

**KIRMIZI LAHANA ANTOSİYANİNLERİNİN
MİKRODALGA VE KONVANSİYONEL YÖNTEMLER İLE
ÖZÜTLENMESİ**

**EXTRACTION OF RED CABBAGE ANTHOCYANINS BY
MICROWAVE AND CONVENTIONAL METHODS**

Ünzile YİĞİT

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ ELİF YOLAÇANER

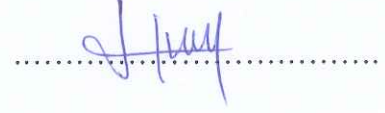
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2018

ÜNZİLE YİĞİT in hazırladığı “**Kırmızı Lahana Antosiyaninlerinin Mikrodalga ve Konvansiyonel Yöntemler İle Özütlenmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**’ nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

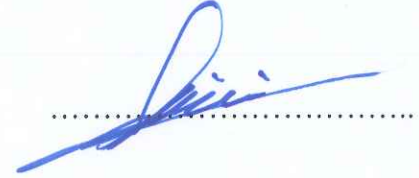
Prof. Dr. Halil VURAL
Başkan



Dr. Öğr. Üyesi Elif YOLAÇANER
Danışman



Prof. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY
Üye



Doç. Dr. Mecit Halil ÖZTOP
Üye



Dr. Öğr. Üyesi F. Ceyda DUDAK ŞEKER
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin / raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde şüretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “ Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren Ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

24/09/2018

(İmza)

Ünitle YİĞİT

Öğrencinin Adı SOYADI

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. Şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü ve fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7. 2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

31/08/2018



Ünzile YİĞİT

ÖZET

KIRMIZI LAHANA ANTOSİYANİNLERİNİN MİKRODALGA VE KONVANSİYONEL YÖNTEMLER İLE ÖZÜTLENMESİ

Ünzile YİĞİT

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Elif YOLAÇANER

Ağustos 2018, 115 Sayfa

Kırmızı lahana (*Brassica oleracea L.*) antosiyaninlerinin benzersiz olması ve çok geniş bir pH aralığında renk sergilemesi nedeniyle gıdaların renklendirilmesinde kullanılan, yüksek antioksidan kapasitesinden dolayı sağlığa olumlu etkileri olan bir sebzedir. Çalışmada, kırmızı lahana antosiyaninleri, mikrodalga destekli özütleme (MDÖ) ve konvansiyonel yöntemlerle özütlenmiştir. Kırmızı lahana özütlerinin, toplam monomerik antosiyanin miktarı (TMA), toplam fenolik madde miktarı (TFM) ve toplam antioksidan kapasiteleri (TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC}) ölçülmüştür. Yanıt yüzey metodu kullanılarak MDÖ proses şartlarının optimizasyonu yapılmıştır. DAD-LC-MS kullanılarak kırmızı lahanalarda bulunan temel antosiyanin çeşitleri tespit edilmiştir.

Konvansiyonel özütleme yönteminde bağımsız değişken olarak özütleme süresi (4 ve 6 saat), özütleme sıcaklığı (40 °C ve 70 °C) ve çözücü tipi (su ve etanol-su (1/1, v/v)) olmak üzere üç parametre seçilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, TMA, TFM, TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC} için elde edilen en yüksek değerler, çözücünün etanol-su, sıcaklığın 40 °C'de ve özütlemenin 4 saat sürdüğü koşul olmuştur. Elde edilen değerler sırasıyla 240,69 mg siyanidin/L, 1677,33 mg GAE/L, 66,34 mg DPPH/L, 16,77 mmol TE/L 'dir. TMA, TFM, TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC} sonuçlarının en düşük çıktığı koşul ise çözücünün su olduğu, 40

°C sıcaklıkta ve 4 saat süren özütleme koşuludur. Sonuçlar sırasıyla; 125,91 mg siyanidin/L, 1018,52 mg GAE/L, 33,12 mg DPPH/L ve 8,91 mmol TE/L'dir.

MDÖ için optimum şartların belirlenmesinde Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. Özütleme süresi (X_1), katı/çözücü oranı (X_2) ve mikrodalga gücü (X_3) olarak seçilen bağımsız değişkenlerin, elde edilen özütlerin TMA, TPM, TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC} değerlerine olan etkileri yanıt yüzey metodolojisi ile incelenmiştir. Çözücünün etanol/su olduğu MDÖ özütlerinde X_1 ve X_2 parametreleri kırmızı lahanadaki TMA'yı istatistiksel olarak önemli derecede etkilerken ($p \leq 0.05$); gücün (X_3) TMA üzerinde anlamlı etkisi bulunmadığı görülmüştür. Çözücü tipinin su olduğu şartlardaki ise X_2 ve X_3 özütlerdeki TMA miktarı üzerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde etkiliyken ($p \leq 0.05$); X_1 'in etkili olmadığı tespit edilmiştir. Çözücünün etanol-su (1/1, v/v) olduğu durumda, RSM optimum şartları, 9,85 dakika, çözünen/çözücü oranı 1/20 ve mikrodalga gücü 595,96 W olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, elde edilen modellere göre, optimum TMA miktarı 438 mg siyanidin/L, optimum TFM miktarı 1143,43 mg GAE/L, optimum TAK_{CUPRAC} miktarı 16,80 mmol TE/L, optimum TAK_{DPPH} miktarı ise 134,82 mg DPPH/L olarak bulunmuştur. Çözücü su iken optimum RSM koşulları; 5 dakika, çözünen/çözücü oranı ve mikrodalga gücü 309,09 W olmuştur. . Bu koşullarda, elde edilen modellere göre, optimum TMA miktarı 131,86 mgsiyanidin/L, optimum TFM miktarı 1952,85 mg GAE/L, optimum TAK_{CUPRAC} miktarı 20,90 mmol TE/L, optimum TAK_{DPPH} miktarı 120,63 mg DPPH/L olarak bulunmuştur. MDÖ'nün daha az çözücü kullanılarak daha kısa sürede konvansiyonel yöntemle yakın sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

DAD-LC-MS ile kırmızı lahanada hakim antosiyaninler tanımlanmış ve siyanidin-3-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-glukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(p-kumarol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(sinapol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(ferulol) (ferulol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(ferulol) (sinapol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(sinapol) (sinapol)-diglukozit-5-glukozit her iki çözücü tipinde ve her iki özütleme yönteminde gözlemlenen antosiyaninler olmuştur. Etanol-su özütlerinde, su özütlerinden farklı olarak siyanidin-3-O-glukozit pikine rastlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kırmızı lahanada (*Brassica oleracea L.*), antosiyanin, mikrodalga destekli özütleme, yanıt yüzey metodolojisi.

ABSTRACT

EXTRACTION OF RED CABBAGE ANTHOCYANINS BY MICROWAVE AND CONVENTIONAL METHODS

Ünzile YİĞİT

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Elif YOLAÇANER

August 2018, 115 pages

Red cabbage (*Brassica oleracea L.*) is a vegetable, which is unique in its anthocyanins and has a positive effect on health because of its high antioxidant capacity, which is used in the coloring of foods due to its color display at a very wide pH range. In the study, red cabbage anthocyanins were extracted by microwave assisted (MAE) and conventional methods. Total monomeric anthocyanin content (TMA), total phenolic material content (TPM) and total antioxidant capacities (TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC}) of red cabbage extracts were measured. Process conditions were optimized using the response surface method. The main types of anthocyanins found in red cabbage were determined by using DAD-LC-MS.

In the conventional extraction method, three parameters were chosen as independent variables, which were extraction time (4 and 6 hours), extraction temperature (40 °C, 70 °C) and solvent type (water, ethanol/water (1/1, v/v)). According to the results, the highest values for TMA, TPM, TAK_{DPPH} and TAK_{CUPRAC} were given by the condition of ethanol/water (1/1, v/v) at 40 °C and 4 hours of extraction. The results were 240,69 mg cyanidin / L, 1677,33 mg GAE / L, 66,34 mg DPPH / L, 16,77 mmolTE / L, respectively. The lowest values for TMA, TPM, TAC were given by the condition that the solvent was

water at 40 ° C and 4 hours of extraction. The results were 125,91 mg cyanidin / L, 1018,52 mg GAE / L, 33,12 mg DPPH / L, 8.91 mmolTE / L.

The Box-Behnken experimental design was used to determine the optimum conditions for MAE. The effects of independent variables chosen as extraction time (X_1), solid/solvent ratio (X_2) and microwave power (X_3) on TMA, TPM, TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC} values (dependent variables) were investigated by a response surface methodology (RSM). When the solvent was the ethanol/water mixture, X_1 and X_2 affected the TMA values significantly ($p \leq 0.05$) and power values (X_3) was found insignificant on TMA value. When the solvent type was water, X_2 and X_3 were significantly effective ($p \leq 0.05$) on the TMA amount in the extract while X_1 was not effective. When the solvent was ethanol-water (1/1, v/v), optimum conditions were 9,85 minutes, 1/20 solid/ solvent ratio and 595,96 W microwave power. According to models determined, optimum TMA amount was found to be 438 mg cyanidin / L, optimum TPM amount was 1143,43 mg GAE / L, optimum TAC_{CUPRAC} amount was 16,80 mmol TE / L and optimum TAC_{DPPH} amount was 134,823 mg DPPH / L. When the solvent was water, optimum conditions were 5 minutes, 1/20 solid/solvent ratio and 309,091 W microwave power. According to models determined, optimum TMA amount was found to be 131,86 mg cyanidin / L, optimum TPM amount 1952,85 mg GAE / L, optimum TAC_{CUPRAC} amount 20,90 mmol TE / L, optimum TAC_{DPPH} amount 120,63 mg DPPH / L. It was observed that MAE gives similar results with conventional method in shorter time by using less solvent amount.

Cyanidin-3-glucoside-5-glucoside, cyanidin-3-diglucoside-5-glucoside, cyanidin-3-glucoside-5-glucoside, cyanidin-3-(p-coumaroyl)-diglucoside-5-glucoside, cyanidin-3-(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside, cyanidin-3-(feruloyl) (feruloyl)-diglucoside-5-glucoside, cyanidin-3-(feruloyl) (sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside, cyanidin-3-(sinapoyl)(sinapoyl)-diglucoside-5-glucoside are common anthocyanins of red cabbage in ethanol-water and water extracts. Unlike water extracts, cyanidine-3-o-glucoside peak was found in ethanol-water extracts.

Keywords: Red cabbage (*Brassica oleracea* L.), Anthocyanins, Microwave assist extraction, Response surface methodology

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, öneri ve yönlendirmeleriyle daima yanımda olan değerli tez danışmanım **Dr. Öğr. Üyesi Elif YOLAÇANER'e**,

Bilgi ve envanter ihtiyaçlarımda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen; Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden çok değerli hocamız **Prof. Dr. Vural GÖKMEN**, sevgili bölüm araştırma görevlilerimiz; **Dr. Berat Aytül HAMZALIOĞLU** ve **Büşra AKDENİZ'e**,

Değerli fikirleri ve önerileri ile tezime katkıda bulunan yüksek lisans tez jürisi üyeleri hocalarımız **Prof. Dr. Halil VURAL**, **Prof. Dr. Dilek SİVRİ ÖZAY**, **Dr. Öğr. Üyesi F. Ceyda DUDAK ŞEKER'e**; deneysel çalışmalarında tecrübe ve bilgilerinden faydalandığım değerli bölüm uzmanlarımız **Yelda ZENCİR** ve **Selin HEYBELİ'ye**,

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde gerçekleştirilen analizlerde bana yardımını esirgemeyen değerli hocamız **Doç. Dr. Mecit Halil ÖZTOP'a** ve öğrencisi gıda yüksek mühendisi **Damla DAĞ'a**; derin bilgi ve deneyimiyle bizi aydınlatan İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü'nden değeri hocamız **Prof Dr. Mustafa Reşat APAK' a**,

Yüksek lisans tez çalışmam için yaptığım araştırmalarda gerekli maddi desteği sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP-12587)**

Bu süreçte güzel dostluklarıyla yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım; **İzlem Cansu MECLİS**, **Mücahide KÖKSAL**, **Kübra ARSLANBOĞA AKGÜNDÜZ**, **Melisa YALÇIN**, **Beyza ESEN**, **Sibel Esra TEFEK** ve **Gizem ÖNER'e**

Hayatımın her döneminde olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da maddi, manevi desteklerini esirgemeyen; babam **Temel YİĞİT**, annem **Zekiye YİĞİT'e**, bir parçası olmaktan her zaman mutluluk ve gurur duyduğum **Sevgili Geniş Aileme** içten teşekkürlerimi sunarım.

