: 40 °C'de 2 dakika bekledikten sonra 250 °C'ye dakikada 4 °C'lik artışla ulaşma ve 250 °C'de 5 dakika bekleme

Fırın Sıcaklık Programı: Wiley, Nist, Tutor, FFNSC kütüphaneleri taranarak alan (%) olarak belirlenmiştir.

3.2.6. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesinin belirlenmesi

Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak bitkilerden ultrasonik su ekstraksiyonu ile optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen örnekler süzülüp santrifüj edildikten sonra, örneklerin antioksidan etkisi Dorman vd. (2003) tarafından yayınlanmış olan DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi tayini kullanılarak hesaplanmıştır. Fenolik ekstraktan 50 µL alınarak tüplere pipetlenip ve üzerine 450 µL Tris-HCl tamponu (50 mM, pH:7.4) ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışıma 1.00 mL DPPH (0.10 mM, metanol içerisinde) çözeltisinden eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Reaksiyon süresinin bitiminde çözeltinin 517 nm'deki absorbansı spektrofotometrede okunup, kontrol olarak fenolik ekstraktı yerine saf su kullanılmıştır. IC₅₀ değeri hesaplanmadan önce, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktların DPPH serbest radikalleri yakalama aktivitesi aşağıdaki formülden yararlanarak belirlenmiştir:

$$\% \text{ İnhibisyon (DPPH)} = [(Abs_{Kontrol} - Abs_{Örnek}) / Abs_{Kontrol}] * 100 \quad (3.1)$$

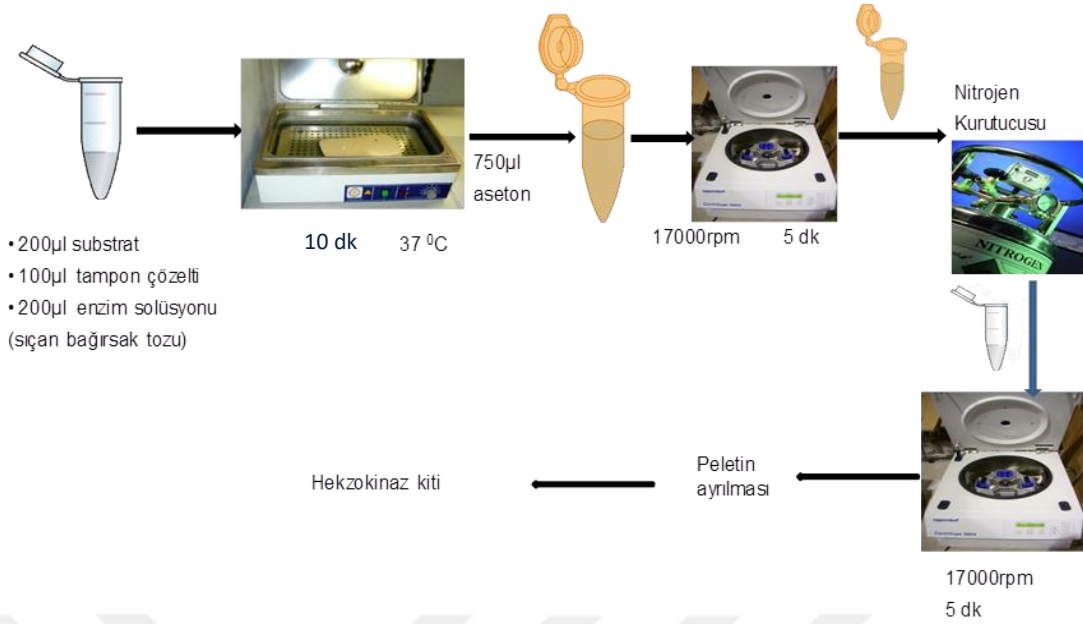
Burada Abs_{Kontrol} ve Abs_{Örnek} sırasıyla kontrol ve örnek için okunan absorbans değerleri ni temsil etmektedir.

Ekstrakt konsantrasyonlarının serbest radikallerin % 50'sini inhibe eden miktarı (IC₅₀) ise, ekstrakt konsantrasyonlarına karşı serbest radikalleri yakalama aktivitesi (%) değerlerinin yerleştirilmesi ile elde edilen grafik kullanılarak hesaplanmıştır ve sonuçlar IC₅₀=mg/mL olarak verilmiştir. Analizler üzer tekerrürlü yapılmıştır.

3.2.7. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının antidiyabetik aktivitesinin belirlenmesi

Metodun prensibi sıçan bağırsak tozundaki α -glikozidaz enzimlerinin (sükraz, maltaz ve izomaltaz) aktivitelerinin saptanmasına dayanmaktadır. Bu araştırmada α -glikozidaz aktivitesinin belirlenmesinde sükrozun hidrolizinden oluşan glikozun, heksokinaz kiti ile ölçölmesi prensibinden faydalanılmıştır. 200 μ L substrat 200 μ L enzim ve 100 μ L tampon çözelti karıştırılarak 37 $^{\circ}$ C'de 10 dakika boyunca su banyosunda (Selecta, İspanya) inkübe edilmişlerdir. Daha sonra enzim aktivitesini durdurmak için 750 μ L aseton eklenerek 10 saniye vortekslenmiş ve ardından 5 dakika santrifüjlenmiştir. Son olarak elde edilen örneklerdeki asetonun nitrojen gazı ile uçurulması sağlanmıştır. Oluşan glikoz miktarının ölçölmesi için her bir örnekten 10 μ L UV görünür 96 kuyucuklu küvete aktarılarak üzerlerine 250 μ L heksokinaz enzimi eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dk inkübasyonu sonucu 340 nm'de ELISA'da okuması yapılmıştır (şekil 3.1). Hem deneyin doğrulanması hem de ekstraktın antidiyabetik aktivitesinin diyabet hastalarının tedavisinde kullanılan ticari kimyasal ilaçlarla karşılaştırılabilmesi amacıyla aynı analiz pozitif kontrol olarak kullanılan metformin için de yapılmıştır.

Deneyin optimizasyonu için ilk olarak Michaelis Sabiti (K_m/V_{max}) ölçölmüş ve K_m 18 mM, V_{max} ise 0.09 μ mol sükroz hidrolizi/dakika olarak bulunmuştur. Ardından optimum inkübasyon süresi ve enzim konsantrasyonu belirlemek için farklı konsantrasyonlardaki enzim miktarı ve farklı zaman aralıklarında 37 $^{\circ}$ C'de sükrozun hidrolizi gerçekteştirilmiştir. Elde edilen değerlerden enzim spesifik aktivitesinin en yüksek tespit edildiği, 10 dakika ve 15 mg/mL sıçan bağırsak tozu konsantrasyonları optimum inkübasyon süresi ve enzim konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Glikozun belirlenilmesinde yararlanılan kimyasal reaksiyon aşamaları

3.2.8. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının iyonik jelasyon ve kitosan sistemi ile enkapsüle edilmesi

Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktlar süzülüp, santrüfuj edilerek enkapsülasyon için berrak üst faz alınmıştır. Tatlı fesleğen, ultrasonik su ekstraksiyonu sonrası fenolikçe zengin suda çözünür ekstraktları iyonik jelasyon ve kitosan sistemi ile enkapsüle edilerek, enkapsüle edilen örneklerin enkapsülasyon etkinliği ve nem miktarı belirlenmiştir.

