

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



MENENGİÇ TOHUMUNDAN (*Pistachia terebinthus*)
BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN BASINÇLI SICAK SU
İLE EKSTRAKSİYONU

Sude AY

Yüksek Lisans Tezi
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI

OCAK-2019

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MENENGİÇ TOHUMUNDAN (*Pistachia terebinthus*) BİYOAKTİF
BİLEŞENLERİN BASINÇLI SICAK SU İLE EKSTRAKSİYONU**

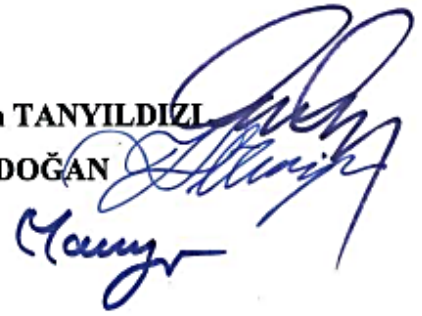
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sude AY
(162132103)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 12.12.2018

Tezin Savunulduğu Tarih: 04.01.2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI
Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN
Doç. Dr. Yavuz DEMİRCİ



OCAK - 2019

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca engin bilgi, tecrübe ve yol göstericiliğiyle daima yanımda olan, desteğini ve anlayışını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Muhammet Şaban TANYILDIZI'na sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Ekstraksiyon sisteminin tasarımı konusunda engin bilgi ve tecrübeleriyle çalışmamı şekillendiren sayın hocam Prof. Dr. Hamdi Soner ALTUNDOĞAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarım boyunca, bilimsel destek ve önerilerinden yararlandığım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Veyis SELEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen ve zamanını harcayan değerli hocam Arş. Gör. Kübra ŞİŞLIOĞLU'na göstermiş olduğu ilgiden dolayı teşekkür ederim.

İçtenlikleri sayesinde enerjisi yüksek bir laboratuvar ortamı oluşturan sevgili arkadaşlarım Esengül ŞAHUTOĞLU'na ve Sultan ÇELİK'e teşekkür ederim.

Her konuda bana destek olan ve her daim yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Sude AY
ELAZIĞ – 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	3
2.2. Anti oksidanlar	5
2.3. Biyoaktif Bileşiklerinin Eldesinde Kullanılan Modern Ekstraksiyon Yöntemleri	11
2.4. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu	16
2.4.1. Basınçlı Sıcak Suyun Özellikleri.....	16
2.4.2. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonunun Prensipleri.....	17
2.4.3. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonunu Etkileyen Parametreler	18
2.4.4. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonunun Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması ...	22
2.4.5. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu Uygulamaları	23
2.5. Önceki Çalışmalar	24
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Menengiç Tohumu	31
3.2. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu	31
3.2.1. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonunun Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım.....	32
3.3. Kompozisyon Analizleri.....	33
3.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	34
3.3.2. Toplam Flavanoid Miktarı Tayini	34
3.4. Antioksidan Aktivite Tayini	35
3.4.1. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini	35

4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	36
4.1.	Deneysel Tasarım Sonuçları.....	36
4.2.	Kompozisyon Analizleri.....	37
4.2.1.	Toplam Fenolik Madde Miktarı	37
4.2.2.	Toplam Flavonoid Miktarı	42
4.3.	Antioksidan Aktivite Tayini.....	46
4.3.1.	DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki.....	46
4.4.	Model Optimizasyonu ve Doğrulama Sonuçları	50
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	51
	KAYNAKLAR.....	53
	EKLER.....	59
	ÖZGEÇMİŞ.....	60

ÖZET

Bu çalışmada, basınçlı sıcak su ekstraksiyon sistemi tasarlanarak menengiç ekstraktlarının içeriğindeki biyoaktif bileşikler araştırılmıştır. Biyoaktif özellikteki ekstraktların elde edileceği ekstraksiyon şartları, cevap yüzey yöntemi (CYY) ve merkezi kompozit dizayn (MKD) tekniği kullanılarak optimize edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı için optimum şartlar, 17,37 mg gallik asit/ml ekstrakt konsantrasyonu, 100 °C sıcaklık, 3 ml/dk akış hızı ve %10 katı sıvı oranı olarak belirlenmiş olup bu şartlarda elde edilen maksimum gallik asit konsantrasyonu 15,297 mg gallik asit/ml'dir. Toplam flavonoid madde miktarı için optimum şartlar, 73,07 µg kuersetin/ml ekstrakt konsantrasyonu, 193 °C sıcaklık, 3 ml/dk akış hızı ve % 6,21 katı sıvı oranı olarak belirlenmiş olup bu şartlarda elde edilen maksimum kuersetin konsantrasyonu 78,803 µg kuersetin/ml'dir. DPPH radikal süpürücü etki tayini için ise optimum şartlar, 100,29 µmol troloks/ml ekstrakt konsantrasyonu, 150 °C sıcaklık, 2,52 ml/dk akış hızı ve %8,53 katı sıvı oranı olarak belirlenmiş olup bu şartlarda elde edilen maksimum troloks konsantrasyonu 97,559 µmol trolox/ml'dir. Model ifadelerin optimizasyonu sonucunda elde edilen noktalarda doğrulama deneyleri de gerçekleştirilmiştir. Modelin önerdiği sonuçlar ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum %87 ile %97 arasında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Menengiç, *Pistacia terebinthus L.*, Basınçlı Sıcak Su, Biyoaktif Bileşik, Antioksidan, Cevap Yüzey Yöntemi

ABSTRACT

Pressurized Hot Water Extraction of Bioactive Compounds from Menengic Seed

In this study, the pressurized hot water extraction system was designed and bioactive compounds in the contents of the extracts of the menengic were investigated. The experimental conditions have been optimized for extracting bioactive properties by using Response Surface Methodology (RSM) and Central Composite Design (CCD) technique. The optimum conditions for the total amount of phenolics were determined as 17.37 mg gallic acid / ml extract concentration, 100 °C temperature, 3 ml / min flow rate and 10% solid liquid ratio and the maximum gallic acid concentration was obtained as 15.297 mg gallic acid/ml under this conditions. The optimum conditions for the total amount of flavonoids were determined as 73,07 µg quercetin/ml extract concentration, 193 °C temperature, 3 ml / min flow rate and 6,21% solid liquid ratio and the maximum quercetin concentration was obtained as 78,803 µg quercetin/ml under this conditions. The optimum conditions for the DPPH radical scavenging effect determination were determined as 100,29 µmol trolox/ml extract concentration, 150 °C temperature, 2,52 ml / min flow rate and 8,53% solid liquid ratio and the maximum trolox concentration was obtained as 97,559 µmol trolox/ml under this conditions. Verification experiments were also carried out at the points obtained as a result of optimization of model expressions. The concordance between the results of the model and the experimental results was between 87% and 97%.

Key Words: Menengic, *Pistacia terebinthus L.*, Pressurized Hot Water, Bioactive Compound, Antioxidant, Response Surface Methodology

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Antioksidanların sınıflandırılması.....	7
Şekil 2.2. UDE Kurulumunun Şematik Gösterimi	14
Şekil 2.3. Sıcaklığın ve basıncın bir fonksiyonu olarak suyun faz diyagramı	16
Şekil 2.4. Sıcaklığın bir fonksiyonu olarak suyun dielektrik sabiti	18
Şekil 2.5. BSE'nin 1990-2014 yılları arasında farklı bilim dallarındaki uygulamaları	24
Şekil 3.1. Menengiç tohumu (<i>Pistacia terebinthus</i> L.)	31
Şekil 3.2. Deneysel çalışma için tasarlanan BSE sistemi.....	32
Şekil 4.1. Menengiç ekstraktının toplam fenolik madde analizi	38
Şekil 4.2. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu toplam feneolik madde deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum	40
Şekil 4.3. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Toplam Fenolik Madde Miktarı deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) Sıcaklık-Akış hızı, (b) Sıcaklık-Katı sıvı oranı, (c) Katı sıvı oranı-Akış hızı.	42
Şekil 4.4. Menengiç ekstraktının toplam flavonoid madde analizi	42
Şekil 4.5. Menengiç tohumundan BSE ile toplam flavonoid madde miktarı deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum	43
Şekil 4.6. Menengiç tohumundan BSE ile toplam flavonoid madde miktarı deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) Sıcaklık-Akış hızı, (b) Katı sıvı oranı-Akış hızı.....	45
Şekil 4.7. Menengiç ekstraktının DPPH ile reaksiyonu	46
Şekil 4.8. Menengiç tohumundan elde edilen ekstraktın antioksidan aktivite (DPPH) deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum	47
Şekil 4.9. Menengiç tohumundan elde edilen ekstraktın antioksidan aktivite (DPPH) deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) Katı sıvı oranı-Akış hızı.	49
Şekil 4.10. Menengiç tohumundan elde edilen ekstraktın antioksidan aktivite (DPPH) deneylerinin ekstraksiyon sıcaklığı için tek faktör grafiği.....	49

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1. Oksidatif strese neden olan reaktif türler.....	5
Tablo 2.2. Yaygın olarak kullanılan doğal ve sentetik antioksidanların kimyasal yapıları ..	8
Tablo 2.3. Ekstraksiyon tekniklerinin karşılaştırması.....	15
Tablo 2.4. Suyun Özellikleri	17
Tablo 3.1. Basıncılı Sıcak Su Ekstraksiyonu için Belirlenen Değişkenler ve MKD ile İncelenen Değer Aralıkları	33
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan Menengiç Tohumunun Kompozisyon Analizleri ve Antioksidan Aktivite Sonuçları	37
Tablo 4.2. Menengiç Tohumundan Basıncılı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Fenolik Bileşiklerin Eldesi için Önerilen İkinci Derece Modele ait İstatistikler	39
Tablo 4.3. Menengiç Tohumundan Basıncılı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Fenolik Bileşiklerin Eldesi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları.....	39
Tablo 4.4. Menengiç Tohumundan Basıncılı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Flavonoidlerin Eldesi için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler	44
Tablo 4.5. Menengiç Tohumundan Basıncılı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Flavonoidlerin Eldesi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları.....	44
Tablo 4.6. Menengiç Tohumundan Basıncılı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Antioksidan Aktivite için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler	47
Tablo 4.7. Menengiç Tohumundan Basıncılı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Antioksidan Aktivite için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları.....	48
Tablo 4.8. Deneysel Tasarım Doğrulama Sonuçları.....	50

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
BHA	: Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	: Bütillenmiş Hidroksi Toluen
BSE	: Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu
CYY	: Cevap Yüzey Yöntemi
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
FCR	: Folin Ciocalteu reaktifi
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
MDE	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
MKD	: Merkezi Kompozit Dizayn
PG	: Propil Gallat
RAT	: Reaktif Azot Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SAE	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
TBHQ	: Tersiyer Bütillenmiş Hidroksi Kinon
UDE	: Ultrason Destekli Ekstraksiyon

1. GİRİŞ

Biyoaktif bileşikler kişiye istenilen sağlık ve zindeliği sağlayabilen hayvansal ve bitkisel ürünlerde veya deniz ürünlerinde doğal olarak bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşikler, karbonhidrat, protein, yağ gibi birincil metabolitler olarak bilinen, canlının büyüme ve gelişmesi için olmazsa olmaz ana besin kaynakları değildir. Ancak canlının hayatta kalması ve zorlu yaşam koşullarına olan direncini arttırması için gerekli sekonder metabolitlerdir [1].

Biyoaktif bileşikler insan ve hayvan hastalıklarına karşı terapötik aktiviteye, hastalıklara neden olan etkenlere karşı toksik aktiviteye ve tarımsal üretimde kayıplara neden olan böceklerle karşı önleyici etkiye sahip olabilmektedir. Biyoaktif bileşenler, yüzlerce yıldır hastalıklar ile mücadelede kullanılmaktadır ve günümüzde kullanılan ilaçların yarısından fazlasının etken maddesini oluşturmaktadır [2].

Bitkiler doğal biyoaktif bileşikler için neredeyse tükenmez bir kaynak sağlar. Bitkisel kaynaklı çeşitli biyoaktif bileşiklerin sağlık üzerine olumlu etkilerinin yapılan çalışmalarla ortaya konulması ile birlikte biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu önemli bir endüstriyel işlem haline gelmiştir. Gıdalardaki biyoaktif bileşiklerin gıda desteği olarak kullanımına olan toplumsal ilginin artması, fonksiyonel ürün üretimini ve buna bağlı olarak da yasal düzenlemeleri arttırmıştır. Bu nedenle ekstraksiyon metotlarında toksik organik solventlerin kullanılmadığı daha sağlıklı alternatif yöntemler ile ilgili araştırmalar başlamıştır. Bu amaçla geliştirilen yöntemlerden biri de basınçlı sıcak su ekstraksiyonu işlemidir. Bu işlemin diğer konvansiyonel tekniklere kıyasla daha kısa ekstraksiyon süresi, daha yüksek kaliteli ekstrakt ve daha düşük maliyet gibi avantajları söz konusudur. Ayrıca basınçlı sıcak su ekstraksiyonu çevre dostu bir teknik olarak tanımlanmaktadır [3].

Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu, tüm ekstraksiyon işlemi boyunca sıvı fazı korumak için yeterli olan yüksek basınç ve sıcaklıktaki (kaynama noktasından yüksek ve kritik nokta sıcaklığından düşük) suyun kullanımına dayanan gelişmiş bir ekstraksiyon tekniğidir [4]. Ekstraksiyon işlemi sırasında uygulanan sıcaklık, ekstraksiyon verimliliği ve seçiciliği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Basınçlı sıcak su ekstraksiyonu işleminde kullanılan sıcaklığa bağlı olarak çeşitli polaritedeki bileşikler elde etmek mümkün olup daha düşük sıcaklıklarda polaritesi yüksek bileşikler, daha yüksek sıcaklıklarda ise polaritesi düşük bileşikler elde edilmektedir. Bu teknik ile biyoaktif bileşikler, hassas oldukları atmosfer ve

ışık şartlarından korunarak ekstrakte edilebilmektedir. *Pistacia terebinthus* L. (*Anacardiaceae*), Akdeniz bölgesinde ve Asya'da birçok biyolojik faaliyete sahip olan *Pistacia* türlerinden biridir. *Pistacia* türleri, özellikle flavonoidler ve diğer fenolik bileşenlere bağlı olarak, antimikrobiyal, antifungal, anti-inflamatuvar ve sitotoksik aktivitelerinin yanı sıra yüksek antioksidan potansiyellerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmektedir [5].

Bu çalışmada Menengiç (*Pistachia Terebinthus* L.) tohumunun içeriğindeki fenolik bileşikler özel olarak tasarlanan basınçlı sıcak su ekstraksiyonu sistemiyle ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyon parametrelerinin (sıcaklık, basınç, akış hızı ve katı/sıvı oranı) ekstrakt verimi, fenolik bileşen miktarı ve antioksidan aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Cevap yüzey metodu ile etkili parametrelerin optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller, dış yörüngesinde bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip olan reaktif kimyasal moleküllerdir. Proteinler, lipidler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi kompleks moleküller ile reaksiyona girerek enerji oluşturan kararsız konfigürasyonlardır. Biyolojik sistemlere zarar veren serbest radikallerin çoğu oksijen içermeyen radikallerdir ve bunlar “reaktif oksijen türleri” (ROT) olarak bilinirler [6].

Reaktif oksijen türleri, aerobik organizmaların hücrelerinde oluşan yan ürünlerdir ve otokatalitik reaksiyonları başlatabilirler. Reaksiyona girecekleri molekülleri, hata zincirini yaymak için serbest radikallere dönüştürülürler.

Reaktif oksijen türleri (ROT);

- (i) UV ışınlaması, X-ışınları ve gama ışınları sırasında oluşur.
- (ii) Metal katalizli reaksiyonlar sırasında üretilir
- (iii) İflamasyon sırasında nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretilir
- (iv) Mitokondriyal katalizli elektron taşıma reaksiyonları ve çeşitli mekanizmaların yan ürünleridirler [7].

Serbest radikallerin oluşum miktarı birçok faktörün dengesiyle belirlenir. ROT hem endojen hem de eksojen olarak üretilir. ROT'un endojen kaynakları mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, peroksizomlar ve inflamatuvar hücre aktivasyonudur. Hidrojen peroksit, her ne kadar radikal bir tür olmasa da, reaktif oksijen türü olan öncü süperoksit gibi mitokondride üretilir. Mitokondri, serbest radikal jenerasyonunun ana bölgesi olduğundan, ROT kaynaklı stresi en aza indirmek için membranlarının her iki tarafında çeşitli antioksidanlar bulunur. Aynı zamanda hipoksantin, ksantin ile ürik aside tepkimesini katalize eden ksantin oksidaz enzimi gibi mevcut diğer süperoksit radikal kaynakları da vardır. Her iki adımda, moleküler oksijen azalır, süperoksit anyonunu oluşturur ve bunu takiben hidrojen peroksidin oluşumu izlenir [8].

Hücrel ROT'un diğer endojen kaynakları, nötrofiller, esinofiller ve makrofajlardır. Aktivasyon sırasında, makrofajlar, süperoksit anyonu, nitrik oksit ve hidrojen peroksit dâhil olmak üzere çeşitli ROT'lara yol açan oksijen alımında artış başlatırlar. Ek olarak

mikrozomlar ve peroksizomlar da ROT kaynaklarıdır. Mikrozomların hiperoksi bölgeleri in vivo olarak üretilen hidrojen peroksidin birçoğundan sorumludur [9]. ROT ayrıca ksenobiyotikler, klorlu bileşikler, çevresel maddeler, metaller (redoks ve nonredoks), iyonlar ve radyasyon gibi eksojen kaynaklar tarafından da üretilebilir [10].

Hücrelerdeki serbest radikallerin oluşumu, redoks-aktif metallerin varlığıyla yakından ilişkilidir. Bu, kendi içinde büyük ölçüde demir (kısmen bakır) redoks çiftine bağlıdır ve fizyolojik sınırlar içinde korunur. Oksijen kaynaklı diğer radikaller yüksek enerjili türler olan peroksi radikalleridir ve biyolojik çeşitliliklerini hücrel aktivitelere gösterirler. Bunlar, hastalık ve toksikolojide peroksil radikalının tutulumunu için lipid peroksidasyonunu indüklediğinin kanıtıdır [11].

ROT'un çevreye bağlı olarak biyolojik sistemlerde hem zararlı hem de faydalı olabileceği tespit edilmiştir. ROT'un olumlu etkileri, enfeksiyöz ajanlara karşı savunma gibi hücrel tepkilerde ve bir dizi hücrel sinyalizasyon sisteminin işlevindeki fizyolojik rolleri içerir. Buna karşılık, yüksek konsantrasyonlarda ROT, lipidler, membranlar, proteinler ve nükleik asitler dahil olmak üzere hücre yapılarına zarar verebilir. Bu hasar “oksidatif stres” olarak adlandırılır [12]. ROT'un zararlı etkileri, vücutta bulunan enzimler olan bazı antioksidanların etkisiyle dengelenir (23). ROT'un oksidatif hasarına karşı hücrenin antioksidan savunma sisteminin varlığına rağmen, oksidatif hasar yaşam döngüsü boyunca birikmekte ve kardiyovasküler hastalık, kanser, nörodejeneratif bozukluklar ve diğer kronik durumlar gibi hastalıklar ile ilişkilendirilmektedir [13]. Tablo 2.1’de oksidatif strese neden olan reaktif türler verilmiştir.

Tablo 2.1. Oksidatif strese neden olan reaktif türler [14]

Reaktif türleri	Sembolü	Reaktivite / Açıklamalar
Reaktif oksijen türleri:		
Süperoksit	$O_2^{\bullet-}$	Kardiyovasküler ve diğer sistemlerde mitokondri içerisinde oluşturulur.
Hidroksil radikali	$\bullet OH$	Son derecede reaktif olan, demirin vücuda aşırı yüklenmesi sırasında oluşur.
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Vücudumuzda çok sayıda reaksiyonla oluşur ve $\bullet OH$ gibi güçlü türler verir
Peroksil radikali	$ROO^{\bullet}$	Lipitler, proteinler, DNA, şekerler vb. moleküllerin reaktif ve oksidatif hasar sırasında oluşur.
Organik hidroperoksit	$ROOH$	Geçici metal iyonlarıyla reaksiyona girerek reaktif türler oluşturur.
Singlet oksijen	1O_2	Aşırı derecede reaktiftir, ışığa duyarlılaşma ve kimyasal reaksiyonlar sırasında oluşur.
Ozon	O_3	Mevcut bir atmosferik kirletici olarak, 1O_2 oluşturan çeşitli moleküller ile reaksiyona girebilir
Reaktif azot türleri:		
Nitrik oksit	$NO^{\bullet}$	Nörotransmitter ve kan basıncı regülatörünün, patolojik durumları sırasında güçlü oksidanlar oluşturabilir.
Peroksinitrit	$ONOO^-$	$NO^{\bullet}$ ve süperoksit'ten oluşur, oldukça reaktiftir.
Peroksinitroz asit	$ONOOH$	$ONOO^-$ 'nin proton formudur.
Azot dioksit	NO_2	Atmosferik kirlilikle oluşur.