Ünzile YİĞİT



Canım Ailem'e...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER.....	xi
SİMGELER-KISALTMALAR.....	xii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Fenolik Bileşikler	3
2.2 Gıdalarda Fenolik İçeriği Etkileyen Faktörler	3
2.3 Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	4
2.4 Flavonoidler	7
2.4.1 Antosiyaninler	9
2.4.2 Kırmızı lahana	12
2.5 Flavonoidlerin Özütlenmesi	13
2.6 Mikrodalga destekli özütlenme (MDÖ)	16
2.6.1 Fenolik bileşiklerin mikrodalga destekli özütlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar	23
2.7 Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Methodology-RSM)	28
3 MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1 Materyaller	30
3.2 İşlem görmemiş kırmızı lahanalarda fiziko-kimyasal özelliklerin belirlenmesi	31
3.2.1 Suda çözünür kuru madde tayini	31
3.2.2 pH tayini	31
3.2.3 Toplam titrasyon asitliği tayini	31
3.2.4 Toplam monomerik antosiyanin (TMA) miktarı tayini	31
3.2.5 Toplam fenolik madde (TFM) tayini	33
3.2.6 Toplam antioksidan kapasite (TAK) tayini	33
3.3 Kırmızı lahana antosiyaninlerinin özütlenmesi	35
3.3.1 Geleneksel yöntemle özütlenme	36
3.3.2 Mikrodalga destekli özütlenme (MDÖ)	36

3.3.3 Mikrodalga destekli özütleme şartlarının optimizasyonu	37
3.4 Antosiyanin özütlerinin analizi	39
3.4.1 Toplam Monomerik Antosiyanin (TMA) tayini	39
3.4.2 Toplam fenolik madde (TFM) tayini	40
3.4.3 Toplam antioksidan kapasite (TAK) tayini	40
3.5 Antosiyanin özütlerinin kompozisyonunun LC-MS ile analizi.....	42
4 BULGULAR & TARTIŞMA.....	43
4.1 İşlem Görmemiş Kırmızı Lahana'nın Fizikokimyasal Analizleri	43
4.2 Kırmızı Lahana Antosiyaninlerinin Geleneksel Yöntemle Özütlenmesi	44
4.3 Mikrodalga Destekli Özütleme Şartlarının Optimizasyonu	50
4.4 MDÖ ile Elde Edilen Özütlerin LC-MS ile Analizi.....	68
5 SONUÇLAR.....	77
KAYNAKLAR.....	78
EKLER.....	89
ÖZGEÇMİŞ.....	115

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	5
Şekil 2.2 Fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3 Flavonoidlerin basit kimyasal yapısı	7
Şekil 2.4. Antosiyanidinlerle reaksiyona girerek antosiyaninleri oluşturan şekerler.....	9
Şekil 2.5 Flavonoidlerin ekstraksiyonunda rol oynayabilecek farklı adımlar	14
Şekil 3.1. CUPRAC yönteminin Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH) _n) reaksiyona girmesiyle, Cu(I)-Nc sarı renkli kelatının oluşumu.....	34
Şekil 3.2 Mikrodalga Destekli Özütleme Düzenegi	37
Şekil 4.1 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahana özütlerindeki TMA'nın farklı şartlardaki değişimi (404sa: 40°C, 4 saat, 406sa: 40°C, 6 saat, 704sa: 70°C, 4 saat, 706sa: 70°C, 6 saat)	47
Şekil 4. 2 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahana özütlerindeki TFM'nin farklı şartlardaki değişimi (404sa: 40°C, 4 saat, 406sa: 40°C, 6 saat, 704sa: 70°C, 4 saat, 706sa: 70°C, 6 saat)	47
Şekil 4. 3 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahana özütlerindeki TAK _{DPPH} 'in farklı şartlardaki değişimi (404sa: 40°C, 4 saat, 406sa: 40°C, 6 saat, 704sa: 70°C, 4 saat, 706sa: 70°C, 6 saat)	48
Şekil 4. 4 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahana özütlerindeki TAK _{CUPRAC} 'in farklı şartlardaki değişimi (404sa: 40°C, 4 saat, 406sa: 40°C, 6 saat, 704sa: 70°C, 4 saat, 706sa: 70°C, 6 saat)	49
Şekil 4.5 Kırmızı lahanalarda etanol/su (1/1,v/v) çözücü karışımıyla oluşturulan bağımlı değişkenlerin tahmin edilen ve deneysel değerlerinin karşılaştırılması a) TMA b) TFM c)TAK _{CUPRAC} d) TAK _{DPPH}	54
Şekil 4.6 Kırmızı lahanalarda %su çözücüsüyle oluşturulan bağımlı değişkenlerin tahmin edilen ve deneysel değerlerinin karşılaştırılması a) TMA b) TFM c)TAK _{CUPRAC} d) TAK _{DPPH}	57
Şekil 4.7 Özütleme süresi (X ₁) Katı-sıvı oranı (X ₂), mikrodalga gücü (X ₃)' nün TMA üzerindeki etkisi a) X ₃ =0, b) X ₂ =0, c) X ₁ =0	59
Şekil 4.8 Özütleme süresi (X ₁) Katı-sıvı oranı (X ₂), mikrodalga gücü (X ₃)' nün TFM üzerideki etkisi a) X ₃ =0, b) X ₂ =0, c) X ₁ =0	60

Şekil 4.9 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TAK_{DPPH} üzerindeki etkisi a) $X_3=0$, b) $X_2=0$, c) $X_1=0$	61
Şekil 4.10 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TAK_{CUPRAC} üzerindeki etkisi a) $X_3=0$, b) $X_2=0$, c) $X_1=0$	62
Şekil 4.11 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TMA üzerindeki etkisi a) $X_3=0$, b) $X_2=0$, c) $X_1=0$	64
Şekil 4.12 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TFM üzerindeki etkisi a) $X_3=0$, b) $X_2=0$, c) $X_1=0$	65
Şekil 4.13 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TAK_{DPPH} üzerindeki etkisi a) $X_3=0$, b) $X_2=0$, c) $X_1=0$	66
Şekil 4.14 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TAK_{CUPRAC} üzerindeki etkisi a) $X_3=0$, b) $X_2=0$, c) $X_1=0$	67
Şekil 4.15 Konvansiyonel etanol-su özüt kromatogramı (40°C sıcaklıkta 4 saat özütleme)	74
Şekil 4.16 Mikrodalga etanol-su özütü kromatogramı (1:30 katı:çözücü oranı, 400 W gücünde 10 dakika özütleme)	74
Şekil 4.17 Konvansiyonel su özüt kromatogramı ((40°C sıcaklıkta 6 saat özütleme)	76
Şekil 4.18 Mikrodalga su özütü kromatogramı (1:20 katı:çözücü oranı, 400 W gücünde 15 dakika özütleme)	76

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1 Antosiyaninin kimyasal yapıları ve yapıya bağlanan gruplar.....	10
Çizelge 2.2 Mikrodalga destekli özütlemde en sık kullanılan çözücü tipleri	18
Çizelge 3.1 Yanıt yüzey metodunda kullanılacak olan bağımsız değişkenler ve kodlanmış/gerçek değerleri.....	38
Çizelge 3.1 Box-Behnken deneysel tasarımı (bağımsızdeğişkenler, X_1 :süre, X_2 :katı/çözücü oranı ve X_3 :mikrodalga gücü)	39
Çizelge 4.1 Kırmızı Lahananın Fizikokimyasal Özellikleri.....	44
Çizelge 4.2 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahanaların toplam antosiyanin, toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite miktarları.....	45
Çizelge 4.3 Kırmızı Lahanaların Mikrodalga Destekli Özütleme Verilerinin Regresyon Denklemleri.....	51
Çizelge 4.4 RSM optimizasyonu ile elde edilen optimum değerler.....	68
Çizelge 4.5 Konvansiyonel yöntem ve MDÖ ile özütlenen kırmızı lahanaların özütlerinin TMA sonuçlarının % olarak karşılaştırılması.....	70
Çizelge 4.6 Farklı konvansiyonel yöntemi ve MDÖ ile özütlenen kırmızı lahana özütlerinin TMA sonuçlarının % olarak karşılaştırılması	71
Çizelge 4.7 Ethanol-su ekstraktında gözlenen kütleler ve kromatogramları	73
Çizelge 4.8 Su özütünde gözlenen kütleler ve kromatogramı	75

SİMGELER-KISALTMALAR

Simgeler

ε'	Dielektrik Sabiti
ε''	Dielektrik Kayıp Faktörü
$\tan \delta$	Kayıp Tanjant
η	Yanıt Yüzey Yönteminde Yanıt
f	Yanıtın Bilinmeyen İşlevi
ε	İstatistiksel Hata

Kısaltmalar

TMA	Toplam Monomerik Antosiyanin / Total Monomeric Anthocyanin
TFM	Toplam Fenolik Madde / Total Phenolic Material
TAK	Toplam Antioksidan Kapasitesi
TAC	Total Antioxidant Capacity
MDÖ	Mikrodalga Destekli Özütleme
MAE	Microwave Assisted Extraction
EM	Elektromanyetik
DMDÖ	Dinamik Mikrodalga Destekli Özütleme
UDÖ	Ultrason Destekli Özütleme
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
TE	Trolox Eşdeğeri
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
RSM	Response Surface Methodology
CUPRAC	CUPric Reducing Antioxidant Capacity

1. GİRİŞ

Günümüzde, doğal içeriklere sahip ve özel ihtiyaçlara cevap verebilen fonksiyonel özellikteki gıda katkılarının/gıdaların üretimi önem kazanmaktadır. Bununla birlikte, gıdalarda kullanılan renklendirici maddelerin yapay/sentetik maddelerden değil de doğal kaynaklardan elde edilmesinin önemi öne çıkmaktadır. Yüksek antioksidan kapasitesi, insan sağlığına olumlu etkileri ve renk verme özelliklerinden dolayı antosiyaninler son yıllarda literatürde sıklıkla çalışılan bileşenlerdendir. Renkli sebze ve meyvelerde bulunan ve suda çözünebilen antosiyaninlerin, kimyasal yapılarına bağlı olarak kararlılıklarının düşük olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu bileşenler sıcaklık, askorbik asit, enzimler, oksijen ve ışık gibi dış faktörlerden etkilenmektedirler. Dolayısıyla gıda ürünlerinde doğal renk maddesi olarak kullanmak için antosiyaninlerin özütlenmesi maliyetli bir prosestir ve özütlenme sonrasında antosiyaninlerin kararlı halde tutulması zor olmaktadır.

Kırmızı lahanada, *Brassicaceae* familyasına ait bir sebzedir ve dünyanın çeşitli bölgelerinde yetişmesine rağmen doğal yetiştirme mekanı, Akdeniz bölgesi ve Avrupa'nın güneybatısı olan bir sebzedir. Kırmızı lahananın insan sağlığına etkisi ile ilgili çalışmalar, kalp hastalıklarının önlenmesinde ve bazı kanser türlerine karşı etkilerini göstermiştir. Kırmızı lahanada, mineraller, vitaminler, oligosakkaritler ve antosiyaninler ile flavonoller ve glukosinolatlar (GSL'ler) gibi biyoaktif maddeler açısından zengin olduğundan yüksek besin değerine dolayısıyla insan sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir.