Kitosan kaplı hidrojel boncukların üretimi için sırası ile aljinat, kitosan, CaCl_2 çözeltileri ve jelleşme ortamı hazırlanarak taneciklerin üretimi gerçekleştirilmesi için aşağıda verilen yöntem kullanılmıştır.

Aljinat çözeltinin hazırlanmasında aljinat oranı 20 g/L olacak şekilde toz aljinat destile suda çözündürülmüştür. Aljinat tamamen çözündükten sonra 1N sitrik asit çözeltisi kullanılarak aljinat çözeltisinin pH'sı 4.5 olarak ayarlanmıştır. Çözelti kullanılmadan önce karıştırma esnasında oluşan hava baloncuklarının giderilmesi amacıyla 24 saat +4 °C'de bekletilmiştir.

Kitosan çözeltisinin hazırlanmasında ise kitosan yüzdesi, yapılan ön denemeler ile deneysel olarak belirlenip, sulu asetik asit (glasiyal) (10 g/L) içinde çözündürülerek hazırlanmıştır. CaCl₂ çözeltisinin hazırlanması için ise; jelleşme ortamında kullanılacak olan CaCl₂ çözeltisi konsantrasyonu 20 g/L olacak şekilde CaCl₂-kitosan çözeltisi içinde çözündürülerek hazırlanmıştır.

Kitosan kaplı hidrojel boncukların üretilmesi aşamasında; fenolikçe en zengin tatlı fesleğen su ekstraktı süzülüp, santrüfuj edildikten sonra berrak üst faz alınarak, ekstrakt/aljinat oranı 1/9 olacak şekilde 30 dakika sodyum aljinat çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karışım peristaltik pompa (Ismatec, ABD) yardımıyla, kitosanlı CaCl₂ çözeltisine damlatma çözeltisinin jelleşme ortamına oranı 1/10 olacak şekilde damlatılmıştır. Belirli süre jelleşme ortamında sertleştirilen hidrojel boncuklar saf su ile yıkanarak oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır (Çoruhli, 2013).

3.2.9. Enkapsülasyon etkinliği (% EE)

Hidrojel boncukların enkapsülasyon etkinliği, hidrojel boncukların içerisine enkapsüle edilen toplam fenolik maddenin bitki ekstraktlarındaki fenolik madde miktarına oranlanması ile Eşitlik 3.2 kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda 1 g enkapsüle hidrojel boncuk 10 mL sodyum sitrat solisyonuna (% 5 w/v) konularak 37 °C'de 3 saat çalkalanıp, Folin & Ciocalteu metodu kullanılarak polifenol içeriği tespit edilmiştir (Najafi-Soulari vd., 2016).

$$EE \% = (We/Wt) \times 100 \quad (3.2)$$

Burada, We enkapsüle edilmiş örneklerin polifenol miktarını, Wt ise ekstraktın polifenol miktarını temsil etmektedir.

3.2.10. Enkapsüle örneklerin nem analizi

Hidrojel boncuklarının nem içerikleri gravimetrik olarak belirlenmiştir. Hidrojel boncuklar 80 °C’de sabit tartıma gelene kadar bekletilip aşağıdaki eşitlik baz alınarak hesaplamalar yapıp, sonuçlar % nem cinsinden ifade edilmiştir (Najafi-Soulari vd., 2016).

$$\text{Nem içeriği (\%)} = ((W_w - W_d)/W_w) \times 100 \quad (3.3)$$

Burada, W_w yaş hidrojel boncuk ağırlığını, W_d ise kuru hidrojel boncuk ağırlığını temsil etmektedir.

3.3. İstatistiksel Analizler

Ekstraksiyon ön deneme uygulamaları tam şansa bağlı deneme planına göre 2 tekerrür, analizler ise 3 paralel halinde tekrar edilmiştir. Elde edilen verilerin istatistik değerlendirilmesinde SPSS 20.0 İstatistik Programı kullanılmış olup, muameleler arasındaki farkın önemi varyans analiziyle tespit edilmiştir. Önemli farklılıkların belirlenmesinde ise Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

Tatlı fesleğen ekstraksiyonu için, elde edilen yanıtların değerlendirilmesi ve optimum noktaların bulunabilmesi için Minitab paket programı yanıt yüzey metodu (Response Surface Method, RSM) kullanılmıştır.

Deney verileri Minitab istatistiksel analiz yazılımı (Minitab 16.1.1) kullanılarak analiz edilip, modelin performansı R^2 değerleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Box-Behnken deney tasarımı model tasarımında kullanılmıştır. Model iki değişkenli ikinci dereceden eşitliğe göre değerlendirilmiştir.

$$Z = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^1 \sum_{j=i+1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.4)$$

Eşitlikte Z bağımlı değişken, X bağımsız değişken, β_0 sabit katsayı, β_i birinci dereceden (doğrusal) denklem katsayısı, β_{ii} ikinci dereceden denklem katsayısı ve β_{ij} iki faktörlü çapraz etkileşim katsayısı olarak belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Tatlı Fesleğen Ekstraktlarının Verim ve Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Ekstraksiyon Modellemesi

Tatlı fesleğen ekstraktlarının farklı ekstraksiyon koşullarındaki ekstraksiyon verimi (%) ve toplam fenolik madde (mg GAE/g bitki) miktarları Çizelge 4.1'de ve ilgili istatistiksel analiz sonuçları 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tatlı fesleğen ekstraktlarının, ekstraksiyon koşullarına ilişkin

ekstraksiyon verimi (%) ve toplam fenolik madde (mg GAE/g bitki) değerlerinde meydana gelen değişimler

Deney No ^a	Genlik	Süre	Bitki/Çözücü Oranı	Verim	Toplam Fenolik Madde
1	75	15	4.0	46.3	66.9
2	75	30	2.5	38.3	78.3
3	50	30	1.0	30.3	85.8
4	75	30	2.5	38.9	77.8
5	50	45	2.5	40.9	81.9
6	100	15	2.5	42.4	90.2
7	75	30	2.5	39.0	77.5
8	100	30	1.0	44.7	127.6
9	50	15	2.5	30.7	54.3
10	75	45	4.0	62.0	61.8
11	75	15	1.0	26.0	78.8
12	100	45	2.5	52.4	92.7
13	75	45	1.0	34.3	107.7
14	50	30	4.0	50.3	80.5
15	100	30	4.0	63.9	91.8
Konrol	-	-	5.0	29.2	35.0

a, Rastgele seçilmiş

Çizelge 4.1 incelendiğinde tatlı fesleğenin ultrases destekli su ekstraksiyonu modellemesi ile elde edilen ekstraksiyon verimlerinin (%) 26.00 ile 63.91 arasında değiştiği görülmektedir. Tatlı fesleğenin ultrases destekli su ekstraksiyonunda en düşük ekstraksiyon verimi 1 g bitkiye % 75 genlik ve 15 dk sürenin uygulandığı örneklerde, en yüksek verimin ise 4 g bitkiye % 100 genlik ve 30 dk sürenin uygulandığı örneklerde tespit edilmiştir. Konrol olarak kullandığımız geleneksel yöntemlerden tatlı fesleğenden sıcak su ekstraksiyonu

sonucu ekstraksiyon verimi % 29.2 olarak bulunmuştur. Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen % 63.9 ekstraksiyon veriminin geleneksel yöntemle elde edilen sonucun yaklaşık iki katı olduğu görülmektedir. Yapılan literatür araştırmalarında tatlı fesleğenin ekstraksiyon veriminin incelendiği ultrases destekli ekstraksiyonunu konu olan herhangi bir çalışmaya rastlanmamış olup, farklı çözücü ve ekstraksiyon metotları kullanılarak yapılan tatlı fesleğen ekstraksiyon çalışmalarında ekstraksiyon verimi daha düşük miktarlarda bulunmuştur. Ekstraksiyon verimi (%) El-Beshbishy ve Bahashwan (2012) tarafından 17 (w/w) ve Jayasinghe vd. (2003) tarafından ise 6.12 olarak bildirilmiştir. Literatür taramaları sonucunda elde edilen bulguların yapılan çalışmada elde edilen sonuçlardan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin kullanılması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