2.2. Antioksidanlar

Serbest radikalleri hücrelere saldırmadan önce stabilize veya deaktive edebilen moleküller "antioksidan" olarak adlandırılır. İnsan vücudunda hücreleri ve organ

sistemlerini serbest radikal hasarına karşı korumak için sinerjik olarak çalışan kompleks antioksidan sistemleri (enzimik ve nonenzimik) birbirleriyle kombinasyon halinde bulunmaktadır. Antioksidan aktivite, canlı sistemlerde önemli ve temel bir fonksiyondur. Anti-mutajenik, antikarsinojenik ve yaşlanma karşıtı tepkiler gibi diğer birçok biyolojik fonksiyon bu özellikten kaynaklanmaktadır. Antioksidanlardan oluşan radikaller, stabil ürünler oluşturmak için diğer radikallerle reaksiyona girerek nötrleştirilir veya diğer antioksidanlar tarafından geri dönüştürülür [15].

2.2.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, oksitleyici zincir reaksiyonlarının yayılmasını sınırlandırarak diğer moleküllerin oksidasyonunu inhibe eder veya geciktirir. Kaynaklarına göre doğal ve sentetik olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Şekil 2.1’de antioksidanların sınıflandırılması verilmiştir. Doğal antioksidanlar fenolik bileşikler (tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler), azot bileşikleri (alkaloitler, klorofil türevleri, amino asitler ve aminler), karotenoidler veya askorbik asittir. Sentetik antioksidanlar, çeşitli derecelerde alkil gruplarına sahip fenolik yapılardır [15]. Doğal ve sentetik antioksidanların kimyasal yapısı Tablo 2.2’de listelenmiştir.

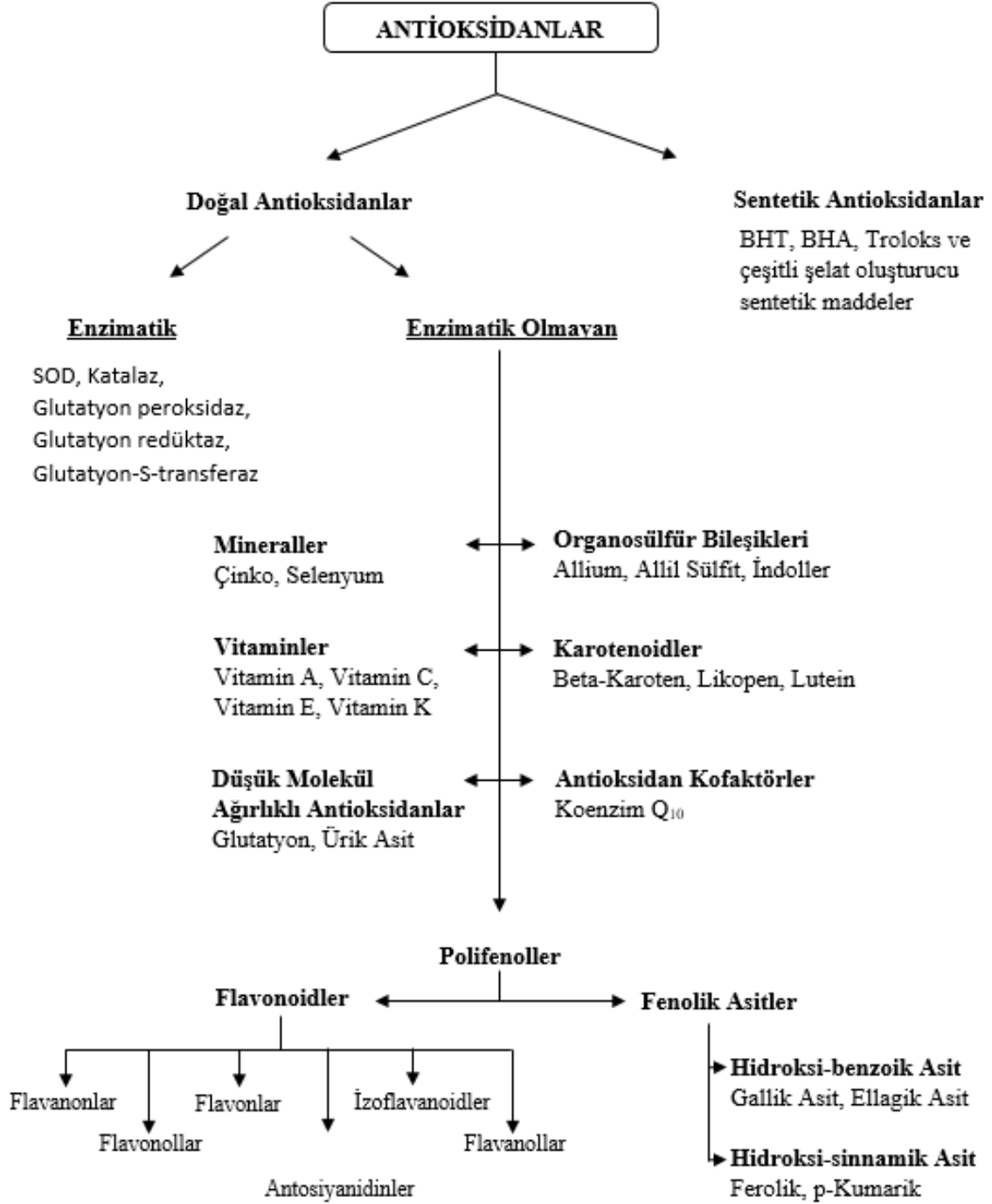
2.2.1.1. Sentetik Antioksidanlar

Bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksitolüen (BHT) gibi sentetik antioksidanlar, bu yüzyılın başından beri en sık kullanılan antioksidanlar olmuştur. Genellikle yiyecekleri korumak için kullanılırlar [16].

Her ne kadar BHA, BHT ve propil gallat gibi sentetik antioksidanlar gıda maddelerine lipid oksidasyonunu önlemek için eklense de, tüketicilerin uzun süredir sentetik antioksidanların güvenliğine ilişkin algısı nedeniyle doğal antioksidanlara olan talep artmıştır. Doğal antioksidan içeren meyve ve sebzelerin düzenli tüketimi, kanser ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi hastalıkların risklerini azaltmıştır [16].

Gıda endüstrisinde, askorbik asit ve BHT gibi sentetik antioksidanlar, yiyecekleri ve hayvansal gıda ürünlerini tazelik, besin değeri, lezzet ve renk bakımından korumak ve stabilize etmek için katkı maddesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ancak BHT'nin

potansiyel olarak toksik olduğu, özellikle de yüksek dozlarda BHT'nin uzun süreli diyet alımı ile ilişkili sağlık riskleri göz önünde bulundurulmalıdır [17].



Şekil 2.1. Antioksidanların sınıflandırılması [18]

Tablo 2.2. Yaygın olarak kullanılan doğal ve sentetik antioksidanların kimyasal yapıları [19].

Antioksidanlar	Kimyasal Yapısı	Kaynağı
Askorbik Asit		Sentetik veya Doğal
Butillenmiş hidroksianisol (BHA)		Sentetik
Butillenmiş hidroksitolüen (BHT)		Sentetik
Gallik Asit		Doğal
Propil gallat		Sentetik
Kuersetin		Doğal
Troloks		Sentetik
α -Tokoferol		Doğal
Tersiyer butilhidrokinon (TBHQ)		Sentetik

Son yıllarda sentetik antioksidanların toksisitesi eleştirilerine karşı, bitkisel ürünlerin serbest radikallere karşı korunmayı sağlayacak antioksidan potansiyelini araştırmaya yönelik çalışmalar başlamıştır. Fenolikler, flavonoidler, tanenler, proantosiyanidinler ve çeşitli bitki ve bitki ekstraktlarının, lipid peroksidasyonunu inhibe eden radikal temizleyiciler olduğu bildirilmiştir.

Sentetik antioksidanlardan Troloks ve TBHQ yaygın olarak kullanılmaktadır. TBHQ, tert-bütil grubu ile süstitüe edilmiş bir hidrokinon türevidir. Gıdalarda doymamış bitkisel yağlar ve birçok yenilebilir hayvansal yağ için koruyucu olarak kullanılan oldukça etkili bir antioksidandır. TBHQ, BHA ve BHT'deki tersiyer-butil süstitüentleri, lipid çözünürlüğünü artırma işlevi görür.

2.2.1.2. Doğal Antioksidanlar

Askorbik Asit

Askorbik asit (C vitamini), antioksidan aktivitesi ile bilinir ve bu nedenle kozmetiklerde ve dejeneratif hastalık tedavilerinde kullanılır. C vitamini birçok fizyolojik fonksiyona sahiptir, bunlar arasında membran ve lipoprotein lipid peroksidasyonunda E vitamini geri dönüşümü için yüksek oranda antioksidan güce sahiptir. Ayrıca in vitro olarak C vitamini, pro-oksidan aktivite yeteneğine de sahiptir. Askorbat ve demir iyonu kombinasyonunun, lipid peroksidasyonunu indükleyen hidroksil radikalleri ürettiği uzun zamandır bilinmektedir. C vitamini, hidrofilik radikaller için güçlü bir antioksidandır, fakat lipofilik radikallere karşı zayıftır [20].

Tokoferoller

Tokoferoller ve tokotrienoller doğada yaygın olarak bulunmaktadır. E vitamini, α -tokoferolün en bilinen grubu olup lipitte çözünür bileşiklere verilen ortak isimdir. Lipoproteinlerde ve membranlarda bulunur, ara peroksil radikallerini temizleyerek lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu bloke eder. Oldukça sterik (engellenmiş) α -tokoferil kökü, yağ asidi yan zincirlerine saldırımda çok daha az reaktiftir ve askorbik asit aracılığıyla ana fenolüne geri dönüşerek zincir reaksiyonunu kırmaktadır [20].

Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler, hem yenilebilir hem de yenilemez bitkilerde yaygın olarak bulunur. Bunların, antioksidan aktivite de dâhil olmak üzere çoklu biyolojik etkilere sahip oldukları bilinmektedir. Meyvelerin, bitkilerin, sebzelerin, tahılların ve fenolik yönünden zengin diğer bitkisel materyallerin ham ekstraktları giderek daha fazla kullanım alanı bulmaktadır. Çünkü lipidlerin oksidatif bozunmasını geciktirerek gıdanın kalitesini ve besin değerini iyileştirirler. Fenolik bileşikler bakımından zengin fonksiyonel gıdalar, genel sağlık problemlerine, koroner kalp hastalıklarına ve kansere karşı spesifik etkiye sahiptir. Bu bakımdan fenolik bileşikleri de içeren antioksidan bileşenler bilim adamları, gıda üreticileri ve tüketiciler arasında giderek ilgi uyandırmaktadır [21].

Fenolik bileşikler sekonder metabolitler olarak kabul edilir ve normal gelişim sırasında enfeksiyonlara, yaralanmalara, UV radyasyona ve böceklerle karşı bitkiler tarafından sentezlenirler. Fenilalanin ve tirozinden türetilen bu fitokimyasal bileşikler bitkilerin her kısmında bulunur ve çok çeşitlidir [21].

Fenolik bitki bileşikleri birkaç kategoriye ayrılır; basit fenolikler, fenolik asitler (sinamik ve benzoik asit türevleri), kumarinler, flavonoidler, stilbenler, tanenler, liganlar ve ligninlerdir. Bunların antioksidan yönünden en güçlü olanları flavonoidlerdir.

Flavonoidler

Flavonoidler bitkilerde doğal olarak bulunur ve bunların insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olduğu düşünülmektedir. Flavonoidler ile ilgili çalışmalar, çok çeşitli antibakteriyel, antiviral, antienflamatuar, antikanser ve anti-alerjik aktiviteler göstermiştir [22]. Biyolojik aktiviteleri ile flavonoidler, genel olarak besin maddesi olmadığı kabul edilmesine rağmen, insan diyetinin önemli bileşenleridir. Flavonoidlerin kaynakları yiyecekler, içecekler, farklı bitkisel ilaçlar ve ilgili fitomedikindir [23].

Flavonoidler önemli bir fenolik bileşik sınıfıdır ve güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. Flavonoidlerin antioksidan özelliğinin incelendiği ilk çalışma, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki mekanizması üzerine olmuştur. Flavonoidlerin, singlet oksijen ve birçok hastalıkta yer alan çeşitli serbest radikaller dahil olmak üzere çoğu oksitleyici moleküle karşı oldukça etkili temizleyici olduğu gösterilmiştir [23].

Antioksidan mekanizmalar, enzimleri inhibe etmeyi, serbest radikal üretimine katılan iz elementleri şelatlamayı, reaktif türlerin süpürülmesini ve antioksidan savunma sistemlerinin düzenlenip korunması ile reaktif oksijen oluşumunu önlemeyi kapsamaktadır [24].

Günümüzde 4000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır ve bu rakam artmaya devam etmektedir. Flavonoidler ayrıca kalkonlar, antosiyaninler, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, flavononoller ve flavanollere şeklinde gruplara ayrılırlar.

Antosiyaninler muhtemelen insan diyetindeki en büyük fenolik bileşik grubudur ve güçlü antioksidan aktiviteleri, sağlığın korunmasında önem arz etmektedir. Düzenli olarak tüketildiğinde bu flavonoidlerin, kanser ve kalp hastalığı gibi hastalıkların riskinde azalma sağladığı görülmüştür [15].

Esansiyel yağlar

Esansiyel yağlar ayrıca uçucu ya da eterik yağlar olarak da adlandırılan aromatik bileşikler, farklı bitki kısımlarından elde edilen yağlı sıvılardır ve gıda aromaları şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Esansiyel yağlar birçok tekli bileşikten oluşan kompleks karışımlardır. Kimyasal olarak terpenlerden ve oksijenli bileşiklerinden elde edilirler. Esansiyel yağlar, gıda koruma, aromaterapi ve koku endüstrisinde oldukça faydalı şekilde kullanılmaktadır [25].

Doğada, esansiyel yağların bitkileri korumada önemli bir rolü vardır. Antibakteriyel maddeler, antiviraller, antifungaller ve insektisit olarak görev yaparlar. Bazen polenlerin yayılmasına yardımcı olan veya diğer istenmeyen böcekleri kovan böcekleri çekerler. Sıvı, uçucu, saydam, nadiren renkli, organik çözücülerde çözünürler ve sudan daha düşük yoğunluğa sahiptirler. Tomurcuklar, çiçekler, yapraklar, saplar, tohumlar, meyveler, kökler ve kabuklar gibi bitkinin tüm organları tarafından sentezlenir ve bitkinin salgı hücrelerinde, kanallarında, epidermal hücrelerde ve salgı trikomlarında depolanır [25].

2.3. Biyoaktif Bileşiklerinin Eldesinde Kullanılan Modern Ekstraksiyon Yöntemleri

Literatüde farklı yöntemlerle biyoaktif bileşenlerin eldesi için yöntemler kullanılmıştır. Bu yöntemleri sırasıyla aşağıdaki şekilde açıklayabiliriz;

2.3.1. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MDE)

Mikrodalgaların elektromanyetik enerjisi, bir malzeme tarafından absorplandığında ısı enerjisine dönüştürülür. 600-700 W enerji çıkışına sahip ticari mikrodalga cihazları için en sık kullanılan frekans 2.45 GHz'tir (Jain ve diğerleri, 2009). MDE, biyoaktif bileşiklerin farklı bitki materyallerinden ekstraksiyonu için basit, çevre dostu ve ekonomik bir tekniktir [26]. Bitkisel materyaller için MDE uygulamasının kullanılabilirliği ilk olarak 1986'da Ganzler ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir [27].

Mikrodalga fırınlar birbirine dik olan elektrik ve manyetik alanlara sahiptir. Elektrik alanı dipolar dönüş ve iyonik iletim olmak üzere iki eşzamanlı mekanizma yoluyla ısınmayı sağlar. Dipolar dönüş, hem çözücü hem de katı numunede dipol momentine sahip olan moleküllerin elektrik alanı üzerindeki hizalanmasından kaynaklanmaktadır. Bu salınım, moleküller arasında çarpışmalar yaratarak termal enerjinin ortama yayılmasını sağlar. 2.45 GHz frekansında, bu olay 4.9×10^9 kat daha hızlı meydana gelir ve sonuçta ortaya çıkan ısıtma işlemi çok hızlıdır. Çözücünün dielektrik sabiti büyüdükçe, ısıtma daha hızlı olmaktadır. Sonuç olarak, klasik ısıtma yöntemlerinden farklı olarak, mikrodalgalar tüm örneği aynı anda ısıtır. Ekstraksiyon işleminde mikrodalga ısıtma yönteminin avantajı, moleküllerin dipol rotasyonu nedeniyle zayıf hidrojen bağlarının bozulmasıdır [26].

Numune bileşenleri, dielektrik sabitlerine göre mikrodalga enerjisini absorplar. Bitkisel materyal mikrodalga çözücüsünün içine daldırıldığında, mikrodalga radyasyonunun ısıyı solvent tarafından emilmeden doğrudan katıya ulaşır, bu da katı içerisinde kalan nemin ısıtarak buharlaşmasına neden olur. Substratın hücre duvarını yıkan ve içeriğindeki bileşenlerin çözücüye geçişini sağlayan yüksek buhar basıncı yaratır. Çoğu MDE işlemi için kullanılan çözücüler, yüksek dielektrik sabitine ve mikrodalga enerjisini kuvvetli bir şekilde absorbe edebilme kapasitesine sahiptir. Bununla birlikte, ekstraksiyon seçiciliği ve ortamın mikrodalgalarla etkileşime girme yeteneği, çözücü karışımları kullanılarak modüle edilebilir [28]. Çözücüye su ilavesi, verimin artmasını sağlayabilir. Mikrodalgada aseton gibi şeffaf çözücüler fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için en iyisidir. Metanol: kloroform karışımı, yüksek dağılma faktörü nedeniyle daha iyi ısıtma verimliliği sağlar. Şeffaf çözücüler (örneğin, heksan), termobil bileşenlerin çıkarılması için daha uygundur.

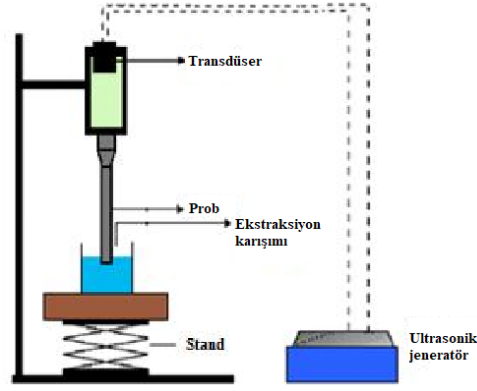
MAE iki farklı modda uygulanabilir. Bunlardan kapalı kap sisteminde, kontrollü yüksek basınç ve sıcaklık altında, açık kap sisteminde ise atmosferik basınçta ekstraksiyon

gerçekleştirilir. Kapalı kap sisteminde çözücü, atmosferik kaynama noktalarının çok üstünde ısıtılabilir. Bu prosedürde hem ekstraksiyon hızı hem de verimlilik yüksektir [26]. Bu sistem, uçucu bileşikler için en uygundur. Açık kap sisteminde maksimum sıcaklık, kullanılan çözücünün kaynama noktası ile belirlenir [28]. Kapalı kap sistemleri ile karşılaştırıldığında açık kap sistemleri, numunenin daha güvenli işlenmesini ve daha büyük miktarlarda ekstraksiyonun gerçekleştirilmesini sağlar [26]. Ajitasyon nedeniyle iyileştirilmiş kütle transferinin getirdiği avantajlar, MDE'nin her iki modunda da mevcuttur.

2.3.2. Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UDE)

Ultrasonik radyasyon, analitik sürecin çeşitli adımlarını hızlandırmakta güçlü bir yardımcıdır. Bu enerji, organik ve inorganik bileşiklerin ekstraksiyonu, homojenizasyonu gibi çeşitli işlemleri kolaylaştırdığı ve hızlandırdığı için katı numunelerin ön işlemlerinde çok faydalıdır. Ultrason destekli liç, farklı matrislerden analitleri diğer ekstraksiyon tekniklerinden daha kısa sürede ekstrakte etmek için etkili bir yoldur [29]. En basit ekstraksiyon tekniklerinden biri olarak kabul edilir, çünkü yaygın olarak kullanılan laboratuvar ekipmanlarında (ultrasonik banyo) gerçekleştirilmesi kolaydır. Şematik gösterimi Şekil 2.2'de verilen bu yöntemde, öğütülmüş numune uygun çözücü ile karıştırılır, çalışma sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin ayarlandığı ultrasonik banyoda gerçekleştirilir.