Bu çalışmada gıda ürünlerinde doğal renklendirici madde olarak kullanılma amaçlı olarak kırmızı lahanada (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*) bulunan antosiyaninlerin su ve etanol/su karışımı kullanılarak hızlı, verimli ve doğa dostu bir yöntem olan mikrodalga destekli özütlenme ve konvansiyonel özütlenme yöntemleri ile özütlenmesi gerçekleştirilmiştir. İki özütlenme yöntemi birbiri ile karşılaştırılmıştır. Konvansiyonel yöntemde seçilen bağımsız parametrelerin toplam monomerik antosiyanin (TMA), toplam fenolik madde (TFM) ve toplam antioksidan kapasitesi (TAK) üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Mikrodalga özütlenmede, özütlenme süresi, çözünen/çözücü oranı ve mikrodalga gücü gibi işlem şartlarının matematiksel-istatistiksel bir yöntem olan yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu yapılmıştır. Çalışmanın sonunda DAD-LC-MS ile kırmızı lahanalarda bulunan antosiyanin çeşitleri tespit edilmiştir.

Mikrodalga destekli özütleme (MDÖ) (microwave assisted extraction-MAE) yöntemi gibi konvansiyonel yöntemlere göre daha kısa sürede ve daha az çözücü kullanılarak gerçekleştirilebilen yeni özütleme yöntemleri antosiyanin eldesinde kullanılabilmektedir. MDÖ yöntemi sırasında, mikrodalgalarla sağlanan enerji gıdaların içinde bulunan molekülleri dipolar rotasyon veya iyonik kondüksiyon mekanizmaları ile hareket ettirip, çarpıştırmaktadır. Bunun sonucu olarak da hızlı bir ısı üretimi gerçekleşmektedir. MDÖ yöntemi ile yüksek verimlilik, düşük çözücü kullanımı ve özütleme süresinin kısılması gibi avantajlar elde edilmektedir. Literatürde kırmızı lahana antosiyaninlerinin başka yöntemlerle özütlenmesine dair bazı çalışmalar mevcut olsa da MDÖ yöntemi ile özütleme çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, gıda ürünlerinde doğal renklendirici madde olarak kullanılma amaçlı kırmızı lahanada bulunan antosiyaninlerin konvansiyonel özütleme yöntemi ve hızlı, verimli ve doğa dostu bir yöntem olan mikrodalga destekli özütleme yöntemiyle özütlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Fenolik Bileşikler

Son yıllarda, gıda bilimi alanındaki çalışmalar yüksek antioksidan kapasitesine sahip olan ve insan sağlığına olumlu bir çok etkisi bulunan fenolik bileşikler üzerine yoğunlaşmaktadır. Fenolik bileşikler, bitki kaynaklı oldukları ve günlük beslenmede büyük yer kapladıkları için diğer antioksidan özelliğe sahip bileşiklerden daha avantajlı olmaktadır. Örneğin sadece günlük diyetle (sebze, meyve, tahıl, çay, kahve, kırmızı şarap, vb.) tüketilen fenolik asit oranının günde 25 mg⁻¹ g arasında; flavonoid alımının ise günde 50-800 mg arasında değişebileceği tespit edilmiştir [1]. Fenolik bileşiklerin; kanser, kalp-damar hastalıkları ve sinir harabiyetine bağlı bazı hastalıklar gibi oksidatif stresin neden olduğu birçok hastalığın önlenmesindeki rolleri büyüktür [2;3].

Günümüzde, tüketicilerin de bilinçlenmesi ile birlikte, doğal kaynaklardan elde edilmiş, sentetik katkı içermeyen ve fonksiyonel özelliğe sahip gıda ürünlerine talep hızla artmaya devam etmektedir. Gıda endüstrisi, genellikle geleneksel gıdalardan yararlanarak yüksek fenolik içeriğe sahip çeşitli fonksiyonel özelliği olan gıda ürünlerini piyasaya sürmeye devam etmektedir. Bilim insanları da, bu bileşiklerin gıda ve diyet içindeki doğası ile dağılımını inceleyerek bu bileşikler ile bazı hastalıkların gelişme riski arasındaki ilişkiyi araştırmaktadır. Fenoliklerin farklı biyoyararlanımları, işleme ve depolamaya bağlı olarak değişimleri ile bağırsak mikrobiyotası etkileşimleri çalışmalarda dikkat edilmesi gereken önemli konulardan bazıları olmaktadır [4;5;6].

2.2 Gıdalarda Fenolik İçeriği Etkileyen Faktörler

Meyvelerin, sebzelerin ve kırmızı şarap ile çay gibi içeceklerin fenolik bileşiklerin ana kaynağı olduğu iyi bilinse de, bu fenolik bileşiklerin içeriğini, biyoaktivitelerini ve/veya olası sağlığa yararlı olan özelliklerini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Sıcaklık, pH, oksijen varlığı, ışık, metaller, enzimatik reaksiyonlar bunlardan bazılarıdır. Bu faktörlere ek olarak hasat, işleme ve depolama sırasındaki tür özellikleri, çevresel faktörler, olgunluk gibi özelliklerin de değişikliğe sebep olacağı göz önünde bulundurulmalıdır. Gıdaların tür

özellikleri ve kompozisyonları; ekonomik olduğu ve farklı çeşitlerin farklı kompozisyonları bilindiği için elma gibi birkaç meyvenin sıklıkla araştırılmasına neden olurken tahıl ve diğer egzotik meyvelerin çalışmalarda kullanılmamasının da sebebidir. Öte yandan, meyve ve sebzelerde flavonoidler, bal ve zeytinlerde flavonlar, armutlarda kateşinler, elmalarda prosiyanidin ile çilek ve narenciye meyvelerinde flavanonların yoğun olarak bulunuyor olduğu bilgisi özütlenecek fenolik bileşik seçiminde kolaylık sağlar. Bu farklılıklar genetik mutasyonlar ve besinlerin olgunluk düzeylerinden de kaynaklanabilmektedir [7].

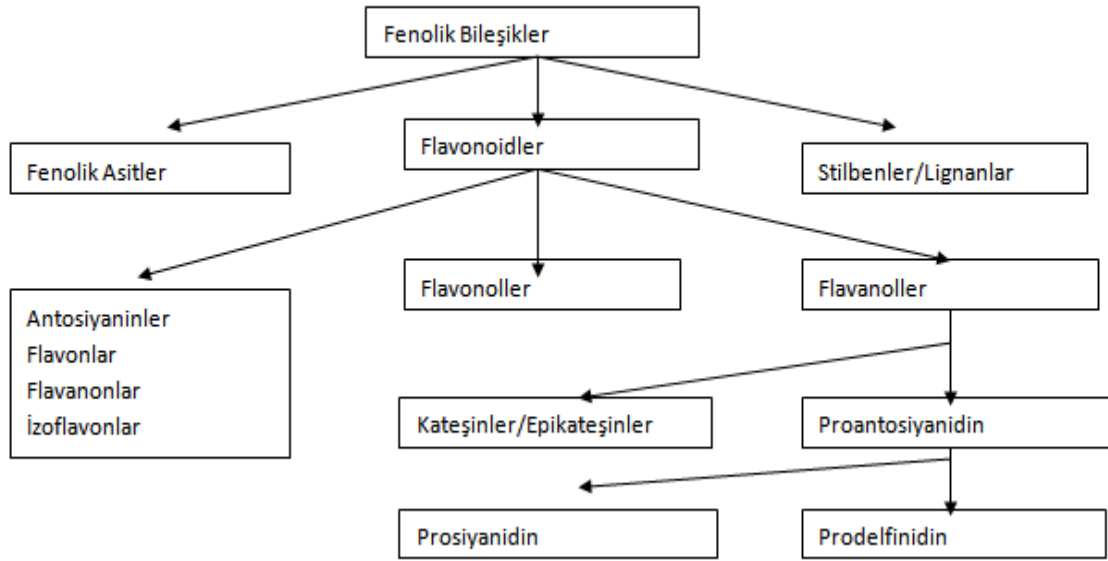
Çevresel faktörler polifenol içeriğini etkilemektedir. Toprak türü, UV radyasyonu, yağış, patojenler ve parazitler tarafından olası bulaşma, yaralama, hava kirliliği, aşırı sıcaklığa maruz kalma, ve tarımsal alanlarla ilgili diğer faktörler (ekim teknikleri, seralarda veya tarlalarda kültür gibi büyüme koşulları, biyolojik veya organik kültür, hidroponik kültür, vs.) polifenol içeriğini etkileyen çevresel faktörlerdir. Olgunluk derecesi, farklı fenollerin hem konsantrasyonunu hem de nispi içeriğini etkilemektedir. Ancak her bir faktörün davranışı ile etkisi genelleştirilemez ve birbirinden bağımsız olarak çalışılmalıdır [7].

Genel olarak, işlenmiş gıdalar orijinal taze ürünlerden önemli ölçüde farklı fenolik seviyelere sahiptir. Artan oksidatif hasar ve enzim etkisi de fenolik içeriği azaltan faktörlerdendir. Dondurma, konserveleme, ısıtma, ışınlama, pastörizasyon vb. proseslerin, meyve suları, üzüm, domates ve çay gibi fenolik içeriği yüksek gıdaları etkilediği bildirilmiştir. Hazırlama aşamaları da gıdalarda son fenolik içeriği üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmaktadır. Doğrama, parçalama, soyma ve pişirme gibi işlemlerde önemli miktarda fenolik madde açığa çıkar. Örneğin, meyve ve sebzelerin dış katmanlarının iç kısımlardan daha yüksek bir fenolik madde içerdiği göz önüne alındığında soyma işlemi, önemli miktarda fenolik madde kaybına neden olmaktadır. Yakın tarihli çalışmalarda, hasat sonrası işleme ve depolamanın, gıdalardaki fenolik asit ve flavonoid içeriğini etkilediği saptamıştır [7].

2.3 Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

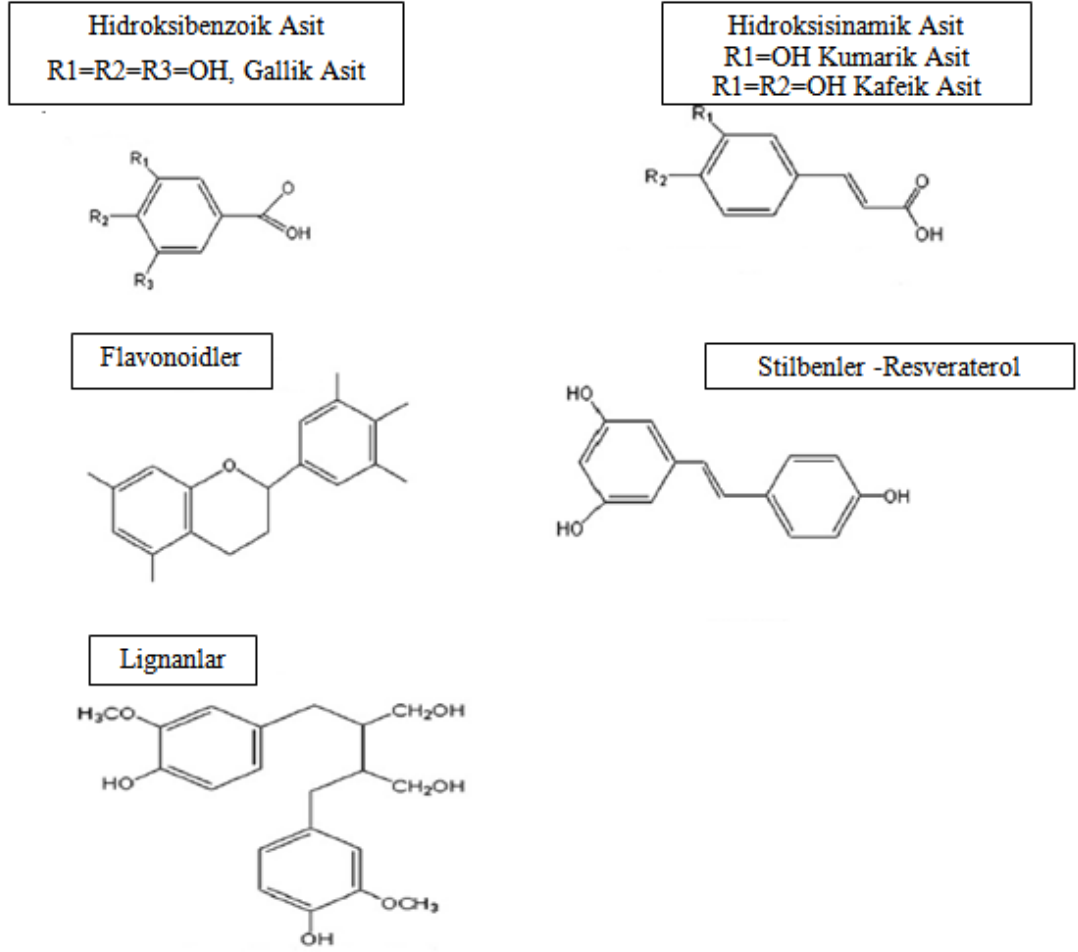
Bitkiler, hem normal gelişim esnasında hem de bitki enfeksiyonu/yaralaması, ultraviyole (UV) radyasyonu ve aşırı sıcaklık gibi kötü koşullarda ikincil metabolitler olarak bilinen bir çok organik molekülü sentezleyebilmektedir [7]. Bu bileşikler, içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları birbirine bağlayan halkaların yapısına göre farklı

gruplara ayrılırlar. Fenolik bileşikler, fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar olmak üzere 4 farklı gruba ayrılırlar. Şekil 2.1’de, fenolik bileşiklerin sınıflandırılması ve Şekil 2.2’de ise bazılarının kimyasal yapıları gösterilmiştir. Fenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri oldukça yüksektir. In-vitro olarak domates suyundaki p-kumarik asit ve klorojenik asitin kansorejen bileşik olan nitrozamini C vitamininden daha etkili bir şekilde engellediği saptanmıştır [8].