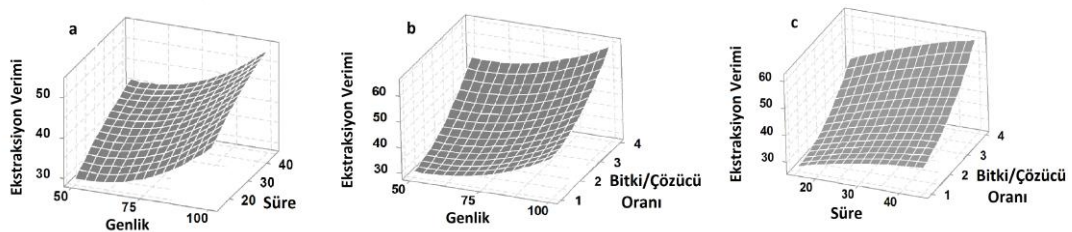
Çizelge 4.2 incelendiğinde ise yanıt yüzey metoduna göre elde edilen modelde bağımsız değişkenlerden genlik, süre ve bitki/çözücü oranının ekstraksiyon verimi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.001$). Benzer şekilde model içinde genlik ve bitki/çözücü oranının ikinci derece değişkenleri istatistiksel olarak % 99 seviyesinde önemlidir. Ancak, modelde süreye bağlı olan ikinci derece terim ile genlik ve süre, genlik ve bitki/çözücü oranı, süre ve bitki/çözücü oranı etkileşimlerinin ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu saptanmıştır ($p \geq 0.05$). Deneme desenindeki değişkenlere bağlı olarak elde edilen ekstraksiyon verim değerlerindeki varyans modelin % 99'unu açıklayabilmektedir (4.2).

Çizelge 4.2. Tatlı fesleğen ekstraktlarının, ekstraksiyon koşullarına ilişkin ekstraksiyon verimi (%) ve toplam fenolik madde (mg GAE/g bitki) değerlerinde meydana gelen değişimlere ait model katsayılar değerlendirme parametreleri

Model Katsayıları	Verim	Toplam Fenolik Madde
β_0	39.2	24.2
β_1 (Güç)	-0.687***	-0.834***
β_2 (Süre)	0.486***	4,746***
β_3 (Bitki/Çözücü Oranı)	-4.96 ***	-1,12***
β_{11}	0.00640**	0,01563**
β_{22}	-0,00518ns	-0,03492**
β_{33}	2,025 **	3,899**
β_{12}	-0,00016ns	-0,01676**
β_{13}	-0,0050ns	-0,2036**
β_{23}	0,0824ns	-0,3781**
Model	***	***
Regresyon katsayısı (R^2)	99.16	98.99
Düzeltilmiş R^2 (Adj- R^2)	97.63	97.17
Tahmin edilen R^2 (Pred- R^2)	86.70	83.91

β_0 sabit katsayı, β_i Birinci dereceden (Doğrusal) denklem katsayısı, β_{ii} ikinci dereceden denklem katsayısı ve β_{ij} iki faktörlü çapraz etkileşim katsayısıdır. ns, İstatistiksel olarak önemsiz ($p \geq 0.05$); **, İstatistiksel olarak % 99 seviyesinde önemli ($p \leq 0.01$); ***, İstatistiksel olarak % 99.9 seviyesinde önemli ($p \leq 0.001$).

Tatlı fesleğenin ultrases destekli su ekstraksiyon veriminin (%); bağımsız değişkenlerinden genlik ve sürenin etkisine, genlik ve bitki/çözücü oranı etkisine, süre ve bitki/çözücü oranı etkisine bağlı değişimi sırası ile Şekil 4.1a, b ve c'de verilmiştir. Şekiller incelendiğinde; genlik, süre ve bitki/çözücü oranlarındaki artışa paralel olarak ekstraksiyon verim miktarlarının da arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Tatlı fesleğenin ultrases destekli sulu ekstraktının ekstraksiyon verim değerinde, ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden genlik ve sürenin etkisine (a), genlik ve bitki/çözücü oranı etkisine (b), süre ve bitki/çözücü oranı (c), etkisine bağlı değişimi

Literatür taramalarında tatlı fesleğen bitkisi için genlik, süre ve bitki/çözücü oranının ekstraksiyon verimi üzerine etkisinin araştırıldığı herhangi bir ekstraksiyon modelleme çalışmasına rastlanılmamıştır. Ancak farklı bitkilerin ultrases destekli ekstraksiyonunu konu alan çalışmalar incelendiğinde; çalışma sonuçları ile ilgili olarak, Yang ve Zhang (2008) *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb bitkisi yapraklarını kullandıkları çalışmada kademeli ekstraksiyon ile her 30 dakikada bir çözüyü yenileyerek, toplam 90 dakikalık olan ekstraksiyon süresinde en yüksek verimi elde ettiklerini ve ekstraksiyon veriminin çözücü oranı (etanol) ile doğru orantılı olarak arttığını belirtmişlerdir. Falleh vd. (2012), *Mesembryanthemum edule* bitkisinin metanol ve etanol ile ekstraksiyonunda 10 dakikalık ekstraksiyon süresi ile daha yüksek verimin elde edildiğini tespit etmişlerdir. Izadiyan ve Hemmateenejad (2016) İran fesleğeni ile yaptıkları ekstraksiyonda en etkili parametrelerin metanol-su yüzdesi ve ekstraksiyon sıcaklığı olduğunu, sürenin ise önemsiz bir faktör olduğunu tespit etmişlerdir. Yüksek sıcaklıkların ise ekstraksiyon verimini arttırdığını, ancak bileşenlerin yapısını bozabileceğini ve çözgen içerisindeki su yüzdesi arttıkça ekstraksiyon veriminin arttığını bulmuşlardır.