UDE, gıda işleme teknolojisine uygulanması, bileşenlerin bitki materyallerinden ekstraksiyonunu kolaylaştırması ve yüksek verim sağlaması açısından endüstriyel alanda büyük ilgi çekmektedir. Ultrason, daha kısa reaksiyon süresi, az miktarda malzeme kullanımı, etkili ve minimum çözücü kullanımı ve numune verimindeki artış gibi ana avantajlara sahiptir. Biyoaktif bileşenlerin izolasyonu ve saflaştırılması için genellikle kullanışlıdır [30]. İşlemin dezavantajı ise, ultrason enerjisinin (> 20 kHz) tıbbi bitkilerdeki biyoaktif bileşenler üzerinde serbest radikallerin oluşumuna ve buna bağlı olarak moleküllerde istenmeyen değişikliklere sebep olmasıdır.



Şekil 2.2. UDE Kurulumunun Şematik Gösterimi [31]

2.3.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SAE)

Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SAE), bitkilerdeki biyoaktif bileşiklerin, ortam sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta elde edilmesinde kullanılır. Kullanılan düşük sıcaklıklar maddenin termal denatürasyona uğramasını önler. SAE, eski bir solvent ekstraksiyon tekniğidir, ancak ticari uygulaması, gelişmiş teknoloji ve pahalı yüksek basınçlı ekipman gereksinimi nedeniyle yavaş gerçekleşmiştir. Akışkanların kritik noktalarının yakınındaki uygun taşıma özellikleri, bitki matrisinin daha derine nüfuz etmesini sağlar. Geleneksel organik çözücülerden daha verimli ve daha hızlı bir ekstraksiyon gerçekleştirilir. Ekstraksiyon, yüksek basınçlı ekipmanla kesikli veya sürekli bir şekilde gerçekleştirilir. Genel olarak silindirik ekstraksiyon kapları kullanılır [32]. Yığın işlemlerde katı, ekstraksiyon kabına yerleştirilir ve hedeflenen ekstraksiyon koşullarına ulaşıncaya kadar süperkritik solvent beslenir. Yarı kesikli işlemde süperkritik solvent, sabit bir akış hızında yüksek basınçlı pompa ile sürekli olarak beslenir, bir veya daha fazla ayırma aşaması kullanılır. Süperkritik akışkan teknolojisi, mevcut kimyasal analiz yöntemleriyle karşılaştırılabilir bir verimlilikle etkili bir analitik teknik olarak kabul edilmektedir. SAE, ısıya dayanıklı bileşikler de dahil olmak üzere, doğal ürünlerdeki biyoaktif bileşenlerinin kalitatif ve kantitatif tespiti için uygun bir şekilde kullanılabilir [33].

SAE, esansiyel yağlar ve kafein gibi uçucu veya aromatik bileşiklerinin bitki materyallerinden ekstraksiyonu için kullanılır. SAE sırasında sıcaklık, basınç, numune hacmi, akış ve basınç kontrolü gibi birçok faktör önemlidir. Belirli bir maddenin kritik sıcaklığının ve basıncının üzerindeki koşullar uygulanır ve bu süperkritik akışkanlar, sıvı ve gaz fazları arasında özellikler gösterir. Süperkritik akışkanların ekstraksiyon solventi olarak

kullanılma olasılığı, yoğunluklarıyla doğrudan bağlantılıdır. Süperkritik akışkan, kritik sıcaklık (T_C) ve belirli bir derecedeki kritik basıncın (P_C) üzerindeki yoğun bir gaz olarak adlandırılır. Su için sıcaklığın (T_C) ve basıncın (P_C) kritik koşulları sırasıyla 374 °C ve 220 atm iken, karbondioksit için T_C 30.9 °C ve P_C 73.8 atm'dir [34].

Karbondioksit (CO_2) SAE'de en sık kullanılan ekstraksiyon solventidir. Tek başına CO_2 seçici değildir, ancak bir organik solvent veya modifiye edici kullanılarak ekstraksiyonun kapasitesi ve seçiciliği arttırılabilir. SAE'de genellikle en çok tercih edilen solvent CO_2 'dir, çünkü kritik sıcaklığı sadece 304 K'dir. Bu da ısıya dayanıklı bileşiklerin ekstraksiyonu için bu solventi cazip kılmaktadır. Ayrıca CO_2 , üründe çözücü kalıntısı bırakmayan, güvenli (yanıcı, patlayıcı olmayan), ucuz, aşındırıcı olmayan, kokusuz ve renksiz bir çözücüdür; Aynı zamanda toksik değildir ve genel olarak farmasötiklerde ve gıdalarda zararsız bir bileşen olarak kabul edilir [32].

Birçok çalışmada yaygın olarak kullanılan bu üç ekstraksiyon yönteminin karşılaştırılması Tablo 2.3'te görülmektedir.

Tablo 2.3. Ekstraksiyon tekniklerinin karşılaştırması

Ekstraksiyon Teknikleri	Avantajları	Dezavantajları
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	Hızlı olması (10-30 dakika) Düşük solvent tüketimi (20-50 mL) Daha yüksek sıcaklıklar Ekstraksiyon parametrelerinin tam kontrolü Kurutucu ajanlar gerektirmemesi	Seçilen solventlerin mikrodalga ısımasını absorplaması (polar solventler) Materyaldeki her şeyin ekstrakte edilmesi Temizleme basamağı gerektirmesi Yüksek maliyet
Ultrason Destekli Ekstraksiyon	Fazla miktarda örnek kütlesi ekstrakte edilmesi Matrikse bağımlı olmaması Hızlı olması (2-20 dakika) Düşük maliyet	Fazla miktarda solvent tüketimi (20-200 mL) Filtrasyon gerektirmesi
Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu	Hızlı olması (20-60 dakika) Düşük solvent tüketimi (10-20 mL) CO_2 'nin toksik olmaması, alev almaması, ucuz olması Termolabil analitler için uygun olması	Yüksek maliyet Matrikse bağımlı olması Polar analitlerin ekstraksiyonundaki zorluk Verimi arttırmak için modifikatöre ihtiyaç duyulması

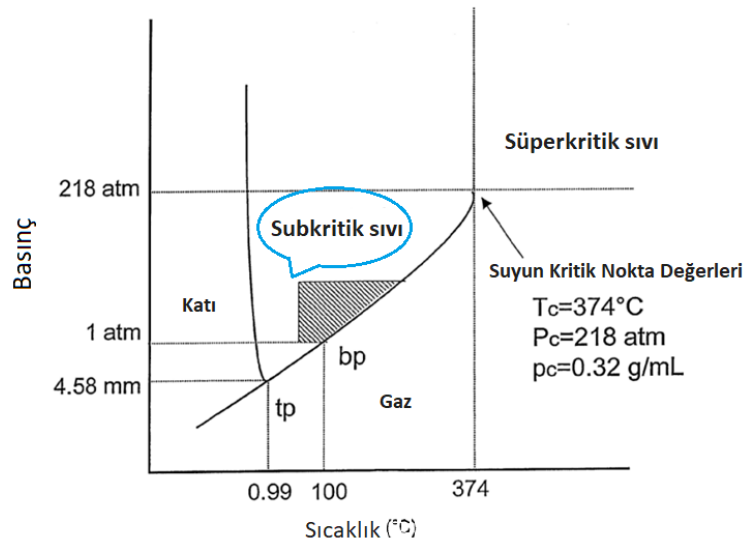
2.4. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu

Daha yeni bir yöntem olan basınçlı su basınçlı sıcak su ekstraksiyonu (BSE), tüm ekstraksiyon işlemi boyunca sıvı fazı korumak için yeterli olan yüksek sıcaklık (kaynama noktasından yüksek, 100 °C ve kritik sıcaklıktan daha düşük, 374 °C) ve basınçtaki suyun kullanımına dayanan gelişmiş bir ekstraksiyon tekniğidir.

BSE sıklıkla; subkritik su ekstraksiyonu, sıcak su ekstraksiyonu, sıcak sıvı su ekstraksiyonu ve basınçlı düşük polariteli su ekstraksiyonu gibi farklı terminolojiler altında temsil edilmektedir.

2.4.1. Basınçlı Sıcak Suyun Özellikleri

“Basınçlı sıcak su” veya “subkritik su” terimi, kaynama noktası ile suyun kritik noktadaki sıcaklığı arasındaki sıcaklıklarda (100 - 374 °C) sıvı fazdaki su anlamına gelir [35,36]. Su, molekülünde var olan çok güçlü hidrojen bağlarından kaynaklanan birçok farklı özelliğe sahiptir. Subkritik sıcaklık aralığı (100 - 374 °C) dahilinde, hidrojen bağı ve diğer moleküller arası kuvvetler kesintiye uğrar ve suyu çok daha esnek ve dinamik bir ekstraksiyon solventi haline getirir. Suyun sıvı halde tutulması için basıncın yeterli olması koşuluyla, sıcaklıktaki ufak değişiklikler solvasyon gücünde büyük değişiklikler oluşturabilir [37]. Farklı sıcaklık ve basınç koşullarında suyun faz diyagramı Şekil 3.1’de sunulmuştur.



Şekil 2.3. Sıcaklığın ve basıncın bir fonksiyonu olarak suyun faz diyagramı

Suyun faz diyagramında, su sıcaklığı kaynama noktasının üzerine çıktığında, gaz fazına geçişi önlemek için yeterli basınç uygulandığında, suyun, kritik sıcaklık (T_c) ve basınca (P_c) kadar subkritik durumda var olduğu söylenir. Bu koşullar altında, subkritik su hem sıvı hem de gaz olarak davranır. Subkritik durumdaki su, yoğunluk, viskozite, difüzivite, özgül ısı kapasitesi, statik dielektrik sabiti ve iyon ürünü gibi fiziksel ve elektrokimyasal özelliklerinde önemli değişiklikler geçirir.

Yüksek sıcaklık ve yüksek basınç, suyun yüzey gerilimini ve viskozitesini düşürür. Bu da çözünürlüğün artarak matrise daha iyi nüfuz etmesini ve daha iyi ekstraksiyonu sağlar. Sıcaklığın artırılması hidrojen bağlarını kırar, böylece suyun yoğunluğu ve viskozitesi hızla azalır.

Suyun iyonik gücü (pK_w), yoğunluğa ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. $pK_w < 14$ olduğunda, su heterolitik reaksiyon için daha uygundur; $pK_w > 14$ iken, hemolitik reaksiyon için uygundur. Basınçlı sıcak suyun fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.4'te özetlenmiştir. Basınçlı sıcak su, nispeten düşük yoğunluğu, dielektrik sabiti ve iyonik kuvveti nedeniyle çok düşük sıcaklık koşullarında süperkritik suya ($374\text{ }^{\circ}\text{C}$ üzeri) veya kızgın buhara ($> 400\text{ }^{\circ}\text{C}$) kıyasla karbonhidrat ve fenolik ekstraktlarının bozunmasını önleyerek ekstraksiyonu kolaylaştırır.

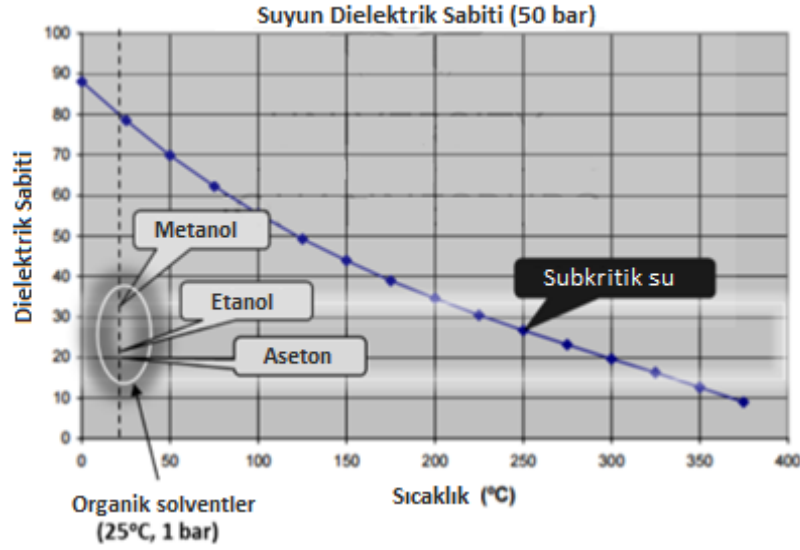
Tablo 2.4. Suyun Özellikleri

Parametreler	Normal su	Basınçlı sıcak su	Süperkritik su	Kızgın buhar
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	25	100-374	374-400	400
Basınç (bar)	1	2-250	250-500	1
Yoğunluk (kg / m^3)	1000	170-800	58-170	3
Dielektrik sabit (ϵ)	79	6-58	6-11	1
İyon gücü (pK_w)	14	11-12	11-19	-

2.4.2. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonunun Prensipleri

BSE prensipleri, suyun moleküler yapısına ve termodinamik özelliklerine dayanır. Su molekülü, polarite, kohezyon, yüzey gerilimi, hidrojen bağları, dipol etkileşimler vb. nedeniyle zıt uçlarda hafif negatif (δ^-) ve hafif pozitif (δ^+) yüke sahiptir. Ortam sıcaklığında ve atmosferik basınçta su, metalik olmayan sıvılar arasında en yüksek dielektrik

sabitlerinden birine sahiptir (25 °C'de 1 bar'da $\epsilon = 80$). Bu durum suyu, düşük polariteli bileşikler için zayıf bir ekstraksiyon solventi haline getirmektedir [38,39]. Bununla birlikte, sıcaklık ve basınç sırasıyla 250 °C ve 50 bar'a yükseltildiğinde, dielektrik sabiti $\epsilon = 27$ 'ye düşer (Şekil 2.7); bu, metanol ($\epsilon = 33$), etanol ($\epsilon = 24$), aseton ($\epsilon = 20.7$) ve asetonitril ($\epsilon = 37$) gibi organik çözücüler aralığındadır.



Şekil 2.4. Sıcaklığın bir fonksiyonu olarak suyun dielektrik sabiti [35].

Bu koşullar altında su, bu organik çözücüler gibi davranır ve çok çeşitli düşük ve orta polariteli analitleri çözebilir. BSE'nin istisnai özelliği, suyun dielektrik sabitinin (ϵ), sıcaklık ve basıncı değiştirerek geniş bir aralıkta kolaylıkla manipüle edilebilmesidir. Esas olarak ekstraksiyon, difüzyon ve konveksiyon prosesleri tarafından gerçekleşen kütle transferi yoluyla oluşur. Sağlanan ısı enerjisi, desorpsiyon işlemi için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürerek adezif (çözünen-matris) ve kohezif (çözünen-çözünen) etkileşimi bloke edebilir. Yükseltilmiş basınç, suyun, ortam basıncında normalde erişemediği matris alanlarına (gözeneklere) nüfuz etmesini sağlayarak ekstraksiyona yardımcı olur [40].

2.4.3. Basıncılı Sıcak Su Ekstraksiyonunu Etkileyen Parametreler

Sıcaklık: Sıcaklık, BSE'nin ekstraksiyon verimliliği üzerinde çok güçlü ve belirleyici bir etkiye sahiptir. Suyun fizikokimyasal özelliklerini etkileyebilir ve ayrıca termal olarak kararsız analitlerin parçalanmasına neden olabilir veya hidrolitik saldırıya maruz bırakabilir.

BSE'de, uygulanan ekstraksiyon sıcaklığı suyun normal kaynama noktasının üzerindedir. Yüksek difüzyon, düşük viskozite ve düşük yüzey gerilimi gibi fiziksel avantajlar, yüksek sıcaklık koşullarında elde edilir. Artan buhar basıncı ve hedef bileşiklerin matrislerden hızlı termal desorpsiyonu, BSE'nin ekstraksiyon verimliliğini artırabilir. Yüksek sıcaklıklar suyun özelliklerini de değiştirir ve böylece suyun polaritesi polar olmayan bileşiklere daha yakın hale gelir. Bu durum, farklı matrislerin ekstraksiyonu için polar olmayan bileşiklerin sudaki çözünürlüğünü de artıracaktır.

Su daha yüksek sıcaklıklarda numune matrisinin daha iyi ıslanmasına yol açar. Ayrıca sıcaklık artışı, analit-matris etkileşimlerini, özellikle hidrojen bağı ve diğer dipol-dipol kuvvetlerini bozarak, numune matrisinden analitlerin başlangıçtaki desorpsiyonunu kolaylaştırarak kütle transfer kinetiklerini de desteklemektedir. Özetle, BSE'deki yüksek sıcaklık, gelişmiş ekstraksiyon kinetikleri açısından birçok avantaj getirmektedir.

BSE'de yüksek sıcaklık kullanımının üç temel dezavantajı vardır:

- Ekstraksiyon seçiciliğinin azalması
- İlgili analitlerin bozunması
- Numune matristeki diğer kimyasal reaksiyonlar

Sıcaklık arttıkça, kontaminantlar/kirleticiler diye adlandırılan istenmeyen bileşikler de çıkarılacak ve daha düşük seçicilik olacaktır. Örneğin, Vergara-Salinas ve ark.[41], sırasıyla 100 °C ve 200 °C'de elde edilen üzüm posasındaki iki PHWE ekstraktını karakterize etmiştir. 280 nm ve 320 nm'de ölçülen, 200 °C'de elde edilen ekstraktların HPLC kromatogramları, 100 °C'de elde edilen ekstraktların içinde bulunmayan pikleri de göstermiştir. Bunlar termal bozunma veya diğer tepkimelerle oluşan bileşiklere veya ekstraksiyon yönteminin daha düşük seçiciliğine yol açan numuneden çıkarılan ek bileşiklerin karşılığı olarak bildirilmiştir [42].

Maillard, karamelizasyon ve termo-oksidasyon reaksiyonlarının, doğal numunelerdeki BSE sırasında oluşabileceği gösterilmiştir. Farklı yapılar ve kimyasal özellikler gösteren yeni bileşikler oluşturan reaksiyonların gerçekleşmesi, hatalı analitik sonuçlara neden olabilir. Özellikle de bitkilerdeki antioksidan fenolik bileşiklerin belirlenmesi için spektrofotometrik bir antioksidan testi analitik yöntem olarak kullanılıyorsa, sonuç yanlışlıkla BSE'de incelenen en yüksek sıcaklığın antioksidan bileşiğinin en yüksek geri kazanımını sağladığını gösterebilir. Aslında, yüksek antioksidan kazanımı, Maillard'dan

gelen yeni antioksidan bileşiklerin, karamelizasyon ve termooksidasyon reaksiyonlarının oluşmasından kaynaklanmaktadır [43].

Çoğu durumda, termolabil analitlerin ekstraksiyon sırasında bozunması kaçınılmazdır. Örneğin antosiyaninler, çözücünün sıcaklığına ve pH değerine bağlı olarak oksidasyona son derece duyarlıdır. Basınçlı sıcak sudaki fenolik bileşiklerin bozunması ile ilgili çeşitli yayınlar bulunmaktadır. Bu durum, yöntem geliştirme aşamasında sıcaklığın, analitlerin kararlılığına etkisinin göz önüne alınması gerektiğini göstermektedir [44].

Özetlemek gerekirse, BSE'deki ekstraksiyon sıcaklığının, arttırılmış çözünürlük ve iyileştirilmiş kütle transferi avantajlarından tam olarak yararlanmak için optimize edilmesi önemlidir. Ancak bozunma etkilerini en aza indirmek için dikkatli bir şekilde yapılması gerekir. Genellikle, düzgün şekilde optimize edilmiş BSE, geleneksel çözücü ekstraksiyon yöntemlerine göre daha yüksek ve daha doğru ekstraksiyon verimleri vermektedir [45].

Basınç: Sıcaklık gibi basınç da suyun faz değişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, BSE sırasında basınç, ekstraksiyon verimi üzerinde önemsiz bir etkiye sahiptir [46,47]. Bunun nedeni, suyun 300 °C'nin altındaki sıcaklıklarda oldukça sıkıştırılmaz olmasıdır. Bu nedenle, basıncın sıvı halini muhafaza ettiği müddetçe fiziksel özelliklerinde önemli bir etkisi yoktur. 200 °C'de 15 bar ve 300 °C'de 85 bar olarak uygulanan basınçlar, suyu sıvı halde muhafaza edebilir. Fakat 300 °C üzerindeki su kritik sıvı gibi hareket etmeye başlar ve yoğunluk gibi bazı fiziksel özellikler basınçla birlikte değişmeye başlar. Her durumda, BSE'deki daha yüksek basınç, akışkanın normalde atmosferik basınç altında sıvı ile temas etmeyecek olan numune matrisi alanlarına zorlanması yoluyla ekstraksiyon hızını artırabilir [48].