Şekil 2. 1 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması [9].

Fenolik asitler, hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinamik asitler olarak iki grupta incelenmektedirler. Hidroksisinamik asitler bitkisel gıdalarda yaygınken, hidroksibenzoik asitler bitkisel gıdalarda iz miktarda bulunurlar. Temel yapıları aynı olmasına rağmen, aromatik halkalar üzerindeki hidroksil gruplarının sayıları ve bulundukları konumları değiştikçe gıdalarda bulunan fenolik asitlerin çeşitliliği artar. Çay, önemli bir gallik asit kaynağıdır ve 4.5 g / kg oranında gallik asit içerir [10]. Hidroksisinamik asitler hemen hemen tüm bitkilerde bulunur; kafeik, p-kumarik, ferulik ve sinapik gibi asitler genellikle glikosile edilmiş formlarda veya şikimik asit, tartarik asit ve kinik asitin (örneğin, birçok meyve ve kahve içinde bulunan kininik asitle esterleştirilmiş olan klorojenik asit olan klorojenik asit) esterleri olarak bulunurlar. Hidroksibenzoik asitler, hidrolize edilebilir tanenler (mangolardaki galonatinler ve çilek ile ahududu gibi kırmızı meyvelerdeki ellagitanninler) gibi kompleks yapıların bileşenleri olarak da bulunabilirler [11].



Şekil 2. 2 Bazı fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı [7]

Stilbenler, insan diyetinde sadece küçük miktarlarda bulunmaktadır. Bunlardan biri olan resveratrol (3,5,40-trihidroksi-trans-stilben), antikarsinojenik, anti-enflamatuvar ve kardiyoprotektif özellikleri nedeniyle büyük ilgi uyandırmıştır. Resveratrol ağaçlarda, birkaç çiçekli bitkide ve üzüm yaprağında da görülmüş olmasına rağmen resveratrolün başlıca besin kaynakları üzüm, şarap ve yer fıstığıdır [7].

Lignanlar, 2-fenilpropan birimleri içeren, östrojenik veya anti-östrojenik aktiviteye sahip fito-östrojenlerdir. Diyet lignan bileşikleri, en zengin kaynak olan keten tohumunda bulunur [12]. Diyet lifi, protein, antioksidanlar ve diğer besin elementlerinin de iyi bir kaynağı olan diğer besin kaynakları; yağlı tohumlar (fındık, susam, ayçiçeği, kaju, vb.), sebzeler (kivircik lahanası, brokoli ve sarımsak), meyveler (kayısı, çilek ve şeftali), zeytinyağı ve şarap, bira, çay ve kahve gibi içecekler sadece küçük miktarlarda lignan içerirler [13]. Lignanlar, hem gıda kaynaklarında (matairesinol, sekoizolarisiresinol) hem

de insan vücudunda (enterodiol, enterolakton) çeşitli bileşikler olarak bulunmaktadır. Bazı araştırmalar, lignanların tipine göre sağlık üzerindeki etkilerinin değiştiğini bildirmiştir [7].

2.4 Flavonoidler

Flavonoidler, oksijenli bir heterosikle (halka C) oluşturan üç karbon atomuyla birbirine bağlanan iki aromatik halkadan (A ve B) oluşan (C₆-C₃-C₆ difenil propan) (Şekil 2.3) bir yapıdır. Bunlar C yapısındaki değişikliğe göre yedi alt-sınıfa ayrılmaktadırlar; [14].

Flavonoller (açık sarı pigmentler),

Flavonlar (açık sarı pigmentler),

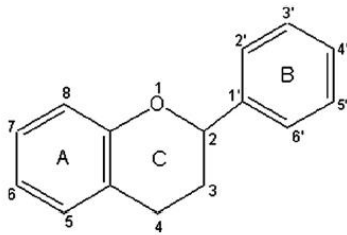
İzoflavonlar (fitoöstrojen bileşikler),

Flavanonlar, (bitter tadındaki bileşikler)

Flavanoller (buruk tat veren bileşikler)

Flavononoller

Antosiyanidinler (kırmızı ve mavi renk pigmentler)



Şekil 2. 3 Flavonoidlerin basit kimyasal yapısı [7]

Flavonoller Gıdalarda en yaygın bulunan flavonoidlerdir ve ana temsilcileri kuersetin, kaemferol ve mirisetindir. Bunlar esas olarak soğan, lahana, pırasa, brokoli vb. besinlerde bulunurlar [14]. Aynı zamanda glikoz veya ramnoz ile glikozile formda kırmızı şarap ve çayda da bulunabilirler. Meyvelerin genellikle dış ve yaprak - cilt bölgesinde biriken 5 ve 10 farklı flavonol glikozid vardır. Aynı ağaçtan gelmelerine rağmen farklı meyvelerde flavanol konsantrasyonu değişebilmektedir [15]. Bunun nedeni, güneş ışığına maruz kalma sürelerinin farklı olmasıdır [16]. Sebzelerde ise flavonoller yeşil dış yapraklarda, daha az renkli iç yapraklara oranla daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır.

Flavonlar, meyve ve sebzelerde flavonollerden daha az yaygındır. Bunlar temel olarak luteolin ve apigenin glikozitlerinden oluşur. Az miktarda tanımlanmış olan flavon

kaynakları maydanoz, kereviz ve tatlı dolmalık biberdir. Darı ve buğday gibi tahıllar, glikozit flavonları içermektedir [17]. Diğer taraftan, narenciye yüzeyinde büyük miktarlarda tangeretin, nobiletin ve sinensetin gibi polimetoksile edilmiş flavonlar bulunur.

İzoflavonlar, fito-östrojenler olarak tanımlanan flavonoidlerin bir alt sınıfıdır; çünkü östrojen reseptörlerine bağlanma kabiliyeti sergilemektedirler. İzoflavonlar, C-3'teki benzen halkasının B pozisyonundaki diğer flavonoidlerden farklıdır. Baklagiller, soya ve bunların işlenmiş ürünlerinde bulunmaktadır. Genistein, daidzein ve glisitin soya fasulyesinde bulunan izoflavonların aglikon formudur. Fakat esas olarak genistin, daidzin ve glisitin gibi asetil veya malonil glikozitler olarak ortaya çıkmaktadırlar [7].

Flavanonlar, turuncgillerde yüksek konsantrasyonlarda bulunup ana aglikonlar greyfurtta naringenin, portakallarda hesperitindir. Portakal suyu, 200-600 mg/L arasında hesperidin ve 15-85 mg/L narirutin içerir, bu nedenle bir bardak portakal suyunda 40-140 mg arası flavanon glikozid bulunmaktadır. Flavanonlar ayrıca nane gibi aromatik bitkilerde de az miktarda bulunabilmektedir [18].

Flavanoller (kateşinler ve proantosiyanidinler), monomerik (kateşinler) ve polimerik formlarda (proantosiyanidinler) bulunmaktadır. Kateşinler, birçok meyve türünde bulunmakla birlikte, esas olarak yeşil çay, kırmızı şarap ve çikolatadan elde edilen içeceklerde bulunmaktadır [19;20]. Diğer flavonoidlerin aksine, flavanoller gıdalarda glikolize değildirler.

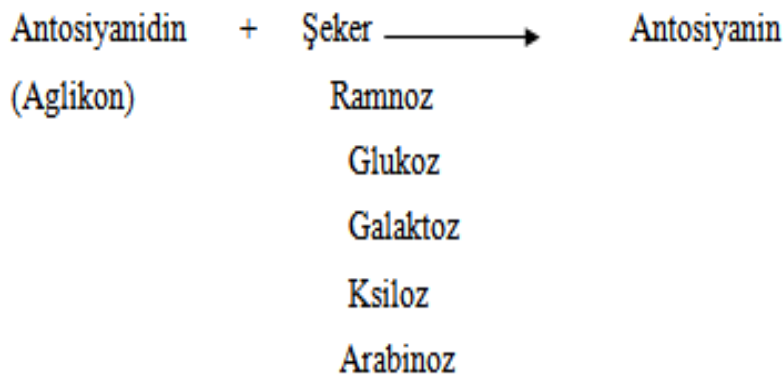
Kondense tanin olarak bilinen Proantosiyanidinler; dimerler, trimerler, oligomerler ve kimyasal yapıları 4-6 veya 4-8 pozisyonunda (B-tipi proantosiyanidinler) C-C bağları ile bağlanmış olan ve flavonollerin polimerleridir. Bunlar prosiyanidinler (kateşin, epikateşin ve bunların gallik esterlerinden türetilmiş) ve prodelfinidinler (galloocatechin, epigallocatechin ve galipli türevlerinden türetilmiş) olarak sınıflandırılırlar. Yoğunlaştırılmış tanenler, üzüm, elma, kivi ve armut gibi yaygın olarak tüketilen meyvelerde bulunur. Ayrıca çay, kakao ve benzerlerinden de elde edilmektedir. Bu bileşikler, meyve ve içeceklerdeki buruk tat (örn., Bira) ve çikolatadaki bitter tat oluşumundan sorumludur [21].

Flavononoller, yapılarında 4-pozisyonunda doymuş bir C2-C3 bağı ve bir oksijen atomu(karbonil grubu) varlığı ile bilinirler. Yapıdaki 3-pozisyonunda bir hidroksil grubuna sahip olarak flavononlardan farklıdır ve sıklıkla 3-hidroksiflavononlar veya dihidroflavonoller olarak adlandırılırlar. Engeletin ve astilbin beyaz üzüm kabuğunda, genistin soya fasulyesinde, taksifolin ise meyvelerde bulunan flavononollerdir [14].

Antosiyanidinler, en çok çalışılan flavonoid gruplarından biridir. Bunlar, mavi, pembe, kırmızı veya mor renkten sorumlu olup birçok gıdada bulunan pigmentlerdir [26]. Yapısal olarak antosiyaninler, flavilyum iyonunun bir türevi olan bir aglikon biriminin (antosiyanidin) heterosidleridir. Farklı antosiyaninler arasındaki temel farklılıklar, aglikondaki hidroksillenmiş grup sayısı, bağlanmış şekerlerin sayısı ve yapısı, molekül içerisindeki şekere bağlanan aromatik veya alifatik karboksilatlar ve bu bağların pozisyonlarından kaynaklanmaktadır [22]. Antosiyaninlerin yapıları kimyasal özelliklerini etkilemektedir. Bu nedenle stabilite, renk, reaktivite, antioksidan yeteneği ve benzer özellikleri anlamak çok önemlidir. Antosiyaninler aglikon (oldukça kararsız) halde, 3. pozisyonda glikoz ile glikozile ve farklı organik asitlerle (sitrik ve malik asitler) ve fenolik asitlerle esterleşmiş halde bulunabilirler. Diğer flavonoidler ile kompleksler oluşturarak stabilize edilebilirler (kopigmentasyon). Diyetle antosiyaninler kırmızı şarap, hububat, kırmızı lahana, fasulye ve soğan gibi bazı yapraklı ve kök sebzelerden elde edilebilirler, ancak bunlar çoğunlukla kırmızı meyveler, kiraz, nar veya erikte bulunurlar [23;24;25].