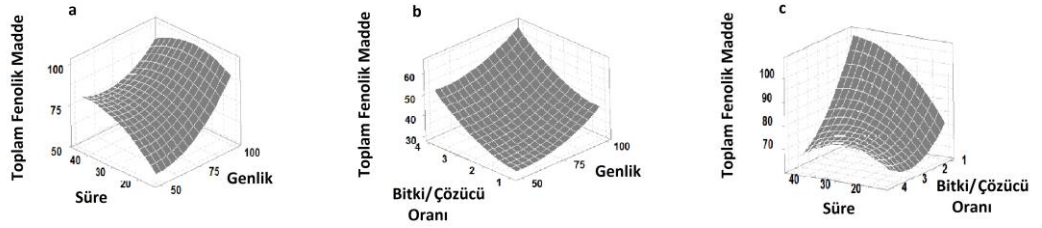
Şekil 4.1. incelendiğinde tatlı fesleğen toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g bitki) sonuçlarının 54.3 ile 127.6 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Tatlı fesleğen ultrases destekli sulu ekstraksiyonunda en düşük toplam fenolik madde miktarı % 50 genlik, 15 dk süre, 2.5 g bitki ile, en yüksek fenolik madde miktarı ise % 100 genlik, 30 dk süre ve 1.0 g bitki kullanılarak yapılan ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. Kontrol olarak kullandığımız geleneksel yöntemlerden tatlı fesleğenden sıcak su ekstraksiyonu sonucu toplam fenolik madde miktarı 35.00 mg GAE/g bitki olarak bulunmuştur. Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen 127.6 mg GAE/g bitki toplam fenolik madde miktarının geleneksel yöntemle elde edilen sonucun yaklaşık dört katı olduğu görülmektedir. Kontrol olarak kullanılan geleneksel yöntemlerden sıcak su ile tatlı fesleğen fenolik ekstraksiyonu sonucu toplam fenolik madde miktarı 35.00 mg GAE/g bitki olarak belirlenmiştir. Yapılan araştırmalarda tatlı fesleğenin ultrases destekli ekstraksiyonu konu alan

herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Farklı çözücü ve ekstraksiyon metotları kullanılarak yapılan tatlı fesleğen ekstraksiyon çalışmalarında toplam fenolik madde miktarı 38.48 mg GAE/g bitki, (Wongsa vd., 2012) ve 3.54 mg GAE/g bitki (Złotek vd., 2016) olarak belirlenmiş olup, literatür sonuçlarının yapılan çalışmada elde edilen sonuçlardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun ultrases destekli ekstraksiyon sisteminin kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 4.2. incelendiğinde ise tatlı fesleğenin toplam fenolik madde miktarları için geliştirilmiş, ekstraksiyon parametrelerine bağlı değişimi ifade eden model incelendiğinde; genlik, süre ve bitki/çözücü oranının birinci dereceden terimleri istatistiksel olarak % 99.9 seviyesinde önemli bulunmuştur. Bununla birlikte ekstraksiyon parametrelerinden genlik, süre ve bitki/çözücü oranının hem ikinci derece değişkenlerinin hem de değişkenlerin etkileşimlerinin (genlik ve süre, genlik ve bitki/çözücü oranı, süre ve bitki/çözücü oranı) toplam fenolik madde miktarı için istatistiksel olarak önemli seviyede olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0.01$). Ekstraksiyon parametrelerine bağlı modelin tahminin de yüksek performans ile çalıştığı belirlenmiştir ($R^2 > 0.98$).

Toplam fenolik madde miktarı üzerine; bağımsız değişkenlerden genlik ve sürenin etkisine, genlik ve bitki/çözücü oranı etkisine, süre ve bitki/çözücü oranı etkisine bağlı değişimi sırası ile Şekil 4.2a, b ve c’de verilmiştir. Şekil 4.2a incelendiğinde genlik ve sürenin toplam fenolik madde miktarı üzerinde olumlu etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Her iki değişkenin artışı ile toplam fenolik madde miktarında artış gözlenmiştir. Aynı zamanda bu iki değişkenin etkileşiminin de önemli olduğu anlaşılmaktadır. Düşük genlik değerlerinde sürenin sürekli ve pozitif bir etkisi varken, yüksek genlik değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde bu etki zayıflamış ve süre ile bağlantılı olarak önce kısmi bir artış gözlenmiş, sonrasında ise yine sınırlı bir azalma görülmüştür (Şekil 4.2a). Genlik ve bitki/çözücü oranının toplam fenolik madde miktarı üzerindeki etkisine bakıldığında her iki değişkendeki artışın fenolik madde miktarını arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2b). Son olarak süre ve bitki/çözücü oranının toplam fenolik madde miktarı üzerindeki etkisi Şekil

4.2c'de gösterilmiştir. Bitki/çözücü oranı arttıkça toplam fenolik madde miktarında azalış görülmüştür. Süre artışına bağlı olarak ise, toplam fenolik madde miktarında da sürekli ve pozitif bir artış gözlemlenmiştir. Ancak, yüksek bitki/çözücü değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde sürenin bu etkisi zayıflamış ve süre ile bağlantılı olarak önce kısmi bir artış gözlenmiş, sonrasında ise yine sınırlı bir azalma görülmüştür (Şekil 4.2c).



Şekil 4.2. Tatlı fesleğenin ultrases destekli sulu ekstraktının toplam fenolik madde miktarının ekstraksiyon bağımsız değişkenlerinden genlik ve sürenin etkisine (a), genlik ve bitki/çözücü oranı etkisine (b), süre (dakika) ve bitki/çözücü oranı (c) etkisine bağlı değişimi

Yapılan literatür taramalarında tatlı fesleğen için ekstraksiyon modellemesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamış olup, farklı bitki ve çözücülerini konu alan araştırmalar incelendiğinde; bu çalışma sonuçları ile uyumlu olarak Juntachote vd. (2006) ultrases ekstraksiyonunda azalan güç ve artan sıcaklık ile fenolik madde miktarında artış ve Dent vd. (2015) ise fenolik madde miktarında belirli bir süreye ve sıcaklığa kadar artış, sonrasında azalış olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Upadhyay vd. (2015), ekstraksiyon süresinin artmasına bağlı olarak polifenol içeriğinin arttığını ancak belirli bir süreden sonra polifenollerin zarar gördüğünü bildirmişlerdir. Bu bağlamda, ekstraksiyon parametrelerinin toplam fenolik madde miktarına etki ettiği, etki derecelerindeki farklılığın ise kullanılan bitki türü, ekstraksiyon parametreleri ile kullanılan çözücüye bağlı olarak değişebileceği sonucuna varılmıştır.

4.2. Tatlı Fesleğen Ekstraktlarının Verim ve Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Optimizasyonu ve Model Doğrulanması

Yanıt yüzey metodu kullanılarak tatlı fesleğenden ultrases destekli su ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimi (%) ve toplam fenolik madde miktarları (mg GAE/g bitki) maksimize edilerek elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları sırasıyla genlik, süre ve bitki/çözücü oranı için % 100, 45 dk ve 1.06 g bitki/100 mL su olarak saptanmıştır. Model tarafından optimum ultrases destekli su ekstraksiyon koşullarında tatlı fesleğen ekstraksiyon verimi ve ekstraktın toplam fenolik madde miktarı sırasıyla % 38.99 - 52.13 ve 116.37 - 139.92 mg GAE/g bitki aralığında tahmin edilmiştir.

Modelin tahmin değerini deneysel olarak doğrulamak amacıyla, optimum koşullarda (genlik: % 100; süre: 45 dk; bitki/çözücü oranı: 1.06 g bitki/100 mL su) tatlı fesleğen yaprak örneklerinde ultrases destekli ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş, elde edilen ekstraktlarda ekstraksiyon verimi ve toplam fenolik madde konsantrasyonu belirlenmiştir. Ekstraksiyon verimi % 47.9 ve toplam fenolik madde miktarı 125.53 mg GAE/g bitki olarak bulunmuştur. Bu değerler yukarıda verilen model tahmin aralıkları içerisinde dir. Bu sonuçlara göre elde edilen modeller doğrulanmıştır.