Akış Hızı ve Ekstraksiyon Süresi: BSE sırasında kimyasal tepkimeleri en aza indirmenin yolu, yeterince yüksek akış hızıyla sürekli akış sistemi kullanmaktır. Daha yüksek akış hızı, yüksek sıcaklıktaki suda analitlerin kalış süresini azaltarak olası termal bozulmaların önüne geçilmesini sağlar. Bununla birlikte, çözücünün çok yüksek akış hızı ekstraktın gereksiz seyreltilmesine neden olur ve BSE'den sonra bir konsantrasyon adımı gerektirebilir.

Ekstraksiyon kinetikleri esas olarak numune matrisinin gözenekleri içerisindeki desorpsiyon ve difüzyon ile sınırlandırılmışsa, daha yüksek akış hızı, ekstraksiyon hızını da artıracaktır. Liu ve diğerleri tarafından yapılan araştırmaya göre ekstraksiyon sırasında

termal bozulmaya neden olan sorunlardan dolayı, en yüksek akış hızı kırmızı soğandaki antosiyanınların en yüksek ekstraksiyon verimini vermiştir [42].

Ekstraksiyon Modu: BSE, statik veya dinamik modda gerçekleştirilebilir. Dinamik ekstraksiyon modunda hem ekstraksiyon süresi hem de akış hızı BSE'nin optimizasyonu için önemli bir parametrelerdir. Ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığına, matrisin ve analitlerin yapısına bağlıdır. Yapılan bir çalışmada 100 °C'de 20 dk'lık ekstraksiyon süresinin kullanıldığı BSE yöntemi ile 60 dakika boyunca geri akış altındaki ısıtma yöntemi karşılaştırıldığında, BSE yönteminde Stevia rebaudiana'dan daha yüksek steviosid ve rebaudiosid verimi elde edildiği gözlenmiştir [49].

BSE'de, su genellikle dar bir numune hücresinden yüksek basınçta zorlanır ve bu da ekstraksiyon oranını artırır. Bununla birlikte, uzun süreli ısıtma bileşiklerin bozunmasına neden olabilir ve bu nedenle ekstraksiyon süresinin optimizasyonu çok önemlidir. Dinamik ekstraksiyon modunda, çözücü numuneye sürekli pompalanarak dengeye getirilir. Bu nedenle, statik moda kıyasla daha fazla sıvı akışı gerekir. Genellikle dinamik ekstraksiyon modunda 1 veya 1.5 ml / dk'lık akış hızı kullanılır. Bununla birlikte, daha yüksek akış oranı genellikle yüksek konsantrasyonlu numunelerin ekstraksiyon verimliliğini artıracaktır. Çünkü suyun toplam hacmi arttığında, matristeki analitlerin fiziksel kütle transferinde artış meydana gelecektir [50].

Statik ekstraksiyon modunda ekstraksiyon verimi, büyük oranda partiyon denge sabitine ve bileşiklerin yükseltilmiş sıcaklıklardaki çözünürlüğüne bağlıdır. Bu nedenle, yüksek konsantrasyonlu numuneler veya düşük çözünürlüklü analitler, sınırlı miktarda su kullanımından dolayı yetersiz ekstraksiyona neden olabilir.

Diğer Parametreler: Yukarıda açıklanan önemli değişkenlerin yanı sıra, BSE'de ekstraksiyon verimliliği üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilen birkaç parametre daha vardır.

Kosolventler veya sürfaktan gibi modifiye ediciler, BSE'nin ekstrakte edilebilirliğini arttırmak için sıklıkla kullanılır. Kosolventler, BSE'nin verimliliğini arttırmak için eklenen ikincil çözücülerdir. Modifikatörler suyun önemli fizikokimyasal özelliklerini (polarite, yüzey gerilimi, hidrojen bağ kuvveti ve difüzivite) değiştirebilir ve bu da ekstrakte edilebilirliği artırır [51].

Numunenin parçacık boyutu ekstraksiyon kinetiğini etkiler çünkü daha küçük parçacık boyutu numune ve çözücü arasında artan temas yüzeyine yol açar. Partikül boyutu, kanal oluşturma etkilerinden kaçınarak (parçacıkların aglomerasyonu/yığılması) temas yüzeyini maksimize etmeye uygun olmalıdır.

Bazı uygulamalarda, dispersiyon maddeleri (örneğin, cam boncuklar) ekstraksiyon verimini maksimize etmek için numunenin ve çözücü üniform dağılımını iyileştirmek için ekstraksiyon hücresindeki numuneye verilir. Aglomera (yığın) oluşumunu önlemek için çalkalamada kullanılabilir.

Çözücü / numune oranı, BSE'de önemli bir parametredir. Yüksek çözücü / numune oranı, daha fazla suyun ısıtılmasını gerektirir. Buna ek olarak, analit daha az konsantrasyon olduğundan konsantrasyon adımı gerekecektir. Bu da toplam analiz sürelerinin daha uzun olmasına neden olur ve analitlerin bozulma riskini artırır. Bu nedenle, çözücü numune oranının mümkün olduğunca az olması, aynı zamanda mümkün olan en yüksek ekstraksiyon verimini sağlayacak kadar fazla olması önemlidir [52].

2.4.4. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonunun Diğer Yöntemlerle Karşılaştırılması

BSE'de, ekstraksiyon solventi olarak su kullandığı için çevre dostu bir yöntemdir. Su zehirli ve yanıcı değildir, sera etkisine katkıda bulunmaz, atık veya yan ürün oluşturmaz [53]. Ayrıca, korozyoncu değildir ve süperkritik su ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında daha düşük sıcaklık ve basınç gerektirir. BSE yöntemi maliyet açısından etkili ve sürdürülebilir bir profil benimser. Buna ek olarak, BSE nispeten daha az karmaşık bir teknolojiyi benimsemekte ve böylece proses ölçekli cihaz / ekipman için daha düşük mühendislik maliyetleri gerektirmektedir [54].

Geleneksel çözücü ekstraksiyon protokolleriyle karşılaştırıldığında, BSE'nin uygulaması çok kolaydır, daha az zaman ve uzmanlık gerektirir. Böylece hata olasılıklarını azaltılır. Sıcaklık, basınç ve akış hızı gibi ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu, suyun dielektrik sabiti ayarlanarak polar, orta derecede polar ve polar olmayan organik maddelerin seçici ekstraksiyonunu gerçekleştirmek kolaylıkla kontrol edilebilir. Bu, ağırlıklı olarak polar olmayan veya düşük molekül ağırlıklı maddeleri ekstrakte eden ancak sulu etanol veya metanolde kolay çözünen bileşikler geri alamayan CO₂'yi kullanan süperkritik akışkan ekstraksiyonunun eksikliğini gidermektedir [53,54].

BSE'nin ek bir avantajı, yüksek performanslı sıvı kromatografisi, ultra-performanslı sıvı kromatografisi, tandem kütle spektrometresi gibi çeşitli kromatografik tekniklerle uyumluluğudur. Bu yeteneği, suyun şeffaf olması ve birçok fotodedektöre (ultraviyole dedektörü, alev iyonizasyon dedektörü ve proton nükleer manyetik rezonans dedektörü gibi) müdahale etmemesi ve ayrıca ekstraksiyonda ön analiz gerektirmemesinden kaynaklanmaktadır [55].

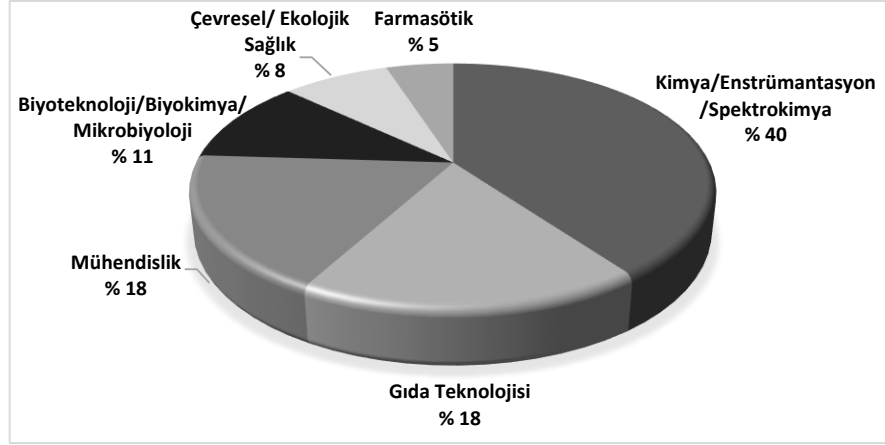
BSE'nin en büyük dezavantajı, yüksek sıcaklıklardan dolayı bazı hedef analitlerin termal olarak parçalanmasıdır. Polisiklik aromatik hidrokarbonların termal bozulma nedeniyle 250 °C'yi aşan sıcaklıklarda geri kazanım hızı düşmektedir. Yüksek sıcaklıklar mikotoksinler de dâhil olmak üzere ısıya duyarlı bileşiklerin ekstraksiyonu için uygun değildir. Çünkü termal bozunum oluşabilmektedir [56].

Bunun dışında basınçlı sıcak su, ortam koşullarındaki suya kıyasla daha reaktif ve aşındırıcı olabilir (diğer bir deyişle, bazı bileşiklerin hidrolizi ve oksitlenmesini hızlandırabilir veya katalizleyebilir [57]. Bununla birlikte, hafif/ılımlı ekstraksiyon koşullarında bile tatmin edici geri kazanım hızlarına ulaşılabileceği için ısıl bozulma veya yüksek sıcaklıktaki suyun reaktivitesi gibi sorunlar ortadan kaldırılabilir.

2.4.5. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu Uygulamaları

BSE, ağırlıklı olarak katı ve toz halindeki numuneler üzerine uygulanmıştır, çünkü bu matrisler akışlı ekstraksiyon sistemi ile daha uyumludur. BSE'de kullanan yöntemler, aroma ve kokuların ekstraksiyonu için gıda ve bitki materyalleri üzerinde ve ayrıca biyoaktif bileşikler için de başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.

Ek olarak, BSE'de kullanan yöntemler, gıda güvenliği analizi için gıda maddelerinden organik kirleticilerin giderilmesine de kullanılmaktadır. Suyun fizikokimyasal özelliklerinde meydana gelen değişiklikler, çevresel toprak ve tortu numunelerinden polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve poliklorlu bifeniller (PCB) gibi polar olmayan organiklerin ekstraksiyonunu mümkün kılmıştır. Yeşil doğası ve belirli ekstraksiyon koşulları altında geniş bileşik yelpazesine sahip olan bu ekstraksiyonun fizibilitesi nedeniyle BSE'nin, pestisitleri ve herbisitleri topraktan geri kazanarak biyolojik arıtım proseslerine yardımcı olduğu belirtilmektedir.



Şekil 2.5. BSE'nin 1990-2014 yılları arasında farklı bilim dallarındaki uygulamaları [58].

2.5. Önceki Çalışmalar

Doğan vd. (2017), yapmış oldukları bir çalışmada menengiç meyvesinden su, etanol ve metanolle elde edilmiş ekstraktların toplam fenolik madde miktarını ve antioksidan aktivitesini (DPPH ve İndirgeyici güç) incelemişlerdir. Örnekler soğuk ekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlara ait ortalama toplam fenolik madde miktarları sırasıyla su, etanol ve metanol için 16.12, 36.19 ve 43.81 mg GAE/g ekstrakt olarak bulunmuştur. Değerler ekstraksiyonda kullanılan solventler açısından incelendiğinde istatistiksel olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Örneklerin fenolik madde miktarında yüksek etkinlikten düşük etkinliğe doğru sıralamanın metanol, etanol ve su şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Antioksidan aktivite tayini için DPPH yöntemi kullanılmış ve sonuçlar radikalın yarısının ortamdan süpürülmesi için gerekli olan konsantrasyon yoğunluğu anlamına gelen IC50 değeri olarak verilmiştir. IC50 değerinin düşük olması örneğin antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Ekstraktlara ait ortalama DPPH IC50 değerleri sırasıyla su, etanol ve metanol için 3.49, 4.11 ve 2.61 mg ekstrakt/ml olarak bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde antioksidan kapasite açısından metanolün diğer solventlere kıyasla daha iyi bir ekstraksiyon solventi olduğu sonucuna varmışlardır [59].

Uzel (2017)'in yaptığı çalışmada, BSE ile siyah havuçtaki fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu, 80 °C'den 100 °C'ye kadar düşük sıcaklıklarda sitrik veya laktik asidin kullanıldığı asitli su ile yapmıştır. Ekstraksiyon basıncı, 10 ila 20 MPa arasında sabit tutulmuştur. Bu asit destekli çözücü çalışmalarında 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda bozunmalar gözlenmiştir. Ayrıca 70 °C ila 130 °C arasında değişen sıcaklıklarda asit yerine

etanolün kullanıldığı su ile (% 40-80) daha iyi bir ekstraksiyonun gerçekleştirildiği de rapor edilmiştir [60].

Durak vd. (2015) yapmış oldukları bir çalışmada, 12 farklı *P. terebinthus* bitkisinin fenolik ekstraksiyonunu en üst düzeye çıkarmak için, metanol, su ve aseton ile optimum çözücü kombinasyonunu belirlemeye çalışmışlardır. Toplam fenolik içeriğin ve DPPH radikal süpürme kabiliyetinin belirlenmesinden önce, farklı çözücü kombinasyonları test edilmiştir. Ekstraktların fenolik içerikleri 12.189 mg GAE / 1000 g ekstrakt ile 36.392 mg GAE / 1000 g ekstrakt arasında değişkenlik göstermiştir. Çözücü ya da çözücü karışımlarının, ekstraktların fenolik içeriklerini önemli ölçüde ($P < 0.05$) etkilediği belirlenmiştir. *P. terebinthus* ekstraktlarının DPPH radikal süpürme aktivite değerlerinde (IC50) % 8.86'dan % 64.43'e kadar anlamlı ($P < 0.05$) farklılıklar gözlenmiştir. Tek çözücünden elde edilen ekstraktların fenolik içerikleri göz önüne alındığında, asetonun en yüksek verimi sağladığı görülmüştür. Suyun aseton ile birleştirilmesinin ekstraksiyon verimini daha da arttırdığı sonucuna ulaşmışlardır. Bu durum suyun varlığının, hücresel dokuların geçirgenliğini iyileştirdiği ve böylece moleküler difüzyon ile kütle transferini arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında optimum çözücü karışımının, maksimum verim sağlayan 69:31 aseton:damıtılmış su kombinasyonu olduğu bulunmuştur [61].

Halder (2013), BSE ile mercimek kabuğu ve mercimek kotiledonundan karbonhidrat, pentosan ve fenolik ekstraksiyonu için kinetik bir çalışma yapmıştır. 180 °C sıcaklıkta, 15 bar basınçta ve 2 mL / dakika akış hızında 250 dakika süreyle ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. 15 bar'lık basıncın 180 °C'de suyun sıvı halde tutulması için yeterli olduğu ve düşük akış hızının, ekstraksiyonu kolaylaştırmak için yüksek basınçlı kap içinde yüksek kalış süresi sağladığı bildirilmiştir. 1 mL / dk'lık akış hızı, uzun kalış süresi nedeniyle ekstraktın bozulmasına neden olduğundan, bu çalışmada 2 mL / dak'lık bir akış hızı tercih edilmiştir. Sonuçlar, mercimek kabuğundaki karbonhidratların 200 °C'ye kadar yüksek oranda elde edildiğini göstermiştir. Mercimek kotiledonundaki karbonhidratlar ise 180 °C'de maksimum oranda elde edilirken, daha yüksek sıcaklıklarda karbonhidratların bozunmasından ötürü verimin düştüğü bildirilmiştir [62].

Chao vd. (2013), ön işlem olarak ultrason destekli BSE kullanarak *Lucium barbarum*'dan değerli doğal polisakaritlerin ekstraksiyonunu gerçekleştirmiştir. Bu çalışmaları, polisakaritlerin maksimum düzeyde geri kazanımının, 100 °C'lik ekstraksiyon

sıcaklığında 53 dakika süreyle elde edildiğini göstermiştir. Bu prosesin, işlem kolaylığı ve ekstrakte edilen polisakkaritlerin yüksek verimi nedeniyle çok etkili olduğu rapor edilmiştir [63].

Yıldız (2013) yapmış olduğu çalışmada, menengiç meyve ekstraktının ve menengiç kahvesinin total fenolik ve flavonoit madde kompozisyonlarını ve antioksidan etkilerini karşılaştırmıştır. Kurutulmuş olgun menengiç meyvelerini 37 °C' de 100 ml metanolla rotary evaporatörde ekstrakte etmiştir. Ekstraktların içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin- Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. AlCl₃/NaNO₂ yöntemi ile de ekstraktın ve kahvenin içerdiği toplam flavonoit miktar tayini yapılmıştır. *P. terebinthus* meyve ekstraktının total fenol miktarı 93, 74 ± 1, 84 mg GAE/g iken menengiç kahvesinin total fenol miktarı 43, 5 ± 2, 27 mg GAE/g olarak bulunmuştur. Toplam flavonoit miktarı kateşine eşdeğer olarak hesaplanmıştır. *Pistacia terebinthus* meyvesinin toplam flavonoit miktarı [mgCE/g ekstrakt] 76, 01 ± 5,90 olarak bulunmuştur. *P. terebinthus* ekstraktının IC₅₀ değerleri ise 0.28 mg/ml' dir. Sonuç olarak, meyve ekstraktının toplam fenol ve flavonoit içeriği kahveden daha zengin bulunmuştur. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında, meyvelerin kavrulmadan direk polar bir çözücü olan su ile ekstrakte edildiğinde kahveden daha yüksek biyolojik aktivite gösterebileceği rapor edilmiştir [64].

Ferna'ndez vd. (2012) yapmış oldukları bir çalışmada, BSE ile *Mangifera indica* yapraklarından elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesini, süperkritik akışkan ekstraksiyonuna kıyasla daha yüksek oranda elde etmiştir. Ekstraktların ve standart bileşiklerin antioksidan aktivitesi, α -tokoferol, mangiferin ve kuersetin bileşiklerinin DPPH yöntemi ile belirlenmiştir. BSE ile elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi, standart bileşikler olan mangiferin (7.80 DPPH g/g kuru ekstrakt) ve kuersetin (7.06 DPPH g /g kuru ekstre) bileşiğine yakın, α -tokoferole göre ise daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu nedenle BSE'nin, süperkritik akışkan (karbondioksit) ekstraksiyonuna kıyasla, güçlü antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır [65].

Durmaz ve Gökmen (2011), yapmış oldukları bir çalışmada kavurmanın *Pistacia terebinthus* yağındaki oksidatif stabilite, antioksidan kapasite ve fitokimyasal içeriği üzerine etkisini incelemişlerdir. Klasik tekniklerle metanol ile ekstrakte edilen *P. terebinthus* yağının toplam antioksidan kapasitesi DPPH ve ABTS yöntemleriyle belirlenmiştir. Ekstraktların toplam fenolik içeriği, Folin Ciocalteu yöntemi ile belirlenerek sonuçlar gallik asit eşdeğeri

olarak ifade edilmiştir. *P. terebinthus* yağının antioksidan aktivitesi kavurma sırasında kademeli olarak belirgin artışla maksimuma ulaşmış (24,79 lg trolox / ml metanolik ekstrakt) ancak, 30 dakikalık kavurma süresinin sonunda örneklerin antioksidan kapasitesinde azalma görülmüştür. Toplam fenolik içereğinde de benzer bir eğilimin olduğu gözlemlenmiştir (maksimum 19,61 lg gallik asit / ml metanolik ekstrakt). Kavurma ile yağların metanolik ekstraktındaki antioksidan aktivitenin arttığı bildirilmiştir. Maillard reaksiyon ürünlerinin oluşumunun yanı sıra kavurma işleminin, doğal olarak bulunan antioksidan fitokimyasalların yağa geçişini kolaylaştırarak toplam antioksidan kapasiteyi arttırdığını rapor etmişlerdir [66].