2.4.1 Antosiyaninler

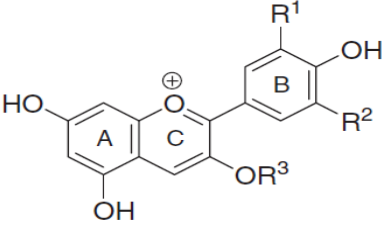
Antosiyanin, Yunanca çiçek ve mavi kelimelerinden oluşmaktadır. Bitkilere kendilerine has rengi veren suda çözünebilen fenolik bileşiklerdir. Antosiyaninlerin şeker içermeyen aglikon kısımlarına antosiyanidin denilmektedir. Antosiyanidinlere farklı şekerlerin glikozidik bağla bağlanmasıyla çeşitli antosiyaninler oluşmaktadır [26]. Moleküldeki şekere bağlanmış olan alifatik ve aromatik asitlerin yapısı ve sayısı da antosiyanin çeşitliliğini artırmaktadır [26].



Şekil 2. 4 Antosiyanidinlerle reaksiyona girerek antosiyaninleri oluşturan şekerler [8]

Antosiyanidinlere sıklıkla bağlanan monosakkaritler vardır. Bunlar; glukoz, galaktoz, ramnoz, arabinozdur [8]. Bu şekerlerden biri veya ikisi ve genelde üçüncü karbon atomunun hidroksil grubuyla bağlanmaktadır. Birçok meyve ve sebzede olduğu gibi (çilek, üzüm, kırmızı lahana) pembeden more değişen renk pigmentleri antosiyaninlerdir [26]. Antosiyanin pigmentleri, vişne gibi meyvelerin hem etinde hem kabuğunda bulunurken siyah üzüm, bazı erik çeşitlerinde sadece meyve kabuğunda bulunmaktadır.

Çizelge 2. 1 Antosiyaninin kimyasal yapıları ve yapıya bağlanan gruplar [27]

Antosiyanidin	Bağlı Gruplar			Renk
	R1	R2	R3	
Delfinidin	OH	OH	H	Mavi-Kırmızı
Petunidin	OH	OCH ₃	H	Mavi-Kırmızı
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	H	Mavi-Kırmızı
Siyanidin	OH	H	H	Turuncu-Kırmızı
Peonidin	OCH ₃	H	H	Turuncu-Kırmızı
Pelargonidin	H	H	H	Turuncu-Somon

Antosiyanidinlerin yapısındaki metoksil grubu arttıkça kırmızılık, hidroksil grubu arttıkça mavilik artmaktadır. Pelargonidin, siyanidin, delfinidin, peonidin, petunidin ve malvidin en başta gelen antosiyanidinlerdir ve Çizelge 2.1' de kimyasal yapıları gösterilmiştir [8]. Metoksil grubu aglikon stabilitesinin artırmaktadır. Hidroksil grubu ise antosiyanidinlerin stabilitesini düşürmektedir. Bu yüzden malvidin en kararlı, delfinidin ise en kararsız antosiyanidinlerdir [26].

Antosiyaninler bitkilerin yaprak, meyve, soğan, rizom veya sap dokularındaki hücre vaküolünde birikmiş olarak bulunmaktadır. Bu yüzden bitkinin yetiştiği çevresel faktörler, toprak yapısı dokulardaki antosiyanin miktarını etkilemektedir [26]. Örnek olarak bazı bitkilerde yapraklar yüksek miktarda antosiyanin içerdiğinden tamamen kırmızı renkliyen bazılarında bu renk belirli bir organın gizli bölümlerinde bulunmaktadır. Benzer şekilde antosiyanin varlığından kaynaklanan kırmızı renk bazı bitki yapraklarında sadece

bitkinin büyüme ve stres koşullarında gözlemlenirken bazı bitki yapraklarında bitki canlı olduğu müddetçe kırmızı renk gözlemlenmektedir. Ayrıca bitkilerin içerdikleri antosiyanin miktarı ürünün yetiştirme sürecinde ve hasat sonrasındaki çevresel koşullara (sıcaklık, süre vb) bağlı olarak da değişebilmektedir [28].

Bitkilerde yaygın olarak bulunan antosiyanin pigmentlerinin yapısı stabil değildir. Hasat sonrası uygun olmayan depolama koşullarında ve ticari amaçlı işleme esnasında antosiyaninlerin stabilitesi bozulabilmektedir. Genel olarak antosiyanin yapısını etkileyen fiziksel ve kimyasal faktörler şunlardır: kimyasal yapıdaki değişiklikler, ortamda bulunan kopigmentler, pH, sıcaklık, polifenol oksidaz ve peroksidaz gibi enzimlerin var olup olmadığı, metal iyonu vb [26]. Reaksiyonlar genellikle pigment renginin açılması şeklindedir. Antosiyaninlerin renkleri SO₂ ilavesiyle geri dönüşümlü olarak değişmektedir. Ancak ısıtma gibi bir işlemle pH 1 olduğunda renk değişimi ortadan kalkmaktadır. Bu yüzden koyu renkli üzüm vb ürünlerin muhafazasında SO₂ kullanılıyorsa ortama askorbik asit gibi bileşikler de eklenerek stabil bir yapı elde edilip renk dönüşümü engellenmektedir [8].

Antosiyaninler düşük pH değerlerinde daha stabildir ve pH değeri 7'yi geçtiğinde antosiyaninler degradasyona uğrarlar. Bu yüzden antosiyanin özütlemesi yapılan çalışmalarda asitlendirilmiş ortam kullanılmaktadır ve pH kontrolü özütleme verimini etkilemektedir. Ancak güçlü asidik ortamlarda glikozit bağları hidrolize olabilmektedir. Antosiyaninler çözücü içerisinde kararsız olmalarına rağmen çözeltiye ko-pigmentler, metalik iyonlar ve hatta antioksidanlar gibi bazı bileşiklerin eklenmesiyle antosiyanin stabilitesini artırmaktadır [28]. Antosiyaninlerin stabilitesi için sıcaklık da önemli faktördür. Vişne suyu ve nar suyu konsantrelerindeki antosiyaninlere sıcaklığın etkisinin araştırıldığı bir çalışmada depolama sıcaklığı arttıkça antosiyaninlerin parçalanma hızının arttığı tespit edilmiştir [26].

Antosiyaninlerin, renk verme özelliklerinin yanı sıra güçlü nöronal hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, şeker hastalığı, inflamasyon, kanser, diyabet gibi birçok hastalığın önlenmesine yardımcı olan güçlü antioksidan etkiye sahiptir. Reaktif oksijen ve azot molekülleriyle kolaylıkla reaksiyona girerek DNA ve proteinlerin zarar görmesini ve lipidlerin oksidasyonunu önlerler. Ayrıca kanda trombosit agregasyonunu da önlerler. Antosiyaninlerin kanser tedavisinde ve insan beslenmesinde etkili olduğu rapor edilmiştir. Hücre döngüsünün S2 ve G2 fazları arasında hücre gelişimini durdurarak tümör gelişiminin bastırılmasında etkili olduğu bildirilmiştir. Antosiyaninlerin kan damarlarını

dinlendirdiği ve kan damarları duvarlarını kaplayan endotel hücrelerinin bütünlüğünü koruduğu bulunmuştur [29].

2.4.2 Kırmızı lahana

Kırmızı lahana, *Brassicaceae* familyasına ait bir sebze olup dünyanın çeşitli bölgelerinde yetişmesine rağmen, doğal yetiştirme alanı Akdeniz bölgesi ve Avrupa'nın güneybatısıdır [30]. Türkiye'de Tük verilerine göre 2007 yılından itibaren kırmızı lahana üretimi artış göstermektedir. En son alınmış Tük verilerine göre 2017 yılında yıllık kırmızı lahana üretimi 188316 tondur [31].

Kırmızı lahana, mineraller, vitaminler, oligosakkaritler ve antosiyaninler ile flavonoller ve glukosinolatlar (GSL'ler) gibi biyoaktif maddeler açısından zengin olduğundan yüksek besin değeri dolayısıyla insan sağlığı üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir [32]. Lahanada, ana GSL'ler bileşenleri sinigrin, glucobrassicin progoitrin, glukonapin ve glukorafanindir. Diğer GSL'ler ise sadece eser miktarda bulunur. Lahanada bulunan GSL'ler ve parçalanma ürünleri (örn., Sülföröfan için öncü olarak glukosfanin), glutatyon redüktaz ve kinon redüktaz gibi detoksifikasyon enzimleriyle uyarılması yoluyla insan ve hayvan hücrelerindeki kanser riskini azaltmak için kullanılmıştır [33].

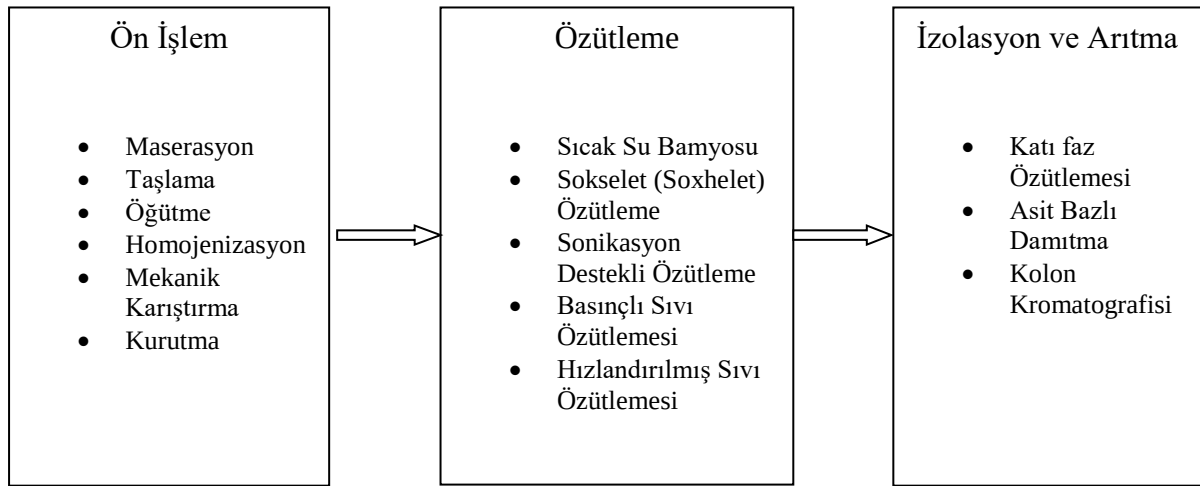
Flavonoid grubuna ait antosiyaninler, birçok sebzenin, meyvelerin, çiçeklerin, yaprakların, köklerin ve diğer bitki depolama organlarının parlak kırmızı, mor ve mavi renkleri gibi güzel renklerden sorumludur. Kırmızı lahanadan elde edilen antosiyaninler (*B. oleracea* convar. *Capitata* var. *Rubra* DC), Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da turptan sonra en fazla kullanılan sebzedir ve önemli bir stabiliteye sahiptir [33]. Antosiyaninler, karmaşık hidroksilasyon, metoksilasyon, glikozilasyon ve asilasyon paternleri ile karakterize edilen maddelerdir. Bu faktörler, karakteristik bir antosiyanin paterni oluşturmak için bitki türleriyle bağlantılıdır. Kırmızı lahana da kendi karakteristik antosiyanin modeline sahiptir [32]. Kırmızı lahanalardaki ana antosiyaninler, siyanidin-3-O-diglukozit-5-O-glikozit çekirdeği bazında tanımlanmıştır, bunlar p-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitlerle açillenmemiş, mono-açillenmiş veya di-açillenmiş olabilirler [33]. Kırmızı lahanada bulunan asilatlanmış antosiyaninler dahil olmak üzere flavonoidler, reaktif oksijen türleri ve elektrofillerden toplayıcılar olarak ve metal iyonlarının kenetleyicileri olarak in vitro olarak hareket edebilirler [30].