4.3. Optimum Koşullarda Ekstrakte Edilen Tatlı fesleğen Su Ekstraktının Fenolik ve Uçucu Bileşiminin Belirlenmesi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile tatlı fesleğenin ultrases destekli sulu ekstraktının toplam fenolik madde bileşenlerine ilişkin değerler Çizelge 4.2' te verilmiştir.

Çizelge 4.2 incelendiğinde tatlı fesleğen ekstraktının fenolik bileşenlerinin büyük bir çoğunluğu rosmarinik asitten oluşurken onu sırası ile kafeik asit, rutin, gallik asit, kamferol, protokateşik asit ve şirincik asit takip etmiştir. Ancak ekstraktlarda kateşin, *p*-hidroksi benzoik asit, klorojenik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, benzoik asit, *o*-kumarik asit, hesperidin, eriodiktiol, sinamik asit, kuersetin, luteolin, apigenin bileşenleri tespit edilememiştir. Yapılan literatür

taramalarında bu çalışma sonuçları ile benzer şekilde Lee vd. (2009) tatlı fesleğen örneklerinde 1.86 mg/g rosmarinik asit, 1.18 mg/g kafeik asit ve 0.65 mg/g çikoric asit bulmuşlardır. Tatlı fesleğen ekstraktlarında Benedec vd. (2015) 3.59 mg/g rosmarinik asit tespit ederken, Złotek vd. (2016) 705.00 µg/g rosmarinik asit, 61.02 µg/g benzoik asit, 5.37 µg/g *p*-hidroksibenzoik asit, 5.25 µg/g *o*-kumarik asit 5.00 µg/g kafeik asit bileşenlerini içerdiğini saptamışlardır.

Çizelge 4.2. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının fenolik bileşenleri

Fenolik Bileşenler	Alıkonma Zamanı (dakika)	Konsantrasyon (mg/g ekstrakt)
Rosmarinik asit	62.0	32.20±0.29
Kafeik asit	19.1	4.20±0.05
Rutin	48.7	2.50±0.00
Gallik asit	5.4	1.20±0.00
Kamferol	77.0	0.30±0.00
Protokateşik asit	9.4	0.20±0.01
Şirincik asit	21.5	0.18±0.00
Kateşin	13.7	*
<i>p</i> -Hidroksi benzoik asit	14.8	*
Klorojenik asit	16.4	*
Epikateşin	20.8	*
<i>p</i> -Kumarik asit	26.4	*
Ferulik asit	30.7	*
Benzoik asit	37.8	*
<i>o</i> -Kumarik asit	43.7	*
Hesperidin	56.7	*
Eriodiktiol	63.9	*
Sinamik asit	69.0	*
Kuersetin	72.8	*
Luteolin	75.3	*
Apigenin	77.4	*

*: Tespit edilemedi.

Araştırma bulguları yapılan literatür taramaları ile karşılaştırıldığında; gelişmiş ekstraksiyon yöntemlerinden olan ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar beklenildiği gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen sonuçlardan daha yüksek bulunmuştur. Görülen farklılıkların ise kullanılan çözücü, yöntem farklılığı, bitkinin yetiştirme koşulları, olgunluk derecesi, iklim şartları, hasat koşulları vb. faktörlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Araştırmamızda tatlı fesleğen bitkisinden elde edilen ultrases destekli sulu ekstraktının Tepe Boşluğu – Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (HS-SPME) tekniği ve GC-MS ile uçucu bileşenleri belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının uçucu bileşenleri

Uçucu Yağlar	Alıkonma Zamanı (dakika)	Konsantrasyon (%)
<i>E</i> -sitral	21.49	44.28
<i>Z</i> -sitral	20.40	29.24
Limonen	12.35	4.78
Anetol	22.17	6.30
2-metil-2 feniltridekan	32.56	3.35
Simol	12.16	1.67
Nonanal	15.34	1.63
1,8-sineol	12.46	1.52
Delta-4-karen	24.28	1.06
Cis-sabinenehidrat	19.68	0.95
3-bütün-1-ol	19.75	0.94
Propenal dimetilhidrazon	18.72	0.92
n-dekanal	19.23	0.84
Cis-osimen	8.70	0.73

Çizelge incelendiğinde tatlı fesleğen su ekstraktının uçucu bileşenlerinin büyük çoğunluğunun *E*-sitral ve *Z*-sitral'den oluştuğu görülmektedir (Çizelge 4.4). Bu bileşeni sırası ile limonen, anetol, 2-metil-2-feniltridekan, karyofilen oksit, simol, nonanal, 1,8-sineol, delta-4-karen, cis-sabinenehidrat, 3-bütün-1-ol, propenal dimetilhidrazon, n-dekanal ve cis-osimen bileşenleri takip etmiştir. Çalışma sonuçları ile benzer şekilde Bayram ve Telci (2017) fesleğen genotiplerinden R10L nolu örnekte sitral bileşen miktarını % 39.0-71.3 olarak bulmuşlardır. Aynı zamanda, Türkiye'de sitralce ve linalolce zengin 2 adet reyhan genotipinin bulunduğunu ve linalol bakımından zengin kemotiplerde linalol oranını % 38-60, sitralce zengin kemotiplerde ise sitral oranını % 57-66 olarak rapor etmişlerdir (Telci, 2005; Telci vd., 2006).

4.4. Optimum Koşullarda Ekstrakte Edilen Tatlı fesleğen Su Ekstraktının Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

Tatlı fesleğen bitkisinden optimum koşullarda elde edilen su ekstraktlarının fonksiyonel özelliklerine ilişkin değerler Çizelge 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının fonksiyonel özelliklerine ilişkin değerler

Fonksiyonel özellikler	
Toplam Fenolik Madde (mg/g ekstrakt)	262.40
Serbest Radikal Yakalama Aktivitesi (IC ₅₀ =mg/mL)	0.14
Antidiyabetik Aktivite (IC ₅₀ =mg/mL)	2.30

Çizelgeye göre, toplam fenolik madde miktarı tatlı fesleğen su ekstraktında 262.40 mg/g olarak belirlenmiştir. Upadhyay vd. (2015) ve Juntachote vd. (2006) ultrases destekli ekstraksiyonu kullanarak farklı fesleğen çeşitlerinde toplam fenolik madde miktarını sırasıyla 9.41 mg GAE/g ve 4937.75 µg/g olarak tespit etmişlerdir. Farklı geleneksel ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda ise; tatlı fesleğen ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 146 mg/g (El-Beshbishy and Bahashwan, 2012) ve 38.48 mg GAE/g (Wongsa vd., 2012) olarak bulunmuştur. Bu çalışma sonuçları literatür bulguları ile karşılaştırıldığında; elde edilen verilerin literatürde hem ultrason hem de geleneksel yöntemlerle ekstrakte edilmiş fesleğen örneklerinden daha yüksek toplam fenolik madde miktarına sahip olduğu görülmektedir. Bu farklılıkların ekstraksiyonda kullanılan çözücü, ekstraksiyon yöntem ve parametreleri ile kullanılan bitki türü ve bitkinin ekolojik yetiştirilme şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Optimum koşullarda ekstrakte edilen örneklerin DPPH yöntemi kullanılarak serbest radikallerin % 50'sini inhibe eden miktarı IC₅₀=0.14 mg/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Yapılan kaynakça taramalarında benzer şekilde; El-Beshbishy ve Bahashwan (2012) tatlı fesleğen ekstraktlarının 20.0, 18.2, 16.3 ve 14.5 mg/mL konsantrasyonları için serbest radikalleri yakalama aktivitelerini (% DPPH) sırası ile % 60, % 54, % 49 ve % 43 olarak ve Cruz-Vega vd. (2009) ise 50 µg/mL konsantrasyon için serbest radikal yakalama aktivitesini (DPPH) % 55 olarak bulmuşlardır.