Co vd. (2011) yapmış oldukları bir çalışmada, BSE ile Huş ağacındaki antioksidanları incelemişlerdir. BSE'deki yüksek sıcaklığın (180 °C), düşük sıcaklığa (80 °C) kıyasla daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip su ekstraktları verdiğini göstermişlerdir. Bazı antioksidanların kısmi bozunumunun daha yüksek sıcaklıklarda (>180 °C) gerçekleştiğini de belirlemişlerdir. Daha yüksek sıcaklıklar, hem ekstraksiyon veriminin azalmasına hem de ekstrakte edilen antioksidanların daha fazla bozunmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, yeni antioksidan bileşikler oluşabileceği ve kısmen parçalanmış antioksidanlar, öncüllerinden daha büyük antioksidan kapasiteye sahip olabilecekleri de rapor edilmiştir. Bu nedenle, termal olarak kararsız bileşikler için ekstraksiyon sıcaklığının dikkatli bir şekilde optimize edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir [67].

Shalmashi vd. (2010)'nin, çay atığından kafeinin BSE ekstraksiyonu üzerine yaptıkları çalışmada, 20, 30 ve 40 barlık basınçların geri kazanım verimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sıcaklık (100, 125, 150, 175 ve 200 °C), akış hızı (1, 2 ve 4 g/dk), ortalama partükül büyüklüğü (0.25, 0.5, 1 ve 2 mm) olarak seçilmiştir. Sonuçlar, basıncın kafein oranı üzerinde önemli bir etkisi olmadığını göstermiştir. Bunu, önemsiz basınç etkisine dayandırmışlardır, sonuç olarak suyun yoğunluğunda önemli bir değişime sebep olmadığı, bu nedenle de sıvı fazı muhafaza edildiği sürece suyun fizikokimyasal özelliklerinde basıncın etkisinin olmadığı bildirilmiştir. 175 °C'de, 4 g/dk akış hızında ve 0.5 mm partükül büyüklüğünde gerçekleştirilen 90 dakikalık ekstraksiyon sonunda çay atığında % 0.77 (w/w) kafein elde edilebilmiştir. Elde edilen sonuçlar geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilen sıcak su ekstraksiyonuna ait verim (% 0.46) ile kıyaslanarak BSE yönteminin daha avantajlı olduğu sonucuna varılmıştır [68].

Plaza vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada, BSE kullanarak ekstraksiyon sıcaklığının yükseltilmesinin, doğal ekstraktların antioksidan kapasitesini geliştirdiğini gözlemlemiştir. Ayrıca BSE süresince *Chlorella vulgaris*, *C. abiesmarina*, *Porphyra spp.*, *S. vulgare*, *S. muticum*, *U. pinnati fida* ve *H. incurvus* algleri gibi farklı doğal ürünlerden antioksidanların neoformasyonunu da doğrulamışlardır. 200 °C 'de elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi, 100 °C'de ekstrakte edilenlerden daha belirgin derecede yüksek olarak elde edilmiştir. Antioksidan kapasitesindeki artışlara, BSE süreci boyunca Maillard reaksiyonlarından ve karamelizasyondan türetilen yeni bileşiklerin üretilmesinin neden olduğunu bildirmişlerdir [43].

Khajenoori vd. (2009)'nin *Zataria multiflora*'dan 100 ve 175 °C arasındaki karvakrol ve timolün geri kazanımına yönelik BSE çalışmaları, ekstraksiyon verimliliğinin, 150 °C'ye kadar sıcaklık artışı ile sürekli olarak arttığını ve bunu takiben daha yüksek sıcaklıklarda yanık kokusunu takip eden bir düşüş izlendiğini göstermiştir [69].

Roudsari vd. (2009) yapmış oldukları bir çalışmada, Kanola küspesinden antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu amacı ile BSE ile (110 ve 160 °C), sıcak su (80 °C) ve etanol ekstraksiyonunu (%95, v/v) karşılaştırmışlardır. Ekstraktlarda toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitesi açısından en yüksek ekstraksiyon veriminin 160 °C'de BSE ile elde edildiği bildirilmiştir [70].

Teo vd. (2009) tarafından, bitkilerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için basınçlı sıcak su ekstraksiyonu (BSE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyonunun (MDE) karşılaştırması yapılmıştır. Bu çalışmada her iki yöntemin, bazı durumlarda tıbbi bitkilerde bulunan termolabil bileşiklerin ekstraksiyonu için uygulanabilir alternatifler olduğu gösterilmiştir. BSE'nin, ekstraksiyon verimliliği, ekstraksiyon ürünü, ekonomik ve çevresel açıdan önemli avantajlar sergilediği görülmüştür [49].

Yang vd. (2007)'nin kekik ve fesleğen yapraklarından D-pinen, limonen, kafur, sitronellol ve karvakrol terpenlerinin ekstraksiyonu amacıyla BSE kullandıkları çalışmada, terpenlerin en yüksek ekstraksiyon veriminin 100°C'de, 15 dakika sürede elde edildiği ve verimin %70-80 arasında olduğu belirtilmiştir [71].

Eikani vd. (2007), Kişniş (*Coriandrum sativum* L.) tohumlarından esansiyel yağların ekstraksiyonu amacıyla BSE, soxhlet aparatında su ile ekstraksiyon ve su destilasyonu işlemlerinin karşılaştırıldığı bir araştırma yapmışlardır. BSE işleminin verimi, soxhlet ve

destilasyon yöntemlerine kıyasla daha düşük olmasına karşın BSE ile daha değerli esansiyel yağların elde edildiği bildirilmiştir [72].

Topçu vd. (2006), yapmış oldukları bir çalışmada, *P. terebinthus* meyvelerinin antioksidan aktivitesini ve antioksidan aktiviteden sorumlu kimyasal yapıları incelemiştir. Ekstraksiyon aseton ve metanol ile soxhlet cihazında gerçekleştirilmiştir. *P. terebinthus* ekstraktlarının toplam fenolik içeriği aseton ekstraktı için 61.05 (μg PEs/mg ekstrakt) iken, metanol ekstraktı için bu değer 122.78 (μg PEs/mg ekstrakt) olarak bulunmuştur. *P. terebinthus* ekstraktlarının toplam flavonoid içeriği ise aseton ekstraktı için 5,49 (μg QEs/mg ekstrakt) iken, metanol ekstraktı için bu değer 122.78 (μg QEs/mg ekstrakt) olarak bulunmuştur. Metanol ekstraktının, aseton ekstraktına kıyasla daha yüksek miktarda fenolik (pirokateşol eşdeğeri) ve flavonoidleri (kuersetin eşdeğeri) içerdiği bulunmuştur. Metanol ekstraktının DPPH radikal süpürücü etkisinin, 50 μg / ml (IC50)'de yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [73].

Ju ve Howard (2005) yapmış oldukları çalışmada, kurutulmuş kırmızı üzüm kabuğundan antosiyaninlerin ve diğer fenolik bileşiklerin BSE, ultrasonik banyoda su ve % 60 metanol çözeltisiyle yaptıkları ekstraksiyon işlemlerini kıyaslamışlardır. Araştırma sonucunda kurutulmuş kırmızı üzüm kabuğundan ve işlenmiş üzümün diğer yan ürünlerinden antosiyaninlerin ve fenolik bileşiklerin 100-110 °C arasındaki sıcaklıklarda BSE ile ekstrakte edilmesi işleminin organik çözücü kullanımına karşı iyi bir alternatif yöntem olduğunu bildirmişlerdir [74].

Ibañez ve ark. (2003), kendi tasarladıkları bir BSE sistemi vasıtasıyla biberiye içerisindeki aktif maddeleri ekstrakte etmek için subkritik suyun seçiciliğini incelemiştir. Bu çalışmada, bazı bileşiklerin nispi miktarları HPLC ile takip edilmiştir. Çalışmaları, antioksidanların ekstraksiyonuna yönelik olarak subkritik suyun seçiciliğinin, ekstraksiyon sıcaklığında küçük değişiklikler göz önüne alınarak kolaylıkla ayarlanabileceğini göstermiştir. Örneğin, düşük sıcaklıkların (50 °C), yüksek derecede polar bileşiklerin ekstraksiyonunda tercih edilmesi gerektiği, 200 °C gibi daha yüksek sıcaklıkların ise daha az polar olan ya da polar olmayan antioksidanlar ekstraksiyonu için tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir [75].

Kubátová vd. (2001) yapmış oldukları çalışmada, kava (*Piper methysticum*) kökünden laktonların BSE'sini, suda kaynatma, soxhlet aparatında suyla yapılan

ekstraksiyon ve ultrasonik banyoda asetonla ekstraksiyon işlemleri ile karşılaştırmıştır. 175 °C sıcaklıkta 20 dk'lık BSE işleminin kava kökünden laktonların elde edilmesi için yeterli olduğu görülmüştür. Verimin soxhlet aparatındaki ekstraksiyon ve suda kaynatma işlemlerinden daha yüksek olduğu, ultrasonik banyoda asetonla yapılan ekstraksiyondan ise daha düşük olduğu bildirilmektedir [54].

Ayala vd. (2001)'nin kekik yağının BSE ve su destilasyonu işlemlerini karşılaştırdıkları çalışmada; BSE işleminin kekik esansiyel yağlarının eldesinde su destilasyonundan daha hızlı, daha ucuz ve daha etkili bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Ayrıca kekik yağında bulunan 11 major bileşiğin 8'inin BSE ile daha yüksek verimde elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır. Söz konusu işlemin gıda endüstrisinde bitkilerin esansiyel yağlarını elde edilmeye büyük ilgi göreceği belirtilmektedir [76].

Jiménez-Carmona vd. (1999), mercanköşk yapraklarından esansiyel yağların ekstraksiyonu üzerine yaptıkları bir çalışmada, BSE ve su destilasyonu işlemlerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak, BSE işlemi ile 15 dk gibi kısa bir sürede daha yüksek miktarda esansiyel yağ elde edilebildiği ve ekstraksiyon veriminin su destilasyonundan 5.5 kat daha fazla olduğu vurgulanmıştır [77].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Menengiç Tohumu

Deneysel çalışmalarda kullanılan menengiç tohumu (*Pistacia terebinthus*) Elazığ Harput bölgesinde yetişen meyvelerin olgunlaşma mevsiminde temin edildi ve Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakóltesi Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda 4 ° C'de kapalı kaplarda muhafaza edildi (şekil 3.1).

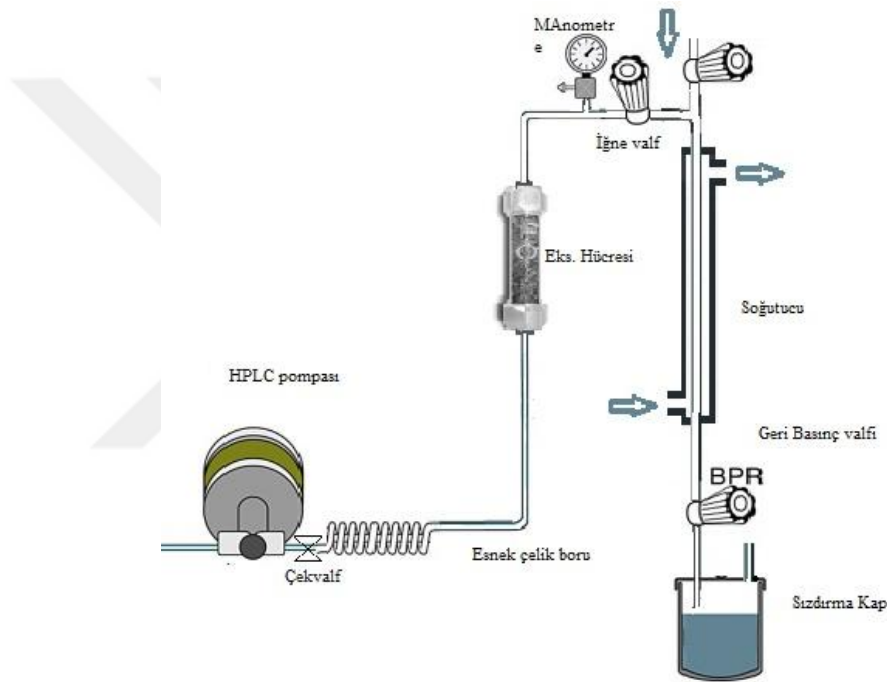


şekil 3.1. Menengiç tohumu (*Pistacia terebinthus* L.)

3.2. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu

Bu çalışmada subkritik su ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi için şekil 3.1'de şematik olarak verilen özel bir ekstraksiyon düzenegi oluşturulmuştur. Bu düzenek, yüksek sıcaklık ve basınçta ekstraksiyonun gerçekleştirilmesini mümkün kılmıştır. Ekstraksiyon sistemi, su rezervuarı, HPLC pompası, ön ısıtıcı sistemi, ekstraksiyon hücresi, soğutma sistemi ve geri basınç regülatöründen oluşmaktadır. Ekstraksiyon prosedürünün ilk adımı, deiyonize suda çözünmüş gazların giderilmesidir. Bu amaçla özellikle oksijenin giderilmesi için 30 dakika ultrasonik banyo (Selecta, Ultrasound H-B) kullanılmıştır. Ardından su, sistemi doldurmak üzere belirli akış hızıyla HPLC pompası ile sisteme pompalanmıştır. Ekstraksiyon hücresi çalışma parametrelerine ulaştığında, su ile numunenin temasını arttırmak için 10 dakikalık statik ekstraksiyon süresi kullanılmıştır. Geri basınç regülatörü, ekstraksiyon hücresinin basıncının düşmesine imkn vermek üzere açılarak ekstraktlar toplama kaplarına alınmıştır. Her deneyden toplanan ekstraktlar, daha sonraki analizlerde (toplam fenolik madde miktarı, toplam flavanoid miktarı ve DPPH radikal süpürücü etki tayini) kullanılmak üzere buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmiştir.

Basınç parametresi yaklaşık 20 bar değerinde her deneyde sabit tutulmuştur. Optimum ekstraksiyon şartlarını belirlemek amacıyla sıcaklık, akış hızı ve katı sıvı oranı değişkenlerinin kompozisyon analizlerine ve antioksidan aktiviteye etkisi deneysel tasarım yöntemleriyle incelenmiştir. Elde edilecek model denklemin farklı bileşenler için çözümü yapılarak istenilen ürün için optimum şartlar belirlenmiştir. Literatürde bitkisel materyallerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için önerilen şartlara uygun olarak 100-200 °C sıcaklık, 0.5-3 mL/dak akış hızı ve ağırlıkça % 5-10 katı sıvı oranı olarak belirlenmiş olup ekstraksiyon süresi her deneyde 90 dakika olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Deneysel çalışma için tasarlanan BSE sistemi

3.2.1. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonunun Optimizasyonuna Yönelik Deneysel Tasarım

İncelenen literatür ışığında basınçlı sıcak su ekstraksiyonu üzerine etkin değişkenlerin neler olduğu ve hangi aralıklarda önemli olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanımı ile etkin parametrelerin değiştirilerek ekstraksiyon üzerindeki etkisi incelenmiştir. CYY, esasen proseslerin optimizasyonunda matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir [78]. CYY'nin çeşitli dizaynları mevcuttur.

En çok kullanılanları Merkezi Kompozit Dizayn (MKD) ve Box-Behnken Dizaynıdır. MKD’da α , -1, 0, +1, $+\alpha$ olarak adlandırılmak suretiyle bir faktörün 5 farklı seviyesi incelenir. 0 merkez nokta yani literatürden ve ön denemelerden yola çıkılarak bulunan optimum deney ortam değerleri iken $-\alpha$ ve $+\alpha$ iki uç değerleri ifade etmektedir. -1 ve +1 noktaları ise düşük ve yüksek seviyeyi ifade eder. Ekstraksiyon deneyleri için etkin olan parametrelerin sonuç değişkeni üzerine etkilerinin ortaya konulması amacıyla yapılacak deneylerin tasarımı Merkez kompozit dizayn (MKD) ile gerçekleştirilmiştir.

Literatür verilerinden yola çıkılarak, basınçlı sıcak su ekstraksiyonunu etkileyen en önemli parametrelerden sıcaklık, akış hızı ve katı sıvı oranı olmak üzere 3 değişkenin etkileri MKD yöntemi ile tasarlanan deneylerle incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak ANOVA ile analiz edilmiştir. Ekstraksiyonu etkilediği düşünülen bağımsız parametreler ve incelenen değer aralıkları Tablo 3.1’de verilmiştir.

MKD ile 3 bağımsız değişken ve 6 kez tekrarlanan merkez noktası ile toplam 20 deney gerçekleştirilmiştir. Değişen parametrelere göre elde edilen toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid miktarı ve DPPH radikal süpürücü etkiyle ölçülen antioksidan aktivite tayini cevap olarak kullanılmıştır. Deneylerin tasarımında ve elde edilen sonuçların analizinde DesignExpert 8.0 yazılımı kullanılmıştır. Varyans analizleri ve değişkenlerin etkileşimli olarak cevap üzerine etkileri üç boyutlu grafikler halinde elde edilmiştir.

Tablo 3.1. Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu için Belirlenen Değişkenler ve MKD ile İncelenen Değer Aralıkları

Faktör	Bağımsız Değişkenler	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A	Sıcaklık (°C)	100	120.27	150	179.73	200
B	Akış Hızı (mL/dk)	0.50	1.01	1.75	2.49	3.00
C	Katı Sıvı Oranı (w/w %)	5.00	6.01	7.5	8.99	10.00

3.3. Kompozisyon Analizleri

Menengiç tohumundan elde edilen ekstraktlar toplam fenolik bileşikler ve toplam flavonoidler bakımından spektrofotometrik olarak incelendi.

3.3.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Bu yöntem, suda ve organik çözücülerde çözünmüş olan fenolik bileşenlerin folin reaktifi ile alkali ortamda oluşturduğu mavi renkli komplekslerin 700-760 nm'deki absorbansının UV-spektrofotometresinde ölçümüne dayanır. Ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivitesi arasında lineer bir ilişkinin olması nedeniyle ekstraktın antioksidan aktivitesi hakkında bilgi verir [79].

- Standart olarak kullanılacak gallik asidin 1 mg/ml'lik konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanır. Bu stok çözeltiden farklı derişimlerde dilüsyonlar hazırlanır.
- Standart gallik asit çözeltisinin farklı konsantrasyonlardaki kalibrasyon eğrisi çizilir. Eğrinin regrasyon eşitliğinden yararlanarak gallik asit eşdeğeri olarak sonuçlar ifade edilir (mg GAE/ml).

Yöntemin uygulanışı:

- ✓ Ekstraktların absorbansı 0.8'i geçmeyecek şekilde uygun oranda saf su ile seyreltilir.
- ✓ Deney tüplerine 100 µl ekstrakt konulur.
- ✓ Üzerine 400 µl saf su eklenir.
- ✓ (1:10) oranında seyreltilen folin reaktifinden 1000 µl eklenerek vortekslenir.
- ✓ 4 dk sonra üzerine %7'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 1000 µl eklenir ve tekrar vortekslenir.
- ✓ Karışım oda sıcaklığında 90 dk inkübe edilir.
- ✓ Kör olarak saf suyun kullanımıyla 725 nm'de absorbans ölçülür ve gallik asit kalibrasyon eğrisiyle karşılaştırılır. Absorbanstaki artış fenolik madde miktarıyla orantılıdır.
- ✓ Sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilir.

3.3.2. Toplam Flavanoid Miktarı Tayini

Menengiç ekstraktının içeriğindeki toplam flavonoit miktar tayini Zhishen ve ark.'nın metoduna göre yapılmıştır [80]. Bu yöntemde ekstraktın toplam flavonoid içeriği, alüminyum klorür ve sodyum nitrit ayıraçları kullanılarak, alkali ortamda renk veren flavonoit-alüminyum kompleksinin meydana gelmesiyle belirlenir.

Yöntemin uygulanışı:

- ✓ Ekstraktların absorbansı 0.8'i geçmeyecek şekilde uygun oranda saf su ile seyreltilir.
- ✓ Seyreltilmiş ekstraktan 1 ml alınır ve içerisinde 4 ml saf su içeren 10 ml'lik deney tüplerine eklenir.
- ✓ Bu karışım üzerine 300 µl %5'lik NaNO₂ çözeltisi eklenir ve vortekslenir.
- ✓ 5 dk sonra 300 µl %10'luk AlCl₃ çözeltisi eklenir.
- ✓ 1 dk sonra 2 ml 1 M NaOH çözeltisi eklenir ve hacimler suyla 10 ml'ye tamamlanır. Karışım vortekslenir.
- ✓ Kör olarak ekstrakt içermeyen reaktif karışımı kullanılarak 510 nm'de absorbans ölçülür.
- ✓ Sonuçlar kuersetin eşdeğeri olarak ifade edilir.