Kırmızı lahana (*Brassica oleracea L.*) antosiyaninlerinin benzersiz olması ve çok geniş bir pH aralığında renk sergilemesi nedeniyle gıdaların renklendirilmesinde kullanılan antosiyaninlerin kaynaklarından biridir. Üzüm püresi, siyah frenküzümü ve mürver gibi diğer kaynaklardan elde edilen antosiyaninler, sadece pH < 4'te makul bir renk derecesine sahiptir. Oysa kırmızı lahanalardan elde edilen antosiyaninlerin renkleri, düşük pH'da kırmızı, yüksek pH'da mavi ve yeşil arasında değişen geniş renk yelpazesine sahiptir. Bu nedenle kullanımları asidik gıda maddeleriyle sınırlı değildir, aynı zamanda nötr ürünlere de kullanılabilir. Bu nedenle sentetik renklendiricilere doğal bir alternatif sağlama potansiyeline sahiptirler. Kırmızı lahana antosiyaninleri şu anda içecekler, şekerler, kuru karışık konsantreler, sakızlar, yoğurtlar ve soslarda çeşitli renk için kullanılırlar [34]. Kırmızı lahana tüketiciler tarafından tadı ve gıdaların estetik değerini artıran yoğun bir kırmızı renk kaynağı olarak değerlendirir. Bu nedenlerle kırmızı lahana, taze kesilmiş salatalar şeklinde yaygın ve sık tüketilen bir sebzedir. Buna ek olarak, kırmızı lahana yüksek raf ömrü ile karakterizedir, bu nedenle tüm yıl boyunca taze bir biçimde kolayca saklanabilir ve kullanılabilir [32].

2.5 Flavonoidlerin Özütlenmesi

Fenolik bileşiklerin gıdalardan özütlenmesi için örneğin hazırlanması oldukça önemli bir aşamadır. Bazı gıdalarda, herhangi bir özütleme prosedürüne gerek duymadan sadece örneğin filtrelmesiyle analiz gerçekleştirilebilmektedir. Bununla birlikte, daha karmaşık yapıdaki örneklerin özütlenmesi için farklı yöntemlere ihtiyaç duyulabilmektedir. Polarite, kimyasal yapı, örnekteki göreceli miktarlar ve yapının karmaşık olması açısından fenolik bileşikler için ekstraksiyondan önce örnek işlem için standart bir prosedür yoktur [7].

Uygulamalarda her bir örneği ayrı ayrı dikkate almak yerine belirli ihtiyaçlara göre en uygun prosedürler seçilmelidir. Örneğin, genellikle katı örnekler özütlemeye tabi tutulmadan önce öğütülmeli veya homojen hale getirilmelidir. Çoğu zaman, bu işlemlerden önce örnekler kurutulmaktadır. Bu adımların ana amacı, temsili bir örneğe sahip olmak ve partikül büyüklüğünü azaltarak yüzey alanı ile birlikte, özütleme verimi yükseltmektir [7]. Aşağıdaki şekilde, özütleme ön-aşamaları, çeşitli özütleme işlemleri ve ardından gerçekleştirilebilecek izolasyon ve saflaştırma aşamaları görülmektedir.



Şekil 2. 5 Flavonoidlerin ekstraksiyonunda rol oynayabilecek farklı adımlar [35]

Özütleme prosedürü, Şekil 2.5'de gösterildiği gibi ön işlem, özütleme ve izolasyon-saflaştırma olarak üç adımda gösterilebilmektedir. Flavonoid içeriğinin belirlenmesinde ön işlemler oldukça önemlidir. Ön hazırlık aşamaları, maserasyon, homojenizasyon, öğütme veya kurutma gibi işlemleri içermektedir. Kurutma işlemi genel olarak flavonoidlerin bozulmasını önlemek için dondurarak kurutma şeklinde uygulanmaktadır. Kurutma işlemi hammaddenin birim ağırlığını azaltmak, raf ömrünün uzatmak, gerekli alanı azaltmak ve işleme kolaylığı sağlamak gibi birçok avantaj sağlamaktadır. Maserasyon, öğütme ve homojenizasyon gibi ön işlemler ise çözücü ile çözünen madde arasındaki temas yüzeyini artırdığından özütleme verimini artırmaktadır. Vorteksleme, santrifüjleme, mekanik karıştırma ve sürekli döner özütleme gibi işlemler moleküler etkileşimi artırmaktadır. Flavonoidlerin sahip olduğu polarite, asitlik, hidroksil gruplarının ve aromatik halkaların varlığı gibi karmaşık özelliklerden dolayı özütlemenin yapıldığı çalışmalarda stabil bir ön işlem seçimi söz konusu değildir [36]. Ayrıca gıdaların biyolojik matrisi her bir kaynaktan farklılık göstermektedir. Örneğin aynı çeşit üzümün biyolojik matrisi yetiştirildiği koşullara bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

Uygulanacak ekstraksiyon yöntemi, kaynağa ve özütlenecek flavonoid türüne uygun seçilmelidir. Özütleme yönteminde en yüksek verim elde edilmeli ve özütlenecek bileşiklerin bozulma oranı en düşük seviyede olmalıdır.

Çözücü özütleme yöntemi, geleneksel flavonoid özütlemesinde kullanılan en yaygın yöntemdir. Çözücü özütleme yöntemlerinden; sıcak su banyosu ve sokselet özütleme yöntemi flavonoidlerin de dahil olduğu birçok bileşiğin özütlenmesinde en sık kullanılan

yöntemlerdir. Sokselet özütleme yönteminin en büyük dezavantajı uzun süreli olması ve yüksek sıcaklık uygulamasının termolabil bileşiklerin geri kazanımını düşürmesidir. Ayrıca yöntemde kullanılan çözücünün fazla olması sürdürülebilirlik ve çevre koruması açısından sorun teşkil etmektedir [36; 37; 38].

Ultrason destekli özütleme yöntemi de flavonoidlerin özütlenmesi için kullanılmaktadır. Ultrason destekli özütlemeye, ultrason kullanımı (20 kHz'den daha yüksek frekanslara sahip ses dalgaları), yüksek özütleme verimine sebep olan çözelti penetrasyonun artmasıyla birlikte bitki hücre duvarını yıkabilmektedir. Ultrasonik destekli özütleme sırasında sıcaklığın düşük kalması; termolabil bileşikler için uygun olup özüt verimini artırmaktadır [35]. Kırmızı lahanadan antosiyanin özütlenmesinin yapıldığı çalışmada ultrasonik özütleme veriminin konvansiyonel özütlemeye göre % 11,92 lik artış gösterdiği belirlenmiştir [39].

Özütlemeye yaygın olarak kullanılan geleneksel teknikler; yüksek çözücü kullanımı, yüksek maliyet, çevresel sürdürülebilirliği azaltma ve termal bozulmaya sebep olan yüksek proses süresi gibi birçok dezavantajlara sahiptir. Ayrıca özütleme sırasındaki yüksek oksijen varlığı ve ışık hedef bileşikler bozmakta ve özütleme verimini düşürmektedir. Bu nedenle basınçlı sıvı özütleme yöntemi, hızlandırılmış sıvı özütleme yöntemi, subkritik sıvı özütlenmesi ve süperkritik özütleme, mikrodalga destekli özütleme gibi daha yeni özütleme yöntemleri kullanılmakta böylece özütleme verimini artmakta ve söz konusu olumsuzluklar yok edilebilmektedir [35].

Basınçlı sıvı özütleme yöntemi son yıllarda flavonoid özütlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem; nispeten yüksek sıcaklığın ve basıncın muhafaza edildiği ve özütleme süresini diğer yöntemlere göre % 50 den daha çok azaldığı kontrollü bir yöntemdir [40]. Yüksek basınç ve sıcaklık çözücünün biyolojik matris içine geçilebilirliğini artırarak özütleme verimini artırır. Proses ışık ve oksijen olmadığından hedef bileşiklerin bozulmasını önlemekte ve daha az çözücüye ihtiyaç duymaktadır [35].

Hızlandırılmış çözücü özütleme, sıcaklığın 50-200 °C ve basıncın 10-15 MPa arasında olduğu, sıvı çözücünün kullanıldığı basınçlı çözücü özütleme yöntemidir. Çözücü olarak genellikle organik çözücüler kullanılmaktadır. Özütleme ortamı olarak su kullanılmaktadır. Kullanılan basıncın yüksek olması çözücünün kaynama noktası üzerinde kullanılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle yüksek sıcaklıklarda su polaritesini kaybederek hem polar hem polar olmayan bileşikler için kullanılabilir çözücü haline gelmektedir. Subkritik özütleme ve basınçlı sıcak su özütlenmesi olarak da bilinen bu yöntem flavonoidlerin özütlenmesinde etkili bir şekilde kullanılmıştır [35].

Süperkritik sıvı özütleme yöntemi, biyoaktif bileşiklerin özütlenmesi için kullanılan bir diğer yöntemdir. Süperkritik durum; sıcaklığın ve basıncın kritik değerlerinin üzerine çıktığı haldir ve bu durum akışkanlığı artırmaktadır. Çözücü olarak çevre dostu CO₂ kullanılmaktadır. CO₂ polar olmayan bir çözücü olduğundan polar olmayan bileşiklerin özütlenmesinde etkili bir yöntemdir. Polar bileşiklerin çözünürlüğünü arttırmak için ise çözücü olarak kullanılan CO₂'ye ek olarak metanol, etanol, asetonitril, aseton, su, etil eter ve diklorometan gibi çözücüler eklenebilmekte böylece yöntemin seçiciliği artmaktadır. Seçilen çözücü türünün hedef bileşiğe uygun olması özütleme verimini artırmaktadır. Çok polar bileşikler için bu yöntemin verimliliği düşüktür [35].

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, biyoaktif bileşiklerin bitki matrislerinden ayrılması için popüler hale gelen bir başka gelişmiş ekstraksiyon yöntemidir.

2.6 Mikrodalga destekli özütleme (MDÖ)

300 MHz-300 GHz arasındaki frekans aralığında bulunan mikrodalgalar, düşük frekansta radyo frekans aralığı ve yüksek frekansta kızılötesi dalgalar arasında yer alan iyonize edici olmayan elektromanyetik (EM) dalgalardır [41]. Endüstriyel uygulamalarda, 915 MHz frekans tercih edilirken; ev tipi mikrodalga fırınlarda, özütleme ve analitik kimya uygulamalarında ise genellikle 2450 MHz frekans olarak seçilmektedir [35].

Mikrodalga destekli sistemlerde EM enerjinin dağılımı, uygun sınır koşullarına sahip Maxwell denklemleri ile tanımlanmaktadır. Örneklerin dielektrik özellikleri, Maxwell denklemlerini etkileyen en önemli parametrelerdir. Bu sebeple, örneklerin dielektrik özellikleri EM enerjinin verimliliği, dağılımı ve örnek içinde ısıya dönüşmesini doğrudan etkilemektedir. Bir örneğin dielektrik özelliklerini tanımlamada, aşağıdaki eşitlikte (Eşitlik 1) de ifade edilen kompleks relatif dielektrik permitivite (boşluğa göre) kullanılmaktadır;

$$\epsilon^* = \epsilon' - j\epsilon'', \quad j = \sqrt{-1} \quad (1)$$

Eşitliğin gerçek kısmını temsil eden dielektrik sabiti, ϵ' materyalin EM enerjiyi depolayabilme ve kompleks kısımdaki dielektrik kayıp faktörü, ϵ'' ise EM enerjinin termal enerjiye dönüştürebilmesini temsil etmektedir. Dielektrik kayıp faktörünün, dielektrik sabitine bölümü ise ($\tan \delta_e = \epsilon''/\epsilon'$), mikrodalga gücünün biyolojik yapı içinde sönümlenmesini belirtmektedir. EM alana maruz kalan bir örneğin bu enerjiyi termal enerjiye dönüştürebilmesi, dielektrik kayıp faktörü ile doğru orantılı olmaktadır [35;41].