Tatlı fesleğen bitkisinden optimum koşullarda elde edilen su ekstraktlarının antidiyabetik aktivitesi belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. Bu amaçla belirli bir konsantrasyondaki sü krozu hidrolize eden sü kraz enzim aktivitesinin % 50'sini inhibe eden (IC₅₀) tatlı fesleğen ekstrakt konsantrasyonu 2.3 mg/mL olarak, pozitif kontrol için ise IC₅₀ değeri 32.82 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde tatlı fesleğen ekstraktının metforminden yaklaşık bir 10 kat daha yüksek antidiyabetik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Yapılan literatür taramalarında α-glukozidaz için inhibisyon aktivite değerlerini Ademiluyi vd. (2016) IC₅₀ 3.06 mg/mL ve El-Beshbishy ve Bahashwan (2012) IC₅₀ 36.72 mg/mL olarak bulurken, Wongs a vd. (2012) % 61 olarak tespit etmiştir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda fenolik madde bileşenlerinden; rozmarinik asit, *p*-hidroksi benzoik asit, kafeik asit, rutin, *p*-kumarik asit, luteolin, apigenin, prokateşik asidin ve uçucu yağ bileşenlerinden ise; 1,8 sineol ile limonenin antidiyabetik aktiviteye sahip oldukları rapor edilmiştir (Wongs a vd., 2012; Ademiluyi vd., 2016; Kirkan vd., 2018; Ngo vd., 2018; Ozer vd., 2018). Yapılan bu çalışmada toplam fenolik madde miktarı tatlı fesleğen yaprak ekstraktlarında 262.40 mg/g ekstrakt olarak bulunmuştur. Literatür çalışmalarında ise toplam fenolik madde miktarları (mg/g ekstrakt) sırasıyla 146 (El-Beshbishy and Bahashwan, 2012) ve 38.48 (Wongs a vd., 2012) olarak tespit edilmiştir. Elde edilen antidiyabetik aktivitenin bu çalışmada daha yüksek olması fenolik madde miktarının da yüksek olması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmada baskın uçucu yağ bileşeni E- sitral ve Z-sitral olarak saptanmış olup, ekstraktların IC₅₀ değeri 2.30 mg/mL bulunmuştur. Literatür taramalarında sitral kemotipli fesleğenlerde yapılmış antidiyabetik aktivite çalışmasına rastlanılmamıştır.

4.5. Optimum Koşullarda Ekstrakte Edilen Tatlı fesleğen Su Ekstraktının Enkapsülasyonu ve Fizikokimyasal Özellikleri

Optimum ekstraksiyon koşullarında tatlı fesleğen bitkisinden tekrar ultrases destekli su ekstraksiyonu yapılarak elde edilen ekstrakt aljinat ile homojenize edilip peristaltik pompa vasıtasıyla dağıtıcı faza (CaCl_2) damlatılarak hidrojel boncuklar elde edilmiştir (Şekil 4.3). Peristaltik pompa ile dakikada 95 adet hidrojel boncuk elde edilmiştir. Yirmi adet hidrojel boncuğun ortalama çapı 0.4 ± 0.00 mm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen fenolik ekstraktı yüklü hidrojel boncuklar

Hidrojel boncukların enkapsülasyon etkinliği % 80.12 ve enkapsüle örneklerin nem miktarı ise % 99.6 olarak bulunmuştur. Sonuçlarla benzer şekilde başka bir fesleğen türü olan kutsal fesleğen (*Ocimum sanctum* Linn.) uçucu yağ enkapsülasyon etkinliği % 44.65–100.09 aralığında belirlenmiştir (Sutaphanit ve Chitprasert, 2014).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tatlı fesleğen yapraklarından fenolikçe zengin ultrases destekli su ekstraksiyonu için deney parametrelerinin optimize edilmesi ve belirlenen bu şartlarda elde edilen ekstraktların ise polifenol içeriği ile biyofonksiyonel özelliklerinden antioksidan ve antidiyabetik aktivitelerinin belirlenip iyonik jelasyon-kitosan sistemiyle mikroenkapsülasyonun amaçlandığı bu tez çalışmasında elde edilen veriler aşağıda kısaca özetlenmiştir:

Çalışmada ilk olarak, yapraklardan ultrases destekli su ekstraksiyonu deneme deseni Box-Behnken deney tasarım metodu ve deney parametrenin optimizasyonu ise Yanıt Yüzey Metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon verimi ve tatlı fesleğen yapraklarının toplam fenolik madde sonuçları RSM’de yanıt olarak seçilmiştir. Çalışma sonucunda genlik, ekstraksiyon süresi ve bitki/çözgen oranı optimum değerleri sırasıyla; % 100, 45 dk, 1.06 g/100 mL olarak bulunmuştur. Model çalışılan yanıtlardaki farklılığı açıklamak için yüksek tahmin performansı göstermiştir ($R^2>0.98$). Ekstraksiyon verim miktarının; genlik ve süre, genlik ve bitki/çözücü oranı ve süre ile bitki/çözücü oranı artışına bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarında ise yüksek genlik değerlerinde süre ile bağlantılı olarak önce bir miktar artış, sonrasında sınırlı bir azalma görülmüştür. Bitki/çözücü oranı arttıkça toplam fenolik madde konsantrasyonunda azalış görülmüştür. Süre artışına bağlı olarak da toplam fenolik madde miktarında sürekli bir artış olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, metot doğrulaması yapılarak teorik ve deneysel veriler kıyaslandığında deneysel olarak elde edilen verilerin model tahmin aralığında olduğu saptanmıştır.

Çalışmada ikinci olarak, optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının fenolik ve uçucu bileşenleri belirlenmiş ve ekstraktın başlıca fenolik madde bileşeni olarak rosmarinik asit ve bu bileşeni takiben sırasıyla kafeik asit, rutin, gallik asit, kamferol, protokateşik asit ve şirincik asit tespit edilmiştir. Ekstrakt uçucu bileşenleri olarak ise sitral (E- ve Z-) başta olmak üzere sırasıyla limonen, anetol, 2-metil-2-feniltridekan, karyofilen oksit, simol,

nonanal, 1,8-sineol, delta-4-karen, cis-sabinenhidrat, 3-bütün-1-ol, propenal dimetilhidrazon, n-dekanal, cis-osimen bulunmuştur.

Üçüncü olarak, optimum koşullarda ekstrakte edilen tatlı fesleğen su ekstraktının toplam fenolik madde miktarı 262.4 mg/g ekstrakt ve fonksiyonel özelliklerinden serbest radikal yakalama aktivitesi ve antidiyabetik aktivite IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.14 mg/ml ve 2.30 mg/ml olarak saptanmıştır.