3.4. Antioksidan Aktivite Tayini

3.4.1. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

DPPH* radikali, 517 nm'de maksimum absorbans veren stabil bir radikaldır. DPPH* çözeltisi, antioksidan varlığında pembe/mor rengini kaybeder. Bu da 517 nm'de absorbans değerlerinin azalmasına yol açar. Absorbans değerindeki en hızlı azalma en iyi antioksidan potansiyelin göstergesidir [81].

Yöntemin uygulanışı:

- ✓ 1 mg 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil 50 ml % 70'lik metanol içerisinde çözülerek DPPH radikal çözeltisi hazırlanır.
- ✓ Ekstraktların absorbansı 0.8'i geçmeyecek şekilde uygun oranda saf su ile seyreltilir.
- ✓ 100 µl ekstrakt üzerine 1900 µl DPPH radikal çözeltisinden eklenir.
- ✓ Karışım vortekslenerek karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir.
- ✓ Kör olarak % 70'lik metanol kullanılarak 517 nm'de absorbans ölçülür.
- ✓ Sonuçlar trolox eşdeğeri olarak ifade edilir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Son yıllarda BSE, bitkilerden ve gıda maddelerinden biyoaktif bileşiklerin izolasyonu için yararlı bir seçenek haline gelmiştir. Literatürde menengiç tohumunun basınçlı sıcak su ekstraksiyonu konusunda yapılmış çalışma mevcut olmamakla birlikte, basınçlı sıcak su ekstraksiyonu konusunda da yapılan çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Deneylerimizde kendi tasarladığımız sistemin kullanılması, diğer sistemlerin aksine kontrollü bir şekilde yüksek sıcaklık ve basınçta ekstraksiyonu yönetebilme imkânı tanıdığından çalışmanın önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada tasarladığımız sistem ile basınçlı sıcak su ekstraksiyonunu etkileyen parametrelerin optimizasyonu yapılarak menengiç tohumundaki biyoaktif bileşenleri içeren yüksek kaliteli ekstraktlar elde etmek amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, sıcaklık, akış hızı ve katı-sıvı oranının ekstraktların kompozisyon içeriği ve antioksidan aktivitesi (DPPH serbest radikal süpürücü etki) üzerine etkisi incelenmiştir.

4.1. DeneySEL Tasarım Sonuçları

Materyal ve Metot bölümünde belirtildiği gibi, BSE için etkin parametrelerin birbiri arasındaki ve ekstrakt üzerindeki etkileşimlerini ortaya koymak amacıyla etkili olan parametrelere bağlı bir model eşitliği elde etmek üzere cevap yüzey yöntemi ve merkezi kompozit dizayn kullanılarak deneyler tasarlanmıştır. Bu amaçla Design Expert 8.0 yazılımı kullanılarak tasarlanan deneylerin sonuçları bu bölümde verilecektir.

BSE ile menengiç tohumundan biyoaktif bileşenlerin eldesine yönelik MKD ile oluşturulan yazılımın önerdiği dizayn matrisi, kompozisyon analizleri ve antioksidan aktivite sonuçları Tablo 4.1’de görülmektedir. Etkin parametreler olarak sıcaklık, akış hızı ve katı sıvı oranı belirlenmiş olup, cevap değeri olarak da toplam fenolik madde miktarı, toplam flavanoid miktarı ve DPPH serbest radikal süpürücü etkisi seçilmiştir. Her bir deney 90 dakikalık zamana bağlı olarak yürütülmüştür.

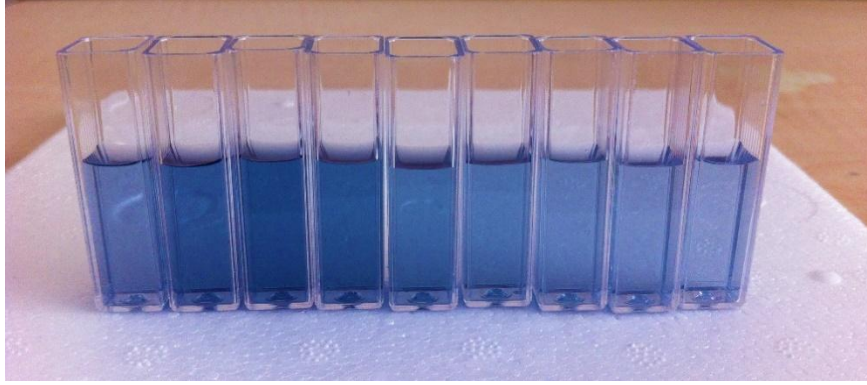
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan Menengiç Tohumunun Kompozisyon Analizleri ve Antioksidan Aktivite Sonuçları

DENEY NO	A: Sıcaklık (°C)	B: Akış Hızı (ml/dk)	C: Katı Sıvı Oranı (%)	Toplam Fenolik (mgGA/g katı)	Toplam Flavanoid (mg QE/g katıl)	DPPH (μmol Trolox/g katı)
1	120.27	1.01	6.01	4,483	12,891	37,139
2	179.73	1.01	6.01	5,568	16,442	44,577
3	120.27	2.49	6.01	9,443	45,195	54,057
4	179.73	2.49	6.01	9,420	60,770	60,770
5	120.27	1.01	8.99	6,058	30,582	45,895
6	179.73	1.01	8.99	5,729	32,551	51,806
7	120.27	2.49	8.99	12,805	47,858	88,319
8	179.73	2.49	8.99	9,583	62,766	93,422
9	100	1.75	7.50	8,125	27,769	32,919
10	200	1.75	7.50	8,570	54,282	45,854
11	150	0.50	7.50	2,252	10,514	25,146
12	150	3.00	7.50	11,956	67,803	81,079
13	150	1.75	5.00	8,360	43,186	34,436
14	150	1.75	10.00	10,417	52,434	60,891
15	150	1.75	7.50	7,503	49,318	89,931
16	150	1.75	7.50	7,939	47,258	85,551
17	150	1.75	7.50	7,972	48,558	92,909
18	150	1.75	7.50	8,326	49,477	91,973
19	150	1.75	7.50	8,027	51,926	89,535
20	150	1.75	7.50	8,570	52,611	85,880

4.2. Kompozisyon Analizleri

4.2.1. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Ekstraktların toplam fenol miktarı deneysel kısımda verilen yöntem kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1). Toplam fenol miktarı gallik aside eşdeğer olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. Menengiç ekstraktının toplam fenolik madde analizi

Deneysel matrise uygun olarak gerçekleştirilen deney sonuçları, program yardımıyla çeşitli matematiksel modellere uygulanmış olup, en uygun modelin ikinci derece (quadratic) model olduğu belirlenmiştir. İkinci derece kuadratik denklemi değişkenlerin gerçek değerleri cinsinden Eşitlik 4.1’de verilmiştir. Ortaya konulan ikinci derece modele ait uygunluğun testi için kullanılan istatistik verileri ve ANOVA verileri sırasıyla Tablo 4.2 ve 4.3’te görülmektedir. Yüksek regresyon katsayısı (0.97) bağımsız değişkenlerin incelenen aralığında toplam fenolik madde miktarında meydana gelen değişimin %97’sinin incelenen değişkenler tarafından açıklanabildiğini göstermektedir. Önerilen modelin uygunluğunun tartışılması için daha uygun bir istatistiksel değer olan önemli terimlerin etkilerinin elimine edildiği uyarlanmış regresyon katsayısı (adj R²) değeri 0,95 olarak belirlenmiştir. Değerlerinin ortalamasına göre oldukça düşük standart hata ve 4’den daha büyük varyans katsayısı değeri önerilen model denklemin deneysel çalışmayı tanımlamada yeterli olduğunu göstermektedir.

$$\begin{aligned} \text{Toplam Fenolik (mg GA/ ml ekstrakt)} = & -10,733 + 0,127x_A + 8,073x_B - 0,582x_C \\ & - 0,023x_Ax_B - 0,013x_Ax_C + 0,203x_Bx_C \\ & + 1,926 \times 10^{-5}x_A^2 - 0,765x_B^2 + 0,174x_C^2 \end{aligned} \quad (4.1)$$

Tablo 4.3’de verilen ANOVA verilerinden elde edilen Fisher-F test değeri (41,303) ve Prob>F değerinin 0,05’den küçük oluşu, önerilen modelin önemli olduğunu belirtmektedir. Ayrıca Tablo 4.3’te yer alan ANOVA sonuçlarında Prob>F değeri 0,05’den küçük olan terimlerin önemli model terimleri olarak kabul edildiği, bu değerin 0,1’den büyük olanları ise model için önemsiz olduğu bilinmektedir. İncelenen bağımsız değişkenlerden akış hızı

ve katı-sıvı oranının hem lineer hem de üssel terimleri toplam fenolik madde konsatrasyonu için önemlidir. Bu değişkenlerde meydana gelecek değişimler sonuç değişkenini önemli oranda değiştirecektir. İncelenen aralıkta (100- 200 ° C) tek başına önemli bir etkiye sahip olmadığı görünen sıcaklığın hem sıvı akış hızının hem de katı-sıvı oranının optimum değerini etkilediği etkileşim terimlerinin önemli olduğundan görülmektedir.

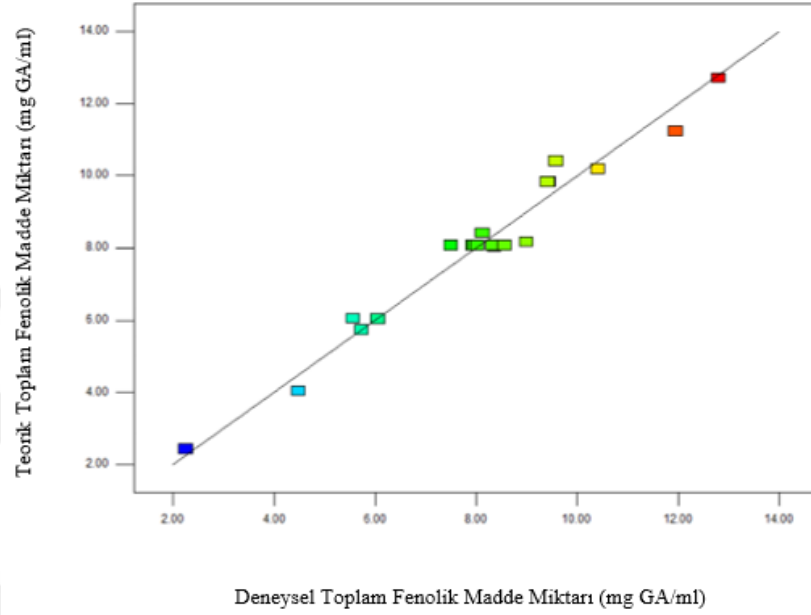
Tablo 4.2. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Fenolik Bileşiklerin Eldesi için Önerilen İkinci Derece Modele ait İstatistikler

Standart sapma	0,543	R²	0,974
Ortalama	8,055	Adj. R²	0,950
Varyans Katsayısı (C.V.)	6,740	Pred. R²	0,832

Tablo 4.3. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Fenolik Bileşiklerin Eldesi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	P değeri Prob> F
Model	109,581	12,176	41,303	< 0.0001
A: Sıcaklık (°C)	0,222	0,222	0,753	0.4060
B: Akış hızı (ml/dk)	93,498	93,498	317,173	< 0.0001
C: Katı-sıvı oranı (%)	5,566	5,566	18,880	0.0015
AB	2,000	2,000	6,785	0.0263
AC	2,659	2,659	9,021	0.0133
BC	0,401	0,401	1,359	0.2708
A ²	0,004	0,004	0,014	0.9076
B ²	2,574	2,574	8,732	0.0144
C ²	2,138	2,138	7,251	0.0226

MKD dizayn matrisinde yer alan deneylerden elde edilen sonuçlar ile model eşitliğinden hesaplanan değerler arasındaki uyum Şekil 4.2’de görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi deneysel sonuçlarla model eşitliğinden hesaplanan değerler arasında oldukça iyi bir yaklaşım olduğu söylenebilir.



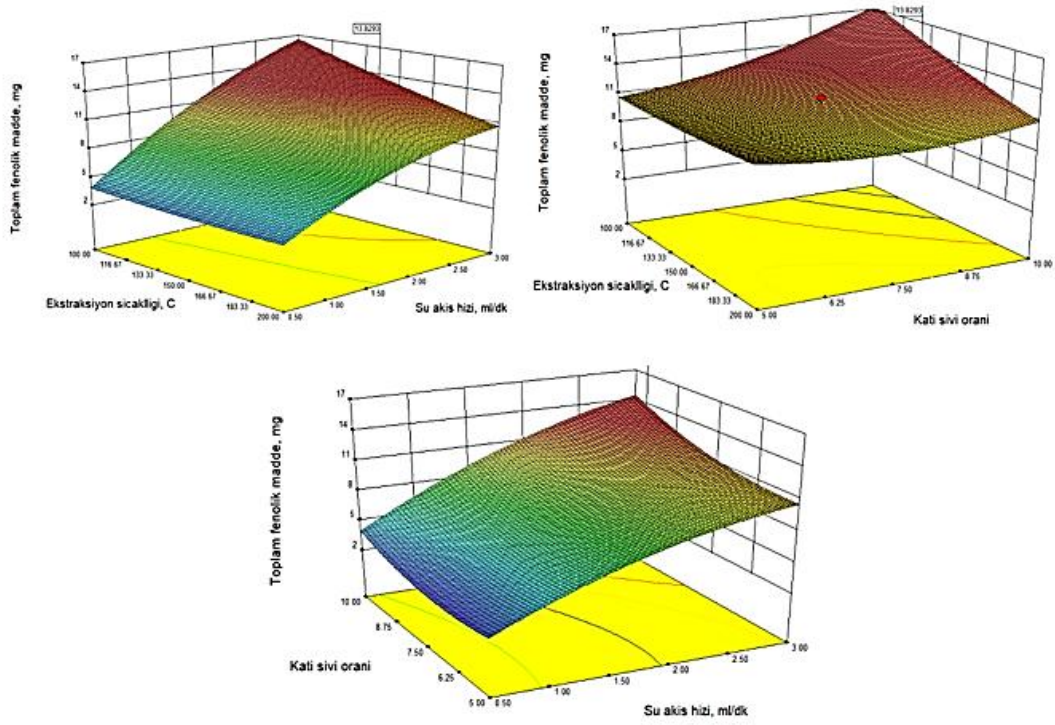
Şekil 4.2. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu toplam feneolik madde deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum

BSE ile menengiç tohumlarından toplam fenolik madde ekstraksiyonunun incelendiği deneylerde bağımsız değişkenlerin sonuç üzerine ikili etkileşimleri Şekil 4.2’de üç boyutlu grafiklerde görülmektedir. Dolgulu bir ekstraksiyon hücresinin içerisinde geçen yüksek sıcaklıktaki basınçlı suyun akış hızı ile kolon yüzey sıcaklığı arasındaki ilişkinin önemli olduğu ANOVA tablosundan da belirlenmişti. Grafikten de görüldüğü gibi su akış hızının düşük olduğu bölgelerde sıcaklığın etkisi olmadığı görülmekteyken yüksek akış hızlarında hücre sıcaklığının etkisi önemlidir. Bu durum yüksek akış hızlarında azalan alıkonma süresiyle sıcaklık duyarlılığı fazla olan fenolik bileşenlerin bozunmadan çıkmasının yanında daha fazla taze çözücü ile karşılaşan katı ortamdan toplam ekstrakt miktarının artması sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir. Şekil 4.3.a’da görüldüğü gibi hem sıcaklığın hem de akış hızının üst noktada olduğu şartlarda ekstraksiyonu miktarının fazlalaştığı görülmektedir. Katı sıvı oranındaki değişimin sonuç üzerine etkisinin diğer iki değişkene

göre daha sınırlı olduğu grafiklerden görülmektedir. Ancak deneysel çalışmada literatürde belirlenen 90 dakikalık ekstraksiyon süresinin sabit tutulduğu ve artan katı-sıvı oranındaki değişime göre incelenmediği için buradaki değişim kısmen perdelenmiştir. Ekstraksiyon işlemi süresi belirli bir denge değerine ulaşmaya sürüdürülmediğinden bu etki tam olarak modelde ortaya konulamamıştır. Şekil 4.3.c’de akış hızının artmasıyla artan toplam fenolik madde ekstraksiyonunda artış tüm katı sıvı oranlarında görülmektedir.

Deney sonuçlarına bakıldığında maksimum toplam fenolik madde miktarının gözlemlendiği şartların, düşük sıcaklıklarda ve yüksek akış hızlarında elde edildiği görülmektedir. Bu durum literatürde bahsedildiği üzere, fenolik bileşikler gibi ısıya duyarlı biyoaktif bileşenlerin sıcaklıkla birlikte bozunuma uğramasıyla ilişkilendirilmiştir.

Ferna’ndez-Ponce vd. (2012)’nin mango yapraklarıyla yaptıkları çalışmada, mango yapraklarındaki fenolik bileşiklerin miktarı, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve BSE ile kıyaslanarak tayin edilmiştir. Optimum değerler BSE ile 4 MPa, 100 °C koşullarında elde edilmiştir [65]. Ju ve Howard (2005)’in yapmış olduğu çalışmada ise, kurutulmuş kırmızı üzüm kabuğundan antosiyaninlerin ve diğer fenolik bileşiklerin BSE optimum olarak 100-110 °C arasındaki sıcaklıklarda elde edilmiştir [74]. Çalışmamızdan elde edilen bulgular bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Khuwijiitjaru vd. (2012)’nin kabuk tarçın ile 3 mL/dk akış hızı, 6 MPa basınç ve 200 °C sıcaklık şartlarındaki BSE çalışmasına göre ise elde ettiğimiz optimum sıcaklık değeri (100°C) daha düşük olmuştur [82].



Şekil 4.3. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Toplam Fenolik Madde Miktarı deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) Sıcaklık-Akış hızı, (b) Sıcaklık-Katı sıvı oranı, (c) Katı sıvı oranı-Akış hızı.

4.2.2. Toplam Flavonoid Miktarı

Ekstraktların toplam flavonoit miktarı deneysel kısımda verilen yöntem kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4). Toplam flavonoit miktarı kuersetin eşdeğeri olarak hesaplanmıştır.



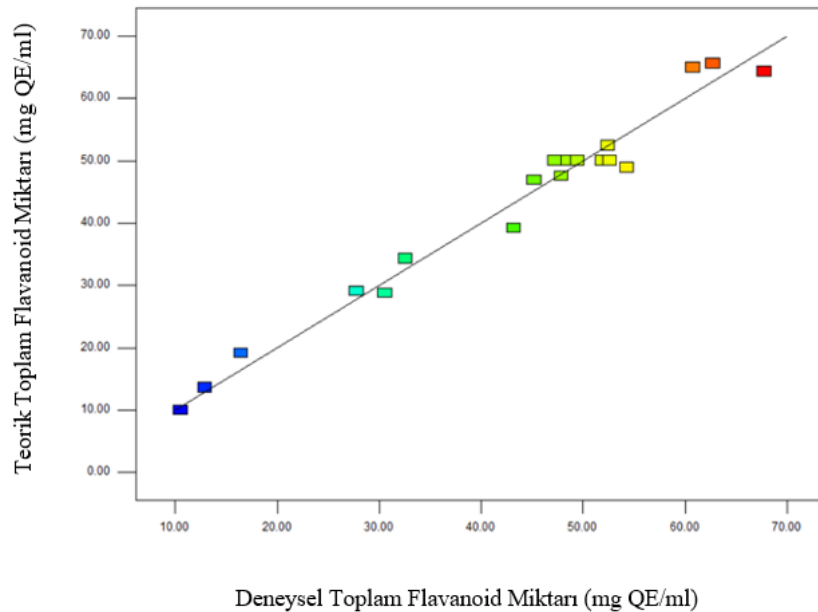
Şekil 4.4. Menengiç ekstraktının toplam flavonoid madde analizi

Menengiç tohumundan BSE sistemi kullanılarak toplam flavonoid ekstraksiyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aynı tasarım ve deneysel çalışmalar kullanılarak sıcaklık, akış hızı ve katı sıvı oranı bağımsız değişkenleri için elde edilen deneysel sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir. Toplam flavonoid miktarının cevap değişkeni olarak seçildiği deneyler, toplam fenolik madde miktarı deneylerine benzer olarak 90 dakika süreyle yapılmış olup 10’ar dakikada alınan örneklerden maksimum konsantrasyon değerlerinin elde edildiği numune baz alınmıştır.