Her mikrodalga sistemi normal olarak üç temel parçadan oluşmaktadır: mikrodalga kaynağı, dalga yönlendiricisi ve aplikatör. Mikrodalga kaynağı magnetron, merkezinde elekton emici bir katot bulunan bir vakum tüpü olup; kaviteler (boşluklar) oluşturan bir anot yapısı ile sarılmıştır. Mikrodalga ısıtma sırasında, enerji aktarımı iki yöntemle (dipolar rotasyon ve iyonik iletim), yani EM alana maruz kalan dipollerin dönüşleri ve mevcut yüklü iyonların yer değiştirmesi yoluyla gerçekleşmektedir [41].

Mikrodalga ısıtma süresince, biyomateriyal içinde, yapının gözenekliliğini geliştiren ve dokuların fiziksel özelliklerini değiştiren önemli miktarda basınç oluşmaktadır. Bu şekilde, özütleme sırasında çözücünün yapıya daha iyi nüfuz etmesi sağlanmaktadır. Mikrodalgaların basınç oluşturma etkisi, genel olarak hücreleri şişmeye ve bölmeye zorlamaktadır. Zhongdong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada portakal kabuğundan pektinin mikrodalga destekli özütlenmesi sırasında parçalanma derecesinin geleneksel yöntemle göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Geleneksel özütleme yönteminde, pektin esas olarak küme formasyonunda kalırken, mikrodalga özütlemesinde küme formasyonu kırılmış ve pektin kristallere benzer bir şekilde partikül haline gelmiştir [42]. Mikrodalga ısıtma hem çözücü kullanarak/kullanmadan bileşiklerin özütlenmesinde; hem de bir ön-işlem şeklinde kullanılabilir. Roberts ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, elmanın ön-işlem olarak mikrodalga kullanılarak ısıtılması, son ürün elma suyunda flavonoid içeriğinin daha yüksek olmasını sağlamıştır [43].

Mikrodalga destekli özütleme işlemini etkileyen önemli bazı parametreler bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri, çözücü tipi, çözünen/çözücü oranı, sıcaklık, mikrodalga gücü, süre ve özütleme yapılacak materyalin özellikleridir (su içeriği, partikül boyutu vb.) [7].

Çözücü tipi

Çözücü, bir özütleme işleminde özellikle de mikrodalga destekli özütlemelerde en önemli faktörlerden biri olmaktadır. Genel olarak, dielektrik sabiti ve dielektrik kaybı arttıkça, çözücünün mikrodalga enerjisini absorbe etme kapasitesi yükselir ve bu da çözücü maddenin bitki materyaline göre daha hızlı ısınmasına yol açabilir. Ancak çözücü özellikleri, farklı bileşikler için çözücünün değişken seçiciliğine yol açan farklı çözücüler birleştirilerek modifiye edilebilir [35]. Özütleme verimliliği, analitlerin kullanılan çözücü içindeki çözünürlüğüne bağlı olmaktadır. Örneğin, yapılan bir çalışmada etanol/su karışımının (50:50, v/v) çay gibi polifenollerce zengin gıdalarda iyi bir özütleme çözücüsü olduğu gözlemlenmiştir [7].

Mikrodalga destekli özütlemelerde polar ve/veya polar olmayan çözücüler kullanılabilir [35]. En sık kullanılan çözücü tipleri Çizelge 2.2'de verilmektedir.

Çizelge 2. 2 Mikrodalga destekli özütlemelerde en sık kullanılan çözücü tipleri [44]

Çözücü	ϵ'	ϵ''	$\tan \delta (x10^4)$
Aseton	21.1	11.5	5555
Asetonitril	37.5	2.3	620
Etanol	24.3	6.1	2500
Etil asetat	6.02	3.2	5312
Hekzan	1.89	0.00019	1
Metanol	23.9	15.3	6400
Su	76.7	12.0	1570

Flavonoidler farklı polaritelerde olduklarından özütlemelerde kullanılan çözücüler yüksek oranda polar veya daha az polar olabilmektedir. Flavonoid aglikonlarının özütlenmesi için daha az polar çözücüler kullanılırken, flavonoid glikozitlerin ve antosiyaninin özütlenmesi için daha polar çözücü kullanılır. Benzen, kloroform, eter ve etil asetat, izoflavonlar, flavanonlar, dihidroflavonoller, flavonlar ve yüksek derecede metillenmiş flavonoller gibi daha az polar aglikonların özütlenmesi için kullanılan yaygın çözücülerdir. Hidroksile flavonlar, flavonoller, biflavoniller, oronlar ve kalkonlar gibi daha polar flavonoid glikozitler geleneksel olarak asetona, alkol veya su kullanılarak ekstre edilir. Hem polar aglikonların hem de flavonoid glikozitlerin mikrodalga destekli özütlenmesinde yaygın olarak kullanılan çözücüler arasında, su ile seyreltilerek elde edilen farklı konsantrasyonlara sahip metanol veya etanol bulunmaktadır [35]. Mikrodalga destekli özütleme için asetona ve kloroform gibi çözücüler de kullanılmaktadır. Çözücülerin konsantrasyonundaki değişim, aynı zamanda kuersetin ve rutin farklı konsantrasyonlarda etanol kullanılarak yapılan mikrodalgada özütlenmesinde gözlenen flavonoid ekstraksiyonunu da etkilemektedir. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada etanol konsantrasyonu %30' dan %50' ye çıkarıldığında özütleme veriminin arttığı, etanolün seyreltilmesiyle de verimin azaldığı tespit edilmiştir [45]. Farklı seyreltme oranlarının özütleme verimliliğini etkilediğini gösteren bir çok çalışma bulunmaktadır. Çözücü sistemi dışında, pH değerinin de önemli olduğu gözlenmiştir.

Bilim insanları, çevresel etkilerinden dolayı çözücü sistemleri ve hacmi konusunda daha hassas olmaya başladıklarından beri, mikrodalga destekli özütlemenin iyi bir alternatif

olduğunu düşünmüşlerdir. Bununla birlikte, bir kapalı-kap mikrodalga özütleme sisteminde, daha büyük bir çözücü hacmi kullanıldığında ısıtmanın daha hızlı olduğu da bildirilmiştir [35]. Ayrıca Du ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, *Psidium guajava* Linn. yaprakları ve *Smilax china* yumrularından ekstrakte edilen kuersetin gibi flavonoidler dahil olmak üzere polifenolik bileşiklerin mikrodalga destekli özütlemesi için iyonik sıvı çözeltilerinin etkin potansiyel çözücüler olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir [46].

Çözünen/çözücü oranı

Sıvı-katı oranı, özütlemeyi gerçekleştirmek için gereken çözücü hacminin yanı sıra her bir özütleme için kullanılan örnek miktarının eş zamanlı optimizasyonuna izin veren önemli bir parametredir. Analitlerin geri kazanımını artırmak için bu hacim mümkün olduğu kadar düşük tutulmalıdır. Çözelti-örnekleme oranlarının 20:1 (ml g⁻¹) oranının fenolik bileşikler için yeterli olduğu gösterilmiştir [7].

Özütleme Sıcaklığı

Özütleme sıcaklığı, MDÖ'de kullanılan mikrodalga gücü ile yakından ilişkili bir parametredir; çünkü EM enerji uygulanması, çözücünün sıcaklığında ve dolayısıyla örnek sıcaklığında bir artışa neden olacaktır [35].

Yüksek sıcaklık, çözücü içinde moleküller arası etkileşimlerin artmasına neden olmaktadır. Sıcaklığın artmasıyla hücre yapısı içinde basınç birikmesine olmakta ve bu basınç özütlenebilecek bileşenlerin kullanılabilirliğini artırmaktadır. Dahası, yüksek sıcaklıkta, çözücünün viskozitesi azalıp hareketliliği ve çözünürlüğünü arttığı için özütleme verimi artmaktadır. Bununla birlikte, bazı durumlarda, özütleme veriminin, optimum sıcaklık ve katı/çözücü oranı elde edilinceye kadar sıcaklıkla arttığı daha sonra sıcaklıktaki daha fazla artışla azalmaya başladığı görülmüştür. Bu her bileşiğin bozunma sıcaklığı farklı olduğu için özütlenecek bileşik tipine göre değişir. Yüksek güç seviyelerinin uzun süreli uygulanmasıyla indüklenen yüksek sıcaklığın veya yüksek sıcaklığın uzun süreli uygulanması, bozulmaya ve sonrasında verim ve kalitedeki azalmaya neden olabilir [35].

Liazid ve arkadaşları mikrodalga özütlemesi sırasında fenolik bileşiklerin stabilitesini araştırmışlardır. Çeşitli fenolik bileşiklerin (benzoik asitler, benzoik aldehytler, sinnamik asitler vb.) incelendiği çalışmada tüm bileşiklerin 100 °C' de stabil olduğu gözlenirken 125 °C' de epikateşin, resveratrol ve mirisetinin önemli ölçüde bozulduğu gözlenmiştir. Daha fazla sayıda hidroksil tipi ikame ediciye sahip olan bileşiklerin yüksek sıcaklıkta özütleme koşulları altında daha kolay ayrıldığı sonucuna varılmıştır. Çalışma sırasındaki çalışma sıcaklığı 50°C ile 175°C arasında değişmiştir [47]. Benzer şekilde, sıcaklık 90°C'den 110°C'nin üzerine çıkarken flavonoidlerin veriminin dikkat çekici bir şekilde arttığı,

sıcaklığın 110°C'nin üzerine çıkmasıyla verim artışında azalma olduğu ve özütün yandığı gözlemlenmiştir [48].

Mikrodalga gücü

Gelen mikrodalga gücünün yoğunluğu, sıcaklığını artırmak için dielektrik malzemede ısı enerjisine dönüştürülen numuneye verilen enerji miktarını kontrol eder. Etkileşimleri ve denge oranını etkiler ve numune ile çözücü arasındaki analitlerin bölünmesini kontrol eder. Genel olarak, mikrodalga gücünde bir artış olduğunda özütlenecek bileşiğin veriminde bir artış olduğu belirtilmiş, kısa süre yüksek güç uygulamasının; uzun süre-düşük güç uygulamasından daha etkili olduğu gözlenmiştir. Ancak ısınlama süresinin ve yüksek mikrodalga gücünün birlikte artırılması, fenollerin termal bozunmasına yol açabilmektedir. Fenolik bileşiklerin özütlenmesi için 600-700 W'a kadar güçler kullanılmıştır. Örneğin, 600 W kullanılarak, iki farklı sıcaklık değerinin (80-100°C), çeşitli fenolik bileşiklerin özütlenmesi için yararlı olduğu gösterilmiştir. 100 °C, çaydan hidroksisamik asitlerin çıkarılması için daha verimli iken, 80 °C spesifik çay flavanollerinin termal olarak korunması için daha iyidir [49]. Yapılan çalışmalara göre optimum özütleme süresinin seçimi de uygun gücün seçimi ile yakından ilişkilidir [7].

Yapılan bir çalışmada mikrodalga gücü 200-1000 W arasında arttırıldığında, *Radix astragali*'den elde edilen flavonoidin özütleme verimi arttığı gözlenmiştir. Ancak, yüksek mikrodalga gücü ürün sıcaklığını aşırı yüksek tutabilir ve ürün hasarı veya bileşik parçalanması yoluyla özütleme verimini azaltabilmektedir. Ek olarak, özütleme süresi uzatıldığında, flavonoid verimindeki azalmayla güç artışının doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir [35].

Özütleme süresi

Yapılan çalışmaların çoğunda, özütleme veriminin, özütleme süresinin uzamasıyla artma eğiliminde olduğu, ancak belli bir noktadan sonra, sürenin artışıyla sıcaklık da arttığından verimdeki artışın azaldığı görülmüştür [35]. Fenolik bileşikler elde etmek için uygulanan tipik mikrodalga destekli özütleme süreleri 2 dakika civarındadır. Bu nedenle, bu teknik sadece klasik ve geleneksel özütleme teknikleriyle değil, diğer gelişmiş özütleme teknikleriyle de kıyaslandığında çok hızlı bir özütleme yöntemi olarak düşünülebilir. Örneğin, 30 saniye fıstık kabuklarında bulunan fenolik bileşiklerin (su içinde 37.5 ml %30 etanol kullanarak) özütlenmesi için yeterli olmuştur [50].