Son olarak ise tatlı fesleğen fenolik ekstraktı yüklü hidrojel boncuklarını fizikokimyasal özelliklerinden enkapsülasyon etkinliği (% EE) 80.12 ve nem miktarı % 99.6 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar neticesinde ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin, tatlı fesleğen bitkisinden kısa süreli ekstraksiyonla yüksek oranda antioksidan ve antidiyabetik bileşenlerce zengin fenolik maddelerin ekstraksiyonunda kullanılabileceği söylenebilir. Elde ettiğimiz bulgular ışığında bu çalışmaya ek olarak hayvan çalışması yapılabilir. Çalışmada toksik etki miktarı belirlenerek, tüketicilerin günlük tüketim miktarının saptanması ile, ticari olarak fonksiyonel bir enkapsüle bitki çayı üretilebilir. Ayrıca antioksidan ve antidibetik gıda takviyesi olarak kullanılması ile yeni bir kullanım alanının oluşabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Ademiluyi, A.O., Oyeleyes, S.I., Oboh, G., 2016. Biological activities, antioxidant properties and phytoconstituents of essential oil from sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Comparative Clinical Pathology*, 25(1), 169–76.
- Aguiar, J., Estevinho, B.N., Santos, L., 2016. Microencapsulation of natural antioxidants for food application a review. *Trends in Food Science and Technology*, 58, 21–39.
- Arslan, Ü., Karabulut, Ö.A., 2005. Baharat bitkilerinin bitki patojeni funguslara antifungal etkisi. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36(2), 131–35.
- Aslan, M.N., 2017. Balıkesir yöresinde doğal olarak yetişen biberiye ve fesleğen bitkilerine ait uçucu yağların antioksidan ve antimikotik özelliklerinin belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Tekirdağ Türkiye, 84 S.
- Azeredo, H.M.C., 2008. Encapsulação: aplicação a tecnologia de alimentos. *Alimentação e Nutrição*, 16(1), 89–97.
- Bayram, E., Telci, İ., 2017. Isparta ekolojik koşullarında bazı reyhan (*Ocimum basilicum* L.) genotiplerinin verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 12 (2), 100-109.
- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović R., Manojlović, V., Komes, D., Juranović, Cindrić, I. J., Nedović, V., Bugarski, B., 2011. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 44(4), 1094–1101.
- Benedec, D., Hanganu D., Oniga I., Tiperciuc B., Olah N. K., Raita, O., Bischin, C., Silaghi-Dumitrescu, R., Laurian, V., 2015. Assessment of rosmarinic acid content in six lamiaceae species extracts and their antioxidant and antimicrobial potential. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(6), 2297–2303.
- Caponio, F., Alloggio, V., Gomes, T., 1999. Phenolic compounds of virgin olive oil. Influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64(2), 203–9.
- Carro, M.D., Lanni, C., Magi, E., 2013. Determination of terpenoids in plant leaves by GC-MS: Development of the method and application to *Ocimum basilicum* and *Nicotiana glauca*. *Analytical Letters*, 46(4), 630–39.
- Chan, E. S., Yim, Z.H., Phan, S.H., Mansa R.H., Ravindra, P., 2010. Encapsulation of herbal aqueous extract through absorption with alginate hydrogel beads. *Food and Bioprocess Technology*, 88(2–3), 195–201.

- Champagne, C.P., Fustier P., 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184–90.
- Cavuldak, Ö.A., Vural N., Anlı R.E., 2016. Ultrasound assisted extraction of plant-derived phenolic compounds. *Journal of Food*, 41, 53-60.
- Chiang, L. C., Cheng P.W., Chiang W., Lin C.C., 2005. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32(10), 811–16.
- Cruz-Vega, D., Verge-Star, M., Salinas-Gonzales, N., 2009. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. family lamiaceae) assayed by different methodologies. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 22(4), 557–59.
- Çelebi, Ç., 2010. Fesleğenin (*Ocimum basilicum*) fenolik madde dağılımı ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Ankara Türkiye, 54 S.
- Çoruhli, T., 2013. Kara dut antosiyaninlerinin iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonu ve enkapsülasyon parametrelerinin tepki yüzey metodu ile optimize edilmesi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Türkiye, 99 S.
- Daneshian, A., M., Shayegh, J., Mikaili, P., Saharaf, J D., 2011. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(15), 3453–56.
- Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Garofulić, I.E., Bosiljkov, T., Ježek, D., Brnčić, M., 2015. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 29(3), 475–84.
- Dev, N., Das, A.K., Hossain, M. A., Rahman, S. M. M., 2011. Chemical compositions of different extracts of *Ocimum basilicum* leaves. *Journal of Scientific Research*, 3(1), 197-206.
- Díaz-Maroto, M. C., Paloma, E. S., Castro, L., Gonzales-Vinas, M. L., Perrez-Cello, M., S., 2004. Changes produced in the aroma compounds and structural integrity of basil (*Ocimum basilicum* L.) during drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(15), 2070–76.

- Dorman, H.J.D., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen M.J., 2003. Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected lamiaceae herbs. *Food Chemistry*, 83(2), 255–62.
- El-Beshbishy, H.A., Bahashwan, S.A., 2012. Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: an in vitro study. *Toxicology and Industrial Health*, 28(1), 42–50.
- Ezeani, C., Ezenyi, I., Okoye, T., Okoli, C., 2017. *Ocimum basilicum* extract exhibits antidiabetic effects via inhibition of hepatic glucose mobilization and carbohydrate metabolizing enzymes. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(1), 22-28.
- Eskilsson, C.S., Björklund, E., 2000. Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227–50.
- Fang, Z., Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(10), 510–23.
- Fufa, H. Baenziger, P.S., Beecher, B.S., Graybosch, R.A., Dweikat, I., Eskridge, K.M., 2005. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica*, 145(1–2), 133–46.
- Falleh, H., Ksouri, R., Lucchessi, M., Magné, C., 2012. Ultrasound-assisted extraction: Effect of extraction time and solvent power on the levels of polyphenols and antioxidant activity of *Mesembryanthemum edule* L. aizoaceae shoots. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 243–49.
- Garcia, L.C., Tonon, R.V., Hubinger, M.D., 2012. Effect of homogenization pressure and oil load on the emulsion properties and the oil retention of microencapsulated basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.). *Drying Technology*, 30(13), 1413–21.
- Gazori, T., Khoshayand, M.R., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani, A., Harririan, I., 2009. Evaluation of alginate/chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: Formulation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 599–606.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R., 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–21.
- Gray, R., I., 1975. Human intestinal sucrase-maltase. Identification of free sucrase and isomaltase and cleavage of the hybrid into active distinct subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 250, 5735-5741.

- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.H.T., Przybylski, R., 2017. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 20(6), 1557-1569.
- Ismail, M., 2006. Central properties and chemical composition of *Ocimum basilicum* essential oil. *Pharmaceutical Biology*, 44(8), 619-26.
- Izadiyan, P., Hemmateenejad, B., 2016. Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design. *Food Chemistry*, 190(2016), 864-70.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., Bhandari, B., 2008. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26(7), 816-35.
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H.P., Vivanco, J.M., 2002. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5878-83.
- Jayasinghe, C., Goto, N., Aoki, T., Wada, S., 2003. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4442-49.
- Juntachote, T., Berghofer, E., Bauer, F., Siebenhandl, S., 2006. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(2), 121-33.
- Jyothi, N.V.N., Prasanna, P.M., Sakarlar, S.N., Prabha, K.S., Ramaiah, P.S., Sarawan, G.Y., 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of Microencapsulation*, 27(3), 187-97.
- Kailasapathy, K., 2009. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4(033),1-19.
- Karık, Ü., Çiçek, F., Oğur, E., Çınar, O., Birol, D., 2014. Menemen ekolojik koşullarında bazı ticari ve yerel fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) çeşitlerinin morfolojik, verim ve kalite özelliklerinin belirlenilmesi. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24 (2), 10 - 20

- Kaya, I., Yigit, N., Benli, M., 2008. Antimicrobial activity of various extracts of *Ocimum basilicum* L. and observation of the inhibition effect on bacterial cells by use of scanning electron microscopy. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: African Networks on Ethnomedicines*, 5(4), 363–69.
- Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Ozer, M.S., Cengiz, M., Atilgan, G., Ceylan, O., Tepe, B., 2018. Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory potential of *Onosma tauricum* var. *tauricum*. *Industrial Crops and Products*, 125(9), 549–55.
- Koç, M., Sakin, M., Kaymak E.F., 2010. Mikroenkapsülasyon ve gıda teknolojisinde kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 77–86.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H., 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
- Kurozawa, L. E., Hubinger, M.D., 2017. Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. *Current Opinion in Food Science*, 15, 50–55.
- Kwee, E.M., Niemeyer, E.D., 2011. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, 128(4), 1044–50.
- Klimankova, E., Holadova, V., Hajslova, J., Cajka, T., Poustka, J., Kaudela, M., 2008. Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food Chemistry*, 107(2008), 464–72.
- Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M., Sala, F., 2004. Morphological characterization, essential oil composition and DNA genotyping of *Ocimum basilicum* L. cultivars morphological characterization. *Plant Science*, 167(2004), 725–731.
- Laohasongkram, K., Mahamaktudsanee, T., Chaiwanichsiri, S., 2011. Microencapsulation of macadamia oil by spray drying. *Procedia Food Science*, 1, 1660–65.
- Lee, E. A., 1998. A method for assaying intestinal brush-border sucrase in an intact intestinal preparation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2111–2116.
- Lee, S.J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K.G., 2005. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and *Thyme* leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 91(1), 131–37.

- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., Cheng, S., 2017. Food chemistry evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96(2006), 254-260.
- Meyers, R.H., Montgomery, D.C., 1995. Response surface methodology; process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA.
- Ngo, Y.L., Lau, C.H., Chua, L.S., 2018. Review on rosmarinic acid extraction, fractionation and its anti-diabetic potential. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 687-700.
- Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M.T., Khutoryanskiy, V.V., Charalampopoulos, D., 2012. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydrate Polymers*, 90(3), 1281-87.
- Nurzyńska-Wierdak, R., Borowski, B., Dzida, K., 2013. Essential oil composition of sweet basil cultivars as affected by nitrogen and potassium fertilization. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 427-36.
- Najafi-Soulari, S., Shekarchizadeh, H., Kadivar, M., 2016. Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 27(16), 1631-44.
- Opalchenova, G., Obreshkova, D., 2003. Comparative studies on the activity of basil against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological Methods*, 54(1), 105-10.
- Ozer, M.S., Kirkan, B., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Ceylan, O., Atilgan, N., Tepe, B., 2018. *Onosma heterophyllum*: Phenolic composition, enzyme inhibitory and antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 111, 179-84.
- Özek, T., Beis, S.H., Demirçakmak, B., ve Başer, K.H.C., 1995. Composition of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. cultivated in Turkey. *Journal of Essential Oil Research*, 7(2), 203-5.
- Radojkovic, M., Zekovic, Z., Jokic, S., Vidovic, S., Lepovic, Z., Milosevic, S., 2012. Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. *Food Technology, Biotechnology and Pharmaceutical Engineering*, 50(2), 167-176.
- Rathore, S., Desai, P.M., Liew, C.V., Chan, L.W., Heng, P.W.S., 2013. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369-81.

- Shafique, M., Khan, S.J., Khan, N.H., 2011. Study of antioxidant and antimicrobial activity of sweet basil (*Ocimum basilicum*) essential oil. *Pharmacologyonline*, 111, 105–11.
- Soysal, Ö., Soysal, Y., 2016 Tıbbi ve Aromatik bitkilerde ekstraksiyon yöntemleri. *Tarımsal Mekanizasyon 18. Ulusal Kongresi*, 20-24 Temmuz, Tekirdağ, 731–45.
- Saha, S., Sengupta, C., Ghosh, P., 2014. Molecular and phytochemical analyses to assess genetic stability in alginate-encapsulated micro shoots of *Ocimum gratissimum* L. following in vitro torage. *Nucleus (India)*, 57(1), 33–43.
- Sartoratto, A., Machado, L.M., Delarmelina, C., Figueira, G.M., Duarte, M.C.T., Rehder, V.L.G., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4), 275–80.
- Shi, P., He, P., Teh, T.K.H., Morsi, Y.S., Goh, J.C.H., 2011. Parametric analysis of shape changes of alginate beads. *Powder Technology*, 210(1), 60–66.
- Simon, J.E., Morales, M.R., Phippen, W.B., Vieira, R.F., Hao, Z., 1999. Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb. *Perspectives on New Crops and New Uses*. (16), 499–505.
- Stojanovic, R., Belcak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., Burgaski, B., 2012. Encapsulation of *Thyme* (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 685–96.
- Sutaphanit, P., Chitprasert, P., 2014. Optimisation of microencapsulation of holy basil essential oil in gelatin by response surface methodology. *Food Chemistry*, 150, 313–20.
- Telci, İ., 2005. Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) genotiplerinde uygun biçim yüksekliklerinin belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 22(2), 77-83.
- Telci, İ., Bayram, E., Yılmaz, G., Avci, B., 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 489-497.
- Tohti, I., Tursun, M., Umar, A., Turdi, S., Imin, H., Moore, N., 2006. Aqueous extracts of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) decrease platelet aggregation induced by ADP and thrombin in vitro and rats arterio-venous shunt thrombosis in vivo. *Thrombosis Research*, 118(6), 733–39.
- Upadhyay, R., Nachiappan, G., Mishra, H.N., 2015. Ultrasound-assisted extraction of flavonoids and phenolic compounds from *Ocimum tenuiflorum* leaves. *Food Science and Biotechnology*, 24(6), 1951–58.

- Vieira, R.F., Simon, J.E., 2000. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. *Economic Botany*, 54(2), 207–16.
- Wan, H.B., Wong, M.K., 1996. Minimization of solvent consumption in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 754(1–2), 43–47.
- Wongsa, P., Chaiwarit, J., Zamaludien, A., 2012. In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*, 131(3), 964–71.
- Yang, Y., Zhang, F., 2008. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(4), 308–13.
- Zhang, Q., Zhou, M.M., Chen, P.L., Cao, Y.Y., Tan, X.L., 2011. Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis for the extraction of luteolin and apigenin from celery. *Journal of Food Science*, 76(5), 680–85.
- Złotek, U., Szymanowska, U., Karaś, M., Świeca, M., 2016. Antioxidative and anti-inflammatory potential of phenolics from purple basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves induced by jasmonic, arachidonic and β -aminobutyric acid elicitation. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 163–70.
- Zuidam, N.J., Nedović, V.A., 2010. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. New York: Springer, 25,169-176.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ceylan DEMİRCAN

Doğum Yeri ve Yılı : Manisa, 1994

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ceylandemircan45@gmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Didim Anadolu Lisesi, 2013

Lisans : SDÜ, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği, 2017

Mesleki Deneyim

Uğurlu Balık 2014-2016