Elde edilen deney sonuçları, yazılım yardımıyla çeşitli matematiksel modellere uygulanmış olup, en uygun modelin ikinci derece model olduğu belirlenmiştir. Gerçek değerler cinsinden önerilen matematiksel model ifade aşağıda verilmiştir.

$$\begin{aligned} \text{Toplam Flavonoid (mg QE/ml ekstrakt)} = & -205,705 + 1,269 \times A + 54,041 \times B + 18,496 \times C \\ & + 0,141 \times A \times B - 3,297 \times B \times C \\ & - 0,004 \times A^2 - 8,221 \times B^2 - 0,671 \times C^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

Ortaya konulan ikinci derece modele ait uygunluğun testi için kullanılan istatistik verileri Tablo 4.4’de görülmektedir. İstatiksel verilerden görülen yüksek model uyumu MKD dizayn matrisinde yer alan deneylerden elde edilen sonuçlar ile model eşitliğinden hesaplanan değerler arasındaki uyum Şekil 4.5’den de görülmektedir



Şekil 4.5. Menengiç tohumundan BSE ile toplam flavonoid madde miktarı deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum

Tablo 4.5’da verilen ANOVA verilerinden incelenen üç bağımsız değişkenin lineer etkileri flavonoid miktarını değiştirmektedir. Ancak ekstraksiyon hücre sıcaklığı ve suyun akış sıcaklığı takip edilen maksimum flavonoid miktarını üssel olarak ta etkilemektedir. Bu iki değişkende meydana gelecek küçük değişimler flavonoid miktarında önemli değişime neden olacak anahtar değişkenlerdir. Ayrıca bu iki değişkenin birbiri üzerine etkileri de sonuç değişkenin açısından önemli olduğu ANOVA sonuçlarından görülmektedir.

Tablo 4.4. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Flavonoidlerin Eldesi için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler

Standart sapma	3,335	R²	0,98
Ortalama	43,210	Adj. R²	0,96
Varyans (C.V.)	7,718	Pred. R²	0,88

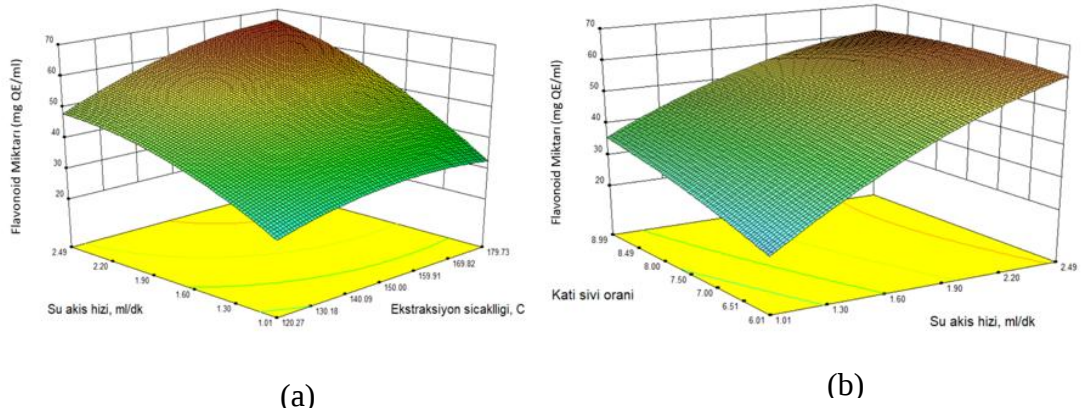
Tablo 4.5. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Flavonoidlerin Eldesi için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	P değeri Prob> F
Model	4908,70	613,59	55,17	< 0.0001
B Akış hızı (ml/dk)	475,59	475,59	42,76	< 0.0001
C Katı-sıvı oranı (%)	3559,24	3559,24	320,03	< 0.0001
A Sıcaklık (°C)	213,62	213,62	19,21	0.0011
AB	77,89	77,89	7,00	0.0227
BC	106,15	106,15	9,54	0.0103
A ²	217,13	217,13	19,52	0.0010
B ²	297,26	297,26	26,73	0.0003
C ²	31,69	31,69	2,85	0.1195

BSE ile toplam flavonoid madde miktarı ekstraksiyonu üzerine etkili olan parametrelerin etkileşim grafikleri de Şekil 4.6’de görülmektedir. Düşük su akış hızında flavonoid miktarında önemli bir değişim gözlenmezken su akış hızındaki artışla maksimum flavonoidlerin elde edildiği konsantrasyon değeri artmaktadır. Maksimum flavonoid miktarı hem su akış hızının hem de ekstraksiyon sıcaklığının üst bölgelerinde artmaktadır. Katı sıvı oranı ile ekstraksiyon sıcaklığı arasındaki etkileşimin önemli olduğu Şekil 4.6.b’den

görülmektedir. Su akış hızının düşük olduğu noktalarda katı sıvı oranındaki artış ile flavonoid miktarında artış gözlenirken yüksek akış hızlarında net bir eğilim gözlenmemektedir. Bu durum nispeten daha yüksek sıcaklıklarda flavonoidlerin ekstraksiyonun gerçekleştiği ve sonuç olarak yüksek katı ve yüksek akış hızında bu sıcaklığa hücrenin ulaşamamasından olabilir.

Ko vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada, sekiz farklı bitkiden flavonoid elde etmek amacıyla basınçlı su ekstraksiyonu için zaman ve sıcaklık gibi koşulları ve bunların flavonoidlerin kimyasal yapısıyla olan ilişkisini incelemişlerdir. Bir OH yan zincirine sahip olan flavonoidler 170 °C / 10 dk'da (kuersetin), O-CH₃ yan zincirine sahip flavonoidler 190 °C/15 dk'da (izorhamnetin) ve H yan zincirine sahip flavonoidler ise 190 °C/15 dk'da (kaempferol) ekstrakte edilmiştir. Quercitrin (110 ° C / 5dk), spiraeosid (150 ° C / 15dk) ve isoquercitrin (150 ° C / 15dk) gibi şeker içeren glikozit formların optimum sıcaklıkları, daha az polar olan flavonoidlere göre daha düşük olmuştur. Çift bağlara sahip bir flavonoid olan apigenin ise daha yüksek bir sıcaklıkta (190 °C /15 dakika) ekstre edilmiştir [83]. Çalışmamızdan elde edilen verilerin bu çalışmayla uyumlu olduğu, flavonoidlerin bağ yapısına bağlı olarak yüksek sıcaklıklarda (193 °C) optimum miktara ulaşıldığı görülmektedir.

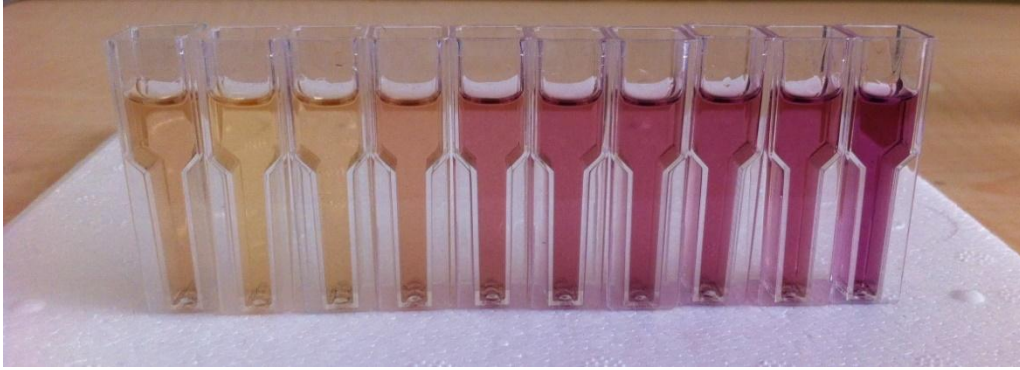


Şekil 4.6. Menengiç tohumundan BSE ile toplam flavonoid madde miktarı deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) Sıcaklık-Akış hızı, (b) Katı sıvı oranı-Akış hızı.

4.3. Antioksidan Aktivite Tayini

4.3.1. DPPH Serbest Radikal Süpürücü Etki

Vücuttan zararlı ve hastalık yapıcı radikallerin uzaklaştırılması oldukça önemlidir. Bu amaçla azot merkezli stabil bir radikal olan DPPH radikali kullanılmıştır. Bu pembe/mor renkli radikal, antioksidan madde varlığında süpürülerek sarı renge dönüşür, düşen absorbans değeri yüksek antioksidan aktiviteye işaret eder. Ekstraktların DPPH radikalini süpürücü etkisi, deneysel kısımda verilen yöntem kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve troloks eşdeğeri olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.7).



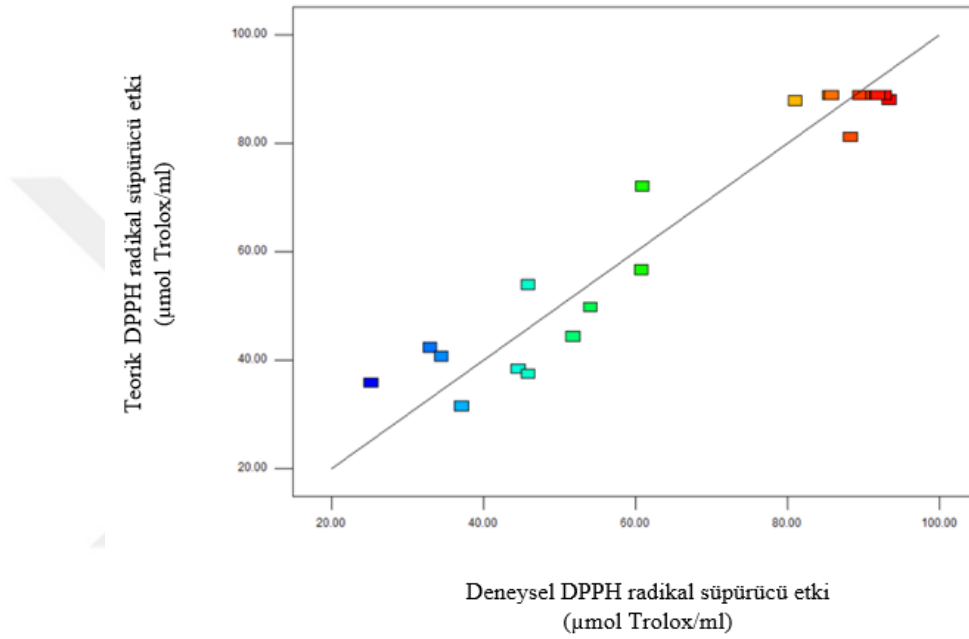
Şekil 4.7. Menengiç ekstraktının DPPH ile reaksiyonu

Menengiç tohumu ekstraktının antioksidan aktivite miktarının belirlemek amacıyla aynı deneysel tasarım kullanılmıştır. Sıcaklık, akış hızı ve katı sıvı oranı bağımsız değişkenlerine karşı troloks eşdeğeri antioksidan kapasite cevap değişkeni olarak seçilmiştir. Dizayn matrisi ve DPPH sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Elde edilen deney sonuçları, yazılım yardımıyla çeşitli matematiksel modellere uygulanmış olup, en uygun modelin ikinci derece model olduğu önerilmiştir. Önemsiz etkileşim terimlerinin elimine edildiği indirgenmiş ikinci derece model ifade gerçek değişkenler cinsinden aşağıda verilmiştir;

$$\begin{aligned} \text{DPPH } (\mu\text{mol Trolox/ ml ekstrakt}) = & -648,202 + 5,005 \times A + 38,111 \times B \\ & + 74,108 \times C + 5,762 \times B \times C \\ & - 0,016 \times A^2 - 17,290 \times B^2 - 5,194 \times C^2 \end{aligned} \quad (4.3)$$

Önerilen konulan ikinci derece modele ait uygunluğun testi için kullanılan istatistik verileri ve ANOVA verileri sırasıyla Tablo 4.6 ve 4.7’de görülmektedir. Tablo 4.6’da verilen istatistik verilerinden model uygunluğunun yeterli olduğu görülmektedir. Model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyumu gösteren Şekil 4.8’te deneysel verilerin diagonal etrafında toplandığı görülmektedir. Tablo 4.7’de verilen ANOVA sonuçlarından elde edilen Fisher-F test değeri (20,82) ve Prob>F değerinin 0,05’den küçük oluşu, önerilen modelin önemli olduğunu belirtmektedir.



Şekil 4.8. Menengiç tohumundan elde edilen ekstraktın antioksidan aktivite (DPPH) deneyleri için elde edilen model eşitliği ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum

Tablo 4.6. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Antioksidan Aktivite için Önerilen İkinci Derece Modele Ait İstatistikler

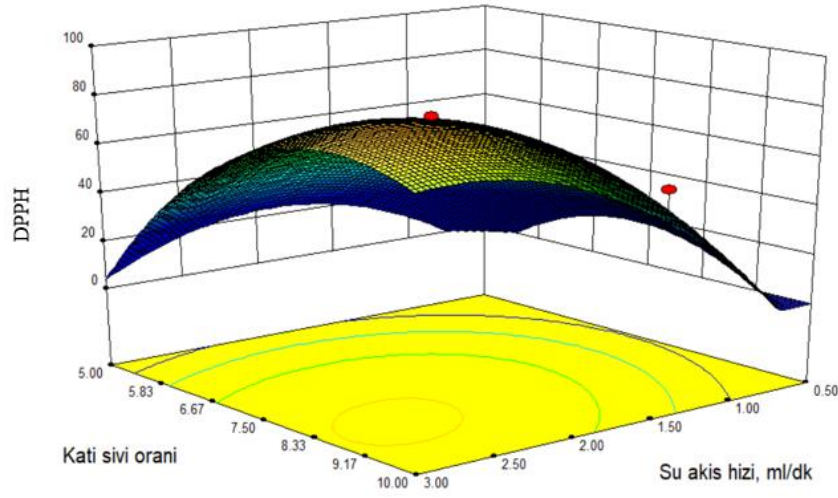
Standart sapma	8,350	R²	0,924
Ortalama	64,604	Adj. R²	0,880
Varyans Katsayısı (C.V.)	12,925	Pred. R²	0,630

Tablo 4.7. Menengiç Tohumundan Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyonu ile Antioksidan Aktivite için MKD ile Elde Edilen İkinci Derece Denklemin ANOVA Sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri	P değeri Prob> F
Model	10163,66	1451,95	20,82	< 0.0001
B Akış hızı (ml/dk)	161,19	161,19	2,31	0.1543
C Katı-sıvı oranı (%)	3266,71	3266,71	46,85	< 0.0001
A Sıcaklık (°C)	1188,26	1188,26	17,04	0.0014
BC	324,21	324,21	4,65	0.0521
A ²	2990,19	2990,19	42,88	< 0.0001
B ²	1314,81	1314,81	18,86	0.0010
C ²	1898,66	1898,66	27,23	0.0002

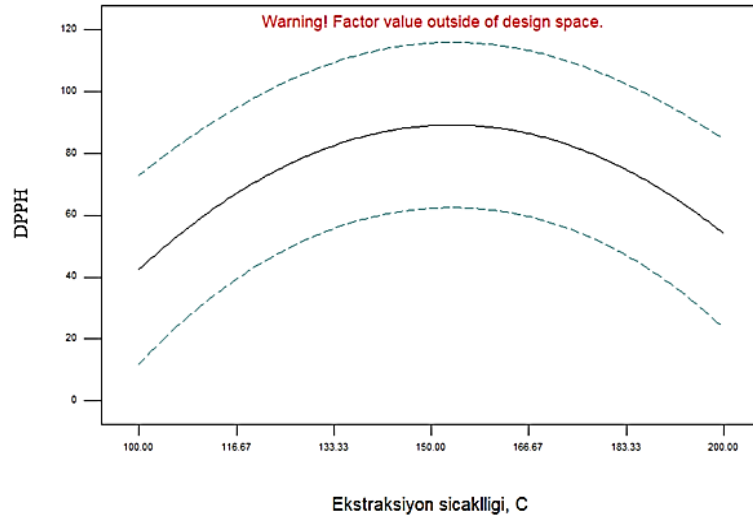
Antioksidan madde ekstraksiyonu üzerine etkili olan bağımsız değişkenlerin birlikte etkisi Şekil 4.9'da görülmektedir. Su akış hızının ve katı/sıvı oranının düşük olduğu noktalarda antioksidan etkiye sahip madde ekstraksiyonunun oldukça az olduğu görülmektedir. Her iki bağımsız değişken değerindeki artışla ekstraksiyon miktarının arttığı katı sıvı oranının 8-9 ve basınçlı sıcak su debisinin 2.5-3 ml/dk olduğu bölgede maksimum olduğu görülmektedir. Daha üst değerlerde seçilen cevap değişkeni ve deney şartlarında ekstraktaki antioksidan etkiye sahip bileşen miktarında azalma gözlenmiştir.

Plaza vd. (2010)'nin yapmış olduğu çalışmada, BSE ile farklı doğal ürünlerden 200 °C 'de elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi, 100 °C'de ekstrakte edilenlerden belirgin derecede daha yüksek olarak elde edilmiştir [43]. Roudsari vd. (2009)'nin yapmış oldukları çalışmada ise, kanola küspesinin antioksidan kapasitesi için en yüksek ekstraksiyon veriminin 160 °C'de elde edildiği bildirilmiştir [70]. Ibañez ve ark. (2003)'nin basınçlı sıcak suyun seçiciliğini inceledikleri bir çalışmada ise, antioksidanların ekstraksiyonuna yönelik olarak seçiciliğin, ekstraksiyon sıcaklığındaki küçük değişikliklerle kolaylıkla ayarlanabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, düşük sıcaklıkların (50 °C), yüksek derecede polar bileşiklerin ekstraksiyonunda tercih edilmesi gerektiği, 200 °C gibi daha yüksek sıcaklıkların ise daha az polar olan ya da polar olmayan antioksidanlar ekstraksiyonu için tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir [75]. Bu sonuçlar ışığında menengiç ekstraktının orta derecede polar antioksidanlar içerdiği, bu nedenle de orta sıcaklıklarda (150 °C) optimum olarak elde edildiği ve bu çalışmalarla uyumlu olduğu sonucuna varılabilir.



Şekil 4.9. Menengiç tohumundan elde edilen ekstraktın antioksidan aktivite (DPPH) deneyleri için elde edilen etkileşim grafikleri: (a) Katı sıvı oranı-Akış hızı.

Bu bağımsız değişkenlerin sonuç üzerine etkisinin tam olarak incelenebilmesi için tek değişkenli grafikler Şekil 4.10'de verilmiştir. Bu grafikten ekstraksiyon sıcaklığının 150 °C'de maksimum antioksidan madde eldesi için uygun olduğu görülmektedir. Diğer iki bağımsız değişken bu grafikte optimum değerlerde tutulmuştur.



Şekil 4.10. Menengiç tohumundan elde edilen ekstraktın antioksidan aktivite (DPPH) deneylerinin ekstraksiyon sıcaklığı için tek faktör grafiği

4.4. Model Optimizasyonu ve Doğrulama Sonuçları

Deneysel matrise uygun olarak gerçekleştirilen deney sonuçları istatistiksel olarak incelenmiş ve ANOVA sonuçları irdelenmiştir. Önerilen matematiksel model denklemler Design Expert 8.0 yazılımı yardımıyla sayısal optimizasyon yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.8’de üç sonuç değişkenini maksimum yapacak bağımsız değişkenlerin incelenen aralıktaki değerleri ve bu noktada elde edilen deney sonuçları verilmiştir. Ayrıca tabloda deneysel sonuçlar ile modelin önerdiği maksimum değer arasındaki % hata verilmiştir.

Tablo 4.8. Deneysel Tasarım Doğrulama Sonuçları

DOĞRULAMA DENEYLERİ	Sıcaklık (°C)	Akış Hızı (ml/dk)	Katı Sıvı Oranı (%)	Konsantrasyon (g katı madde başına)		Hata %
				Önerilen	Deneysel	
Toplam Fenolik (mg GA/ml)	100	3	10	17,37	15,297	13,5
Toplam Flavanoid (µg Quercetin/ml)	193	3	6.21	73,07	78,803	7,3
DPPH (µmol Trolox/ml)	150	2.52	8.53	100,29	97,559	2,8

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu yöntemiyle menengiç tohumlarından biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon şartlarının incelendiği deneysel çalışmada aşağıdaki sonuçlar çıkarılmıştır.