Xiao ve ark'nın yaptığı çalışmada, *Radix astragali*'den (Goji berry) flavonoidlerin özütlenmesi sırasında 25 dakikaya dek verim artmış ve daha sonrasında azalma göstermiştir [48]. Etanol ve metanol gibi polar çözücülerin ısınma oranı, nispeten yüksek

dielektrik özelliklere sahip olduklarından oldukça yüksektir. Ayrıca çözücünün su ile daha fazla seyreltilmesi, çözücü kombinasyonunun ısıtma kapasitesini artırır ve mikrodalga uygulamasının uzun süreli uygulanmasıyla çözücü sistemi aşırı ısındığından hedef bileşiklerde bozunma meydana gelebilir [35].

Materyal özellikleri

Parçacık büyüklüğünün de özütleme sonucu üzerinde büyük etkisi vardır [7]. Bitki materyalinin temas yüzey alanı arttığında genellikle özütleme verimi de artar. Bu nedenle, numune hazırlama aşamaları öğütme ve homojenizasyon aşamalarını içerir, böylece biyolojik hücresel matrisin çözücü ile etkileşimi artar [35]. Numunenin partikül büyüklüğünün azaltılması kütle transfer oranını artırdığından numunenin parçacık boyutu başka olumsuzluklara sebep olmayacaksa mümkün olduğunca küçük tutulmalıdır [7]. Küçük örnek boyutları, seyreltmenin neden olduğu hassasiyet kaybının üstesinden gelmek için özütlerdeki bileşik konsantrasyonlarının korunmasında yardımcı olur. Düşük hacimli çözücülerle ekstraksiyon, bu çözücülerin buharlaştırılması için gereken süreyi azaltır, ki bu da analitik araştırmalardaki ilerlemenin bir sonraki aşaması olabilir. Bu aynı zamanda çözücünün buharlaşması için gereken uzun süreli ısıtma süresinde bileşiklerin bozunmasını da engellemektedir. Mikrodalga destekli özütlemenin yapıldığı bir çalışmada tekdüze bir temas yüzeyi numunesi elde etmek için kurutmadan önce karıştırılmış numune bir elek içinden geçirilmiş ve yine, *Annona squamosa* ve *Carica papaya* tohumlarından elde edilen flavonoidlerin özütlenmesi için ince öğütülmüş tohumlar kullanılmıştır [35].

Mikrodalga destekli özütleme, Ganzler ve diğerleri tarafından ilk kez 1986 yılında kullanılmış ve son zamanlarda gelişmiş özütleme teknikleri arasında yerini almıştır. Geleneksel özütleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında, mikrodalga özütleme çok daha az zaman almaktadır. Örneğin, sokselet özütleme tekniği çoğu özütleme için en az 1 saat sürmekte bazen bu süre 12-24 saate kadar çıkmakta ve çok fazla çözücü kullanmaktadır. Mikrodalga özütlemesi ise yaklaşık 30 dakika veya daha az süre kullanarak özütleme için gereken zamanı önemli ölçüde azaltır ki bu çok önemli bir faktördür [35].

Sokselet gibi uzun süreli özütleme periyotları ve yüksek sıcaklık maruziyeti özütün kalitesini önemli ölçüde etkileyebilir. Isıya karşı hassas bileşikler, uzun süreli işlem sırasında kayba uğrayabilir. Ancak mikrodalga özütlemesi durumunda, işlem daha hızlı olduğu için, biyoaktif bileşiklerin verimi basınçlı sıvı özütleme, süperkritik sıvı özütleme ve subkritik özütleme gibi modern özütleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında genellikle daha yüksektir [35]. Geleneksel özütlemenin bir başka dezavantajı, yöntemin uzun süreli özütleme sırasında flavonoid glikozitlerin bütünlüğünü etkilemesi ve böylece

tekrarlanabilirliği ve stabiliteyi olumsuz etkilemesidir [35]. Flavonoidlerin degradasyonu mikrodalga destekli özütlenme sırasında önlenmektedir. Örneğin, *Radix astragali*'den izoflavonoidler ve saponinlerin elde edildiği geleneksel özütlenmesi sırasında, flavonoid glikozit malonatların, özütlenme süresinin uzamasıyla, ilgili glikozitlere dönüştürüldüğü ve böylece tekrarlanabilirliği etkilediği gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, mikrodalga destekli özütlenme yönteminin kullanımıyla glikozidik dönüşüm engellenmektedir. Analitik prosedürlerin tekrarlanabilirliğindeki artış araştırmacıları analitik araştırma ve bileşik niceleme uygulamalarında daha iyi sonuçlara ulaştırır. Genel olarak, flavonoidlerin stabilitesine ilişkin analizler; araştırmacıların fenoliklerin bozunma sıcaklığını tahmin edebilmelerine yardımcı olduğundan, özütlenmeden önce gerçekleştirilir. Bu işlem ekstraksiyon için uygun sıcaklığının belirlenmesine ve sürecin doğru optimizasyonuna olanak sağlar [35].

Yıllar içinde, oluşturulan mikrodalga özütlenme metotlarının modifikasyonları ve optimizasyonu, flavonoidlerin bozulmasının önlenmesi açısından daha iyi sonuçlar vermiştir. Örneğin *Herba epimedi*'den flavonoidlerin özütlenmesi için dinamik modda mikrodalga ısıtma tekniği ile bir cihaz yapılandırılmıştır [35]. Chen ve arkadaşları bir laboratuvar TM010 mikrodalga rezonans boşluğu icat etmiş ve yoğun mikrodalga enerjisi kullanmışlardır. Özütlenme verimini artırmak için gerekli güç önemli ölçüde azaltılmış ve enerji tasarrufu sağlanmıştır. Yöntem, basınçlı mikrodalga destekli özütlenme, ultrasonik özütlenme, ısı geri akımlı özütlenme ve sokselet özütlenme gibi diğer özütlenme yöntemleri ile karşılaştırıldığında, mikrodalga fırın çıkarıcıdan sürekli taze çözücü akışının olduğu dinamik mikrodalga destekli özütlenme (DMDÖ) ile elde edilen *Herba epimedium*'daki flavonoidlerin özütlenme veriminin, diğer yöntemlerle elde edilenlerden daha yüksek olduğunu tespit edilmiştir [35].

Mikrodalga kullanımının bir diğer önemli avantajı, polar olan ve olmayan bileşiklerin mikrodalga destekli özütlenme sırasında eş zamanlı çıkarılabilmesidir. Eşzamanlı MDÖ polar (biyofenoller) ve polar olmayan (yağ asitleri) bileşikler alperujodan (zeytinyağı endüstrisinde kullanılan iki fazlı dekantasyon işleminden elde edilen bir kalıntı), kısa bir işlem süresinde iki uygun özütlenme çözücüsü karışımı kullanılarak başarıyla ayrıştırılmıştır. Polar çözücülerin kullanılması çözücü/biyolojik matrisin verimli ısıtılmasına ve flavonoidlerin daha hızlı ekstraksiyonuna yol açmıştır [35]. Ayrıca, MDÖ'nün en büyük avantajlarından biri de kullanılan organik çözücü miktarını azaltıyor olmasıdır. Ayrıca kaçan buharı yoğunlaştırmak için sürekli bir donma suyu akışına sahip bir kondansatörün kullanılmasıyla kullanılan organik çözücüler tekrar tekrar özütlenme

işlemine geri döndürülebilmektedir. Teknoloji, 0,1 g kadar küçük numunelerdeki analitlerin belirlenmesine olanak sağladığı için, küçük numuneler için mikro-destekli özütleme kullanımı gibi avantajı da vardır [35].

Geleneksel flavanoid özütlemelerinde çözücüye genellikle bir asit ilavesi söz konusudur. Mikrodalga destekli özütlemenin kullanılması, çoğu durumda, bir asit ihtiyacını azaltabilmektedir. Bununla birlikte, antosiyaninlerin özütlenmesi için asitlerin kullanıldığı durumlarda, daha az konsantre asitler; geleneksel verim yöntemlerine kıyasla mikrodalgada nihai verimi etkilemeden kullanılabilir. Daha seyreltik asitlerin kullanılması, reaksiyonda hızlı ve aşırı basınç birikmesinin neden olduğu güvenlik tehlikelerini azaltır. Seyreltik asitlerin oksitleyici gücü daha düşük olabilir, ancak daha fazla su olduğu için daha fazla mikrodalga enerjisi emer [35].

2.6.1 Fenolik bileşiklerin mikrodalga destekli özütlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar

MDÖ'nün diğer özütleme teknikleri ile karşılaştırıldığında gıdalardan fenolik madde özütlenmesinde sıklıkla kullanıldığı tespit edilmiştir. Genel olarak sağladığı daha az çözücü tüketimi, ekstraksiyon verimliliği ve hız gibi avantajlardan dolayı MDÖ, SLE veya Sokselet özütleme yöntemine göre daha uygun bir teknik olduğunu kanıtlamıştır [49;51]. Yang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, mor mısırlardan antosiyanin özütlenmesinde MDÖ yöntemini kullanmışlar ve konvansiyonel çözücü özütleme yöntemi ile kıyaslandığında MDÖ'nün yüksek verimle daha hızlı sonuçlar verdiği gözlenmiştir [52]. Benzer sonuçlar, üzüm kabuklarından ve duttan antosiyaninlerin MDÖ yöntemi ile özütlenmesi çalışmalarında da elde edilmiştir [53;54].

İnce ve arkadaşları melisa bitkisindeki fenolik bileşikleri tespit etmek amacıyla mikrodalga ve ultrason destekli özütleme yaptıkları çalışmada özütleme süresinin (mikrodalgada 5–20 dakika; ultrasonda 5-30 dk) ve katı-çözücü oranının (1:10, 1:20 ve 1:30 g mL⁻¹) TFM üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Ultrason ekstraksiyon için çeşitli güçlerin (% 50 ve % 80) etkilerinin de araştırıldığı çalışmada çözücü olarak su kullanılmıştır. MDÖ' de; özütlerde en yüksek TFM (145.8 mg GAE g⁻¹ kuru materyal), 5 dk/1:30 katı-çözücü oranında elde edilmiştir. Ultrason özütlemesi için ise en yüksek değer (105.5 mg GAE g⁻¹ kuru malzeme), 20 dk/% 50 güç/1:30 katı-çözücü oranı şartlarında elde edilmiştir. Mikrodalga ve ultrason özütlemenin optimum koşullarında elde edilen özütler sırasıyla, geleneksel özütleme ve maserasyon ile karşılaştırılmıştır. Özüt TFM ve TAK sonuçlarının

özütleme yöntemleri arasında MDÖ' de en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, MDÖ özütleme süresini % 83 azaltmıştır. 5 dakika süreyle 1:30 katı-çözücü oranı kullanılarak elde edilen bir mikrodalga özütünün TFM miktarı, geleneksel olarak elde edilen özüt ile karşılaştırıldığında, mikrodalga özütleme yönteminin daha kısa bir sürede daha yüksek bir fenolik içerik verdiği görülmüştür. Özütleme ortam sıcaklığının hem geleneksel hem mikrodalga destekli özütlemeye aynı olmasına rağmen (97 °C) mikrodalga özütünün toplam fenolik madde değeri (145.8 mg GAE g⁻¹ kuru materyal) konvansiyonel özütten (119.5 mg GAE g⁻¹ kuru madde) anlamlı düzeyde daha yüksek çıkmıştır [55].

Yang ve Zhai'nin yaptığı çalışmada mikrodalga destekli özütlemeye optimal koşulları elde etmek için Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Özütleme süresi, katı-sıvı oranı ve mikrodalga ışınlama gücü gibi çalışma koşullarının özütleme verimine etkisi, yanıt yüzey metodu (RSM) ile incelenmiştir. Mor mısır koçanından en yüksek toplam antosiyanin içeriği (185.1 mg / 100 g), 19 dakikada, 1: 20' lik bir katı-sıvı oranında ve 555 W' lık bir mikrodalga ışınlama gücünde elde edilmiştir. Siyanidin-3-glukozit, pelargonidin-3-glukozit, peonidin-3-glukozit