1. Toplam fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda önerilen kuadratik modelin yüksek istatistiksel uyuma sahip olduğu görülmüştür. Toplam fenolik bileşenlerin enyüksek değeri sıcaklığın minimum olduğu bölgede elde edilmiştir. İncelenen aralığın dışında daha düşük bir sıcaklıkta toplam fenolik madde miktarında artışın olacağı model tarafından önerilmektedir. Yüksek sıcaklıkta fenolik yapının bozunduğu görülmekte ve literatürle uyum içinde olduğu görülmektedir. Oluşturulacak yeni bir tasarımla daha düşük sıcaklıklar ve daha yüksek akış hızlarında gerçek bir optimizasyon yapılabilecektir.
2. Toplam flavonoid maddeler için elde edilen model ifade toplam fenoliklerde olduğu gibi oldukça yüksek bir istatistiksel uyum göstermiştir. Toplam flavonoid maddeler toplam fenolik maddelerin aksine incelenen en üst sıcaklık noktasında maksimum değer vermiştir. Toplam fenoliklere benzer olarak gerçek optimum nokta incelenen aralık dışında olmuştur ancak toplam fenoliklerin aksine bu üst sıcaklık bölgesinin dışında gerçekleşmiştir. Daha geniş bir sıcaklık aralığında oluşturulacak yeni tasarımda akış hızının artırılmasının gerekliliği bu tasarım sonuçlarından da belirlenmiştir.
3. Antioksidan etkiye sahip bileşenler DPPH yöntemiyle takip edilmiştir. Menengiç tohumundan antioksidan etkiye sahip maddelerin ekstraksiyon şartlarının incelendiği deney sonucunda elde edilen model ifade için tanımlayıcı istatistikleri diğer iki sonuç parametresine göre daha düşük olmakla birlikte oldukça yüksek değerlere sahiptir. Antioksidan etkiye sahip maddelerin maksimum ekstraksiyonu sıcaklığın merkez noktasında elde edilmiştir.
4. Model ifadelerin optimizasyonu sonucunda elde edilen noktalarda doğrulama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Modelin önerdiği sonuçlar ile deneysel sonuçlar arasındaki uyum üç sonuç içinde oldukça yüksek(%87 - %97) bulunmuştur.
5. Basınçlı sıcak su sistemiyle ekstraksiyon işleminde takip edilen üç biyoaktif bileşen için en uygun sıcaklık değerleri oldukça değişkenlik göstermiştir.

Sıcaklıktaki değişimlerin akış hızıyla ilişkili olduğu daha geniş bir sıcaklık aralığı ve daha yüksek akış hızıyla oluşturulacak yeni modelle gerçek optimum değerler bulunabilir.

6. Basınçlı sıcak su sistemiyle farklı biyoaktif bileşenlerin eldesinin optimum değerlerinin farklı olduğu görölmüştür.



KAYNAKLAR

1. **Harborne, J.** 1982. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press: London, 278, 388-91.
2. **Clark, A.M.** 1996. Natural products as a resource for new drugs, *Pharmaceutical Research*, 8, 1133-1144. doi: 10.1023/A:1016091631721
3. **Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E.** 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. *J Pharm Biomed Anal*, 41, 1560-1565.
4. **Ibañez, E., Castro-Puyana, M., Herrero, M.** 2013. Subcritical water extraction. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. 534-560.
5. **Santos-Buelga, C., Williamson, G.** 2003. Polyphenol Extraction From Foods. *Royal Society of Chemistry*. 1–12.
6. **Riley, P.A.** 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and effects of ionizing radiation. 65:27–33.
7. **Cadenas, E.** 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochemistry*. 58:79–110.
8. **Cadenas, E., Davies, K. J. A.** 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad. Biol. Med.* 29:222–30.
9. **Gupta, M., Dobashi, K., Greene, J.K.** . 1997. Studies on hepatic injury and antioxidant enzyme activities in rat sub-cellular organelles following in vivo ischemia and reperfusion. *Mol. Cell Biochem.* 176:337–47.
10. **Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J.** 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter.* 160:1–40.
11. **Shi, H., Hudson, L. G., Liu, K. J.** 2004. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. *Free Rad Biol Med.* 37:582–93.
12. **Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F.** 2004. Oxidative stress and cell signaling. *Curr Med Chem.* 2004, s. 11:1163–1182.
13. **Halliwell, B.** 1996. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr.* 16:33–50.
14. **Halliwell, B.** 2001. Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo. *Handbook of Antioxidants*.1-45.
15. **Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D.** 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4113-4117.
16. **Jang, I.C., Jo E.K., Bae M.S., Lee H.J., Jeon, G.I., Park, E.** 2010. Antioxidant and antigenotoxic activities of different parts of persimmon (*Diospyros kaki* cv. Fuyu) fruit. *Journal of Medicinal Plants Research*. 4 (2), 155-160.
17. **Oliveira, A.C., Valentim, I.B., Silva, C.A., Bechara, E.J.H., Barros M.P.** 2009. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*. 115 (2), 469-475.

18. **Özkaya, A.** 2007. Oksidatif strese maruz kalan ratların bazı biyokimyasal parametrelerine hesperetin ve ellagik asidin etkisi, Doktora tezi, Fırat Üniversitesi.
19. **Alves, A.F., Zervoudakis, J.T., Hatamoto-Zervoudakis, L.K., Cabral, L.S., Leonel, F.P., Paula, N.F.** 2010. Replacing soybean meal with high energy cottonseed meal in diets for dairy yielding cows: Intake, nutrient digestibility, nitrogen efficiency and milk yield. *R. Bras. Zootec.* 39: 532–540.
20. **Haslam, E.** 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products.* 59 (2), 205-215.
21. **Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M.** 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 47, 3954–3962.
22. **Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo A.A., Capasso, F.** 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences.* 65 (4): 337-53.
23. **Montoro, P., Braca, A., Pizza, C., Tommasi, N.** 2005. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. *Food Chemistry.* 92 (2): 349-355.
24. **van Acker, S.A., van den Berg D.J., Tromp, M.N., Griffioen, D.H., van Bennekom W.P., van der Vijgh W.J., Bast A.S.** 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine.* 20 (3): 331-432.
25. **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M.** 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology.* 46 (2): 446-475.
26. **Kaufmann, B.A., Christen, P.** 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem. Anal.* 13: 105-113.
27. **Hemwimon, S., Pavasant, P., Shotipruk, A.** 2007. Microwave assisted extraction of antioxidative arthaquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Sep. Purif. Technol.* 54: 44-50.
28. **Camel, V.** 2001. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *The Royal Soc. Chem. Analyst.* 126:1182-1193.
29. **Dobiáš, P., Pavlíková, P., Adam, M., Eisner, A., Beňová, B., Ventura, K.** 2010. Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity. *Cent. Eur. J. Chem.* 8, 87-95.
30. **Ishtiaq, F., Farooq, R., Siddique, M., Shah, H., Hassan, M.U., Shaheen, M.A.** 2009. Application of ultrasound in pharmaceuticals world. *Appl. Sci. J.* 6: 886-893.
31. **Jadhav, D., Rekha, B.N., Gogate, P.R., Rathod, V.K.** 2009. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound assisted extraction. *J. Food Eng.* 93: 421–426.
32. **Handa, S.S., Khanuja, S.P., Longo, G., Rakesh, D.** 2008. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trieste: ICS UNIDO.

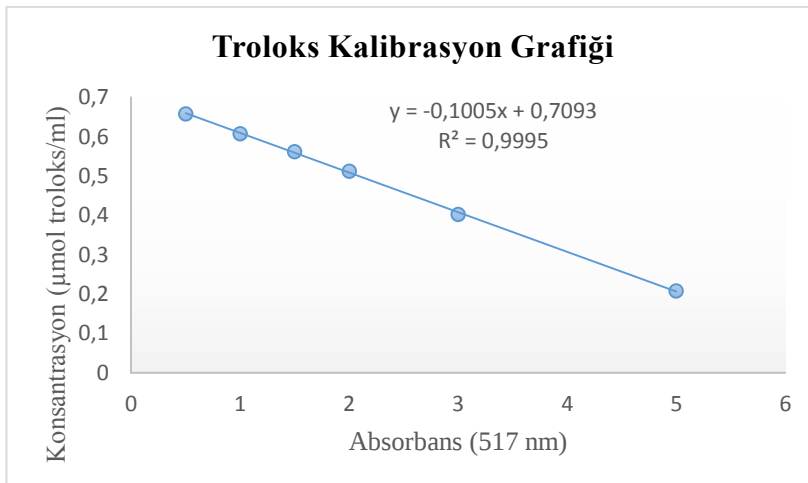
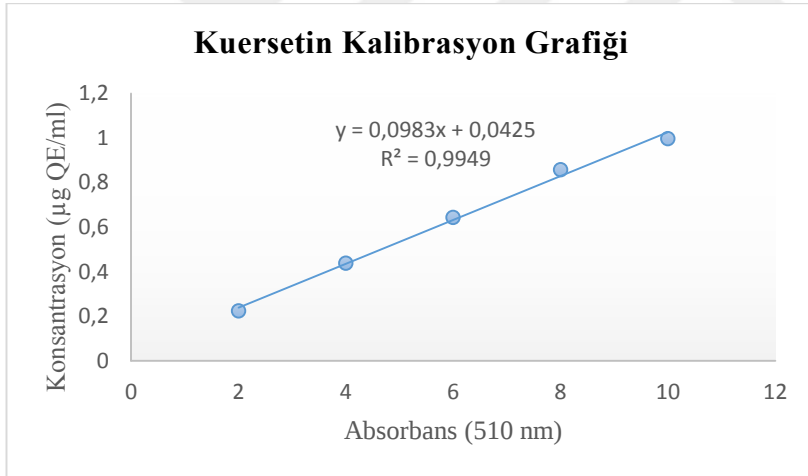
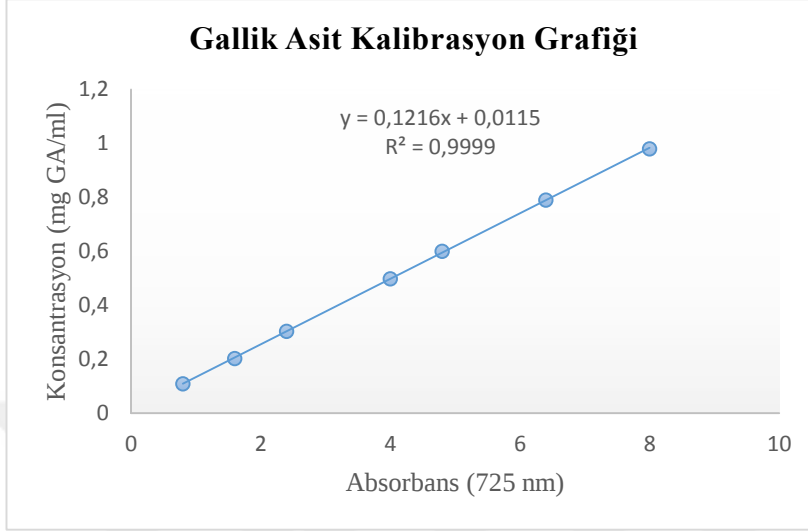
33. **Mohamed, R.S., Mansoor, G.A.** 2002. The use of supercritical fluid extraction technology in food processing. *Food Technol Magazine*. The World Markets Research Centre, London, UK.
34. **Evans, W.C.** 2002. General methods associated with the phytochemical investigation of herbal products. In *Trease and Evans Pharmacognosy* (15 ed.), New Delhi: Saunders (Elsevier). 137-148.
35. **Haghighi, A., Khajenoori, M.** 2013. Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling. *Mass Transfer*. DOI: 10.5772- / 3372.
36. **Ravber, M. Knez, Z., Skerget, M.** 2015. Simultaneous extraction of oil- and water-soluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food chemistry*. 166:316-23. doi: 10.1016.
37. **Gbashi, S., Adebo, O., Piater, L., Madala, N.E.** 2016. Subcritical water extraction in biological materials. 46(1).
38. **Cabane, B., Vuilleumier, R.** 2005. The physics of liquid water *Comptes Rendus Geoscience*, Elsevier, 337:1-23.
39. **Kruse, A., Dinjus, E.** 2007. Hot compressed water as reaction medium and reactant properties and synthesis reactions. *The Journal of Supercritical Fluids*. 39: 362–380.
40. **Eisenmenger, M., Dunford, N.T.** 2008. Bioactive components of commercial and supercritical carbon dioxide processed wheat germ oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 85(1), 55-61.
41. **Vergara-Salinas, J.R., Vergara, M., Altamirano, C., Gonzalez, Á., Pérez-Correa, J.R.** 2015. Characterization of pressurized hot water extracts of grape pomace: chemical and biological antioxidant activity. *Food Chemistry*. 171:62-69.
42. **Liu, J., Sandahl, M., Sjöberg, P.J.R., Turner, C.** 2014. Pressurised hot water extraction in continuous flow mode for thermolabile compounds: extraction of polyphenols in red onions. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 406(2): 441–445.
43. **Plaza, M., Amigo-Benavent M., Castillo, M.D., Ibáñez, E., Herrero, M.** 2010. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. *Food Res. Int.* 43(10): 2341-2348.
44. **Khuwijitjaru, P., Plernjit, J., Suaylam, B., Samuhaseneetoo, S., Pongsawatmanit, R., Adachi, S.** 2014. Degradation kinetics of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. *Can. J. Chem. Eng. s.* 92 (5): 810-815.
45. **Gil-Ramírez, A., Mendiola, J.A., Arranz, E., Ruíz-Rodríguez, A., Reglero, G., Ibáñez, E.** 2012. Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE). Chemical and functional characterization. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 16: 54-60.
46. **Hawthorne, S., Yang, Y., Miller, D.** 1994. Extraction of organic pollutants from environmental solids with sub- and supercritical water. *Analytical Chemistry*. 66 (18): 2912-2920.

47. **Deng, C., Li, N., Zhang, X.** 2004. Rapid determination of essential oil in “*Acorus tatarinowii* Chott” by pressurized hot water extraction followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1059(1): 149-155.
48. **Ramos, L., Kristenson, E.M., Brinkman, U.A.T.** 2002. Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *J. Chromatogr.* 975 (1): 3–29.
49. **Teo, C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., Ong, E.S.** 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *J. Sep. Sci.* 32, 613-622.
50. **Budrat, P., Shotipruk, A.** 2009. Enhanced recovery of phenolic compounds from bitter melon (*Momordica charantia*) by subcritical water extraction. *Sep. Purif. Technol.* 66, 125-129.
51. **Teo, C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., Ong, E.S.** 2010. Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography.* 1217: 2484– 2494.
52. **Ravber, M., Knez, Z., Skerget, M.** 2015. Simultaneous extraction of oil- and watersoluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food Chemistry.* 166:316-323.
53. **Liang, X., Fan, Q.** 2013. Application of subcritical water extraction in pharmaceutical industry. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering.* 5: 1-6.
54. **Kubatova, A., Miller, D., Hawthorne, S.** 2001. Comparison of subcritical water and organic solvents for extracting kava lactones from kava root. 923 (1-2): 187-194.
55. **Khoza, B., Gbashi, S., Steenkamp, P.A., Njobeh, P.B.** 2016. Identification of hydroxycinnamoyl tartaric acid esters in *Bidens pilosa* by UPLC-tandem mass spectrometry. 103: 95-100.
56. **Khoza, B.S., Chimuka, L., Mukwevho, E., Steenkamp, P.A., Madala, N.E.** 2014. The effect of temperature on pressurized hot water extraction of pharmacologically-important metabolites as analyzed by UPLC-qTOF-MS and PCA. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 1–9.
57. **Teo, C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S., Ong, E.S.** 2010. Pressurized hot water extraction (PHWE). *J. Chromatogr.* 1217: 2484–2494.
58. **Gbashi, S.** 2016. Pressurized hot water extraction (PHWE) and chemometric fingerprinting of phytochemicals from *Bidens pilosa*. DOI: 10.13140/RG.2.2.25633.81765.
59. **Doğan, C., Çelik, Ş., Doğan, N.** 2017. Siirt Bölgesi Menengiçlerinin Toplam Fenolik Madde Miktarları ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi.* 21(3): 293-298.
60. **Uzel, R.A.** 2017. A practical method for isolation of phenolic compounds from black carrot utilizing pressurized water extraction with in-site particle generation in hot air assistance. *J. of Supercritical Fluids* 120: 320–327.
61. **Durak, M.Z., Uçak, G.** 2015. Solvent optimization and characterization of fatty acid profile and antimicrobial and antioxidant activities of Turkish *Pistacia terebinthus* L. Extracts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry.* 39: 10-19.

62. **Haldar, A.** 2013. Subcritical Water Extraction Of Bio-Molecules From Lentil Biomass. Master Thesis. University of Alberta, Canada.
63. **Chao, Z., Ri-fu, Y., Tai-qiu, Q.** 2013. Ultrasound-enhanced subcritical water extraction of polysaccharides from *Lycium barbarum* L. *Sep Purif Technol* 120: 141–147.
64. **Yıldız, G.** 2013. *Pistacia Terebinthus* (Menengiç) Meyve Ekstrelerinin Ve Menengiç Kahvesinin Total Fenolik Ve Flavonoit Madde Kompozisyonlarının ve Antioksidan Etkilerinin Karşılaştırılması. Erciyes Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi. Kayseri
65. **Ferna'ndez-Ponce MT, Casas L, Mantell C, Rodríguez M, Martí'nez de la Ossa E** (2012) Extraction of antioxidant compounds from different varieties of *Mangifera indica* leaves using green technologies. *J Supercrit Fluids* 72: 168–17
66. **Durmaz, G., Gökmen, V.** 2011. Changes in oxidative stability, antioxidant capacity and phytochemical composition of *Pistacia terebinthus* oil with roasting. *Food Chemistry*. 128: 410-414.
67. **Co, M., Zettersten, C., Nyholm, L., Sjöberg, P.J.R., Turner, C.** 2011. Degradation effects in the extraction of antioxidants from birch bark using water at elevated temperature and pressure. *Anal Chim Acta*. doi:10.1016/j.aca.2011.04.038.
68. **Shalmashi, A., Fereshteh, M.A., Mohammad, G. Eikani, H.** 2010. Isolation of caffeine from tea waste using subcritical water extraction. *Journal of Food Process Engineering*. 33(4):701 – 711.
69. **Khajenoori, M., Asl, A.H., Hormozi, F., Eikani, M.H., Bidgoli, H.N.** 2009. Subcritical water extraction of essential oils from *Zataria multiflora* Boiss. *J Food Proc Eng*. 32: 804–816.
70. **Hassas-Roudsari, M., Chang, P.R., Pegg, R.B., Tyler, R.T.** 2009. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chem*. 114: 717-726.
71. **Yang, Y., Kayan, B., Bozer, N., Pate, B., Baker, C., Gizir, A.M.** 2007. Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water. *J Chromatogr A*, 1152: 262-267.
72. **Eikani, M.H., Golmohammad, F., Rowshanzamir, S.** 2007. Subcritical water extraction of essential oils from coriander seeds (*Coriandrum sativum* L.). *J Food Eng*, 80: 735-740.
73. **Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A.** 2006. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry*. 103: 816–822.
74. **Ju, Z.Y., Howard, L.R.** 2005. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *J Agric Food Chem*, 51: 5207-5213.
75. **Ibañez, E., Kubatova, A., Señorans, F.J., Caverro, S., Reglero, G., Hawthorne, S.B.** 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *J Agric Food Chem*. 51: 375–382.
76. **Ayala, R.S., Luque de Castro, M.D.** 2001. Continuous subcritical water extraction as a useful tool for isolation of edible essential oils. *Food Chem.*, 75: 109-113.

77. **Jiménez-Carmona, M.M., Uberab, J.L., Luque de Castroa, M.D.** 1999. Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil. *J Chromatogr A*, 855: 625-632.
78. **Myers, R.H., Montgomery, D.C.** 1995. Response surface methodology, process and product optimization using designed experiments. New York : 2nd eddition John Wiley and Sons.
79. **Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M.** 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-175.
80. **Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W.** 1999. The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals. *Food Chemistry*, 64: 555-559.
81. **Lucena, A.P.S., Nascimento, R.J.B., Maciel, J.A.C., Tavares, J.X., Barbosa-Filho, J.M., Oliveira, E.J.** 2010. Antioxidant Activity and phenolics contents of selected Brazilian wines. *Food Comp. Anal.* 23, 30-36.
82. **Khuwijitjaru, P., Sayputikasikorn, N., Samuhasaneetoo, S., Penroj, P., Siritwongwilaichat, P., Adachi, S.** 2012. Subcritical water extraction of flavoring and phenolic compounds from cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*). *J. Oleo Sci.* 61: 349-355.
83. **Ko, M.J., Cheigh, C.I., Chung, M.S.** 2014. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). *Food Chem.* 143: 147–155.

EKLER



ÖZGEÇMİŞ

Sude AY

E-posta: sudeeay@gmail.com

Telefon: 05467833600

Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyomühendislik Anabilim Dalı	Fırat Üniversitesi	2010-2015
Yüksek Lisans	Biyomühendislik Anabilim Dalı	Fırat Üniversitesi	2017-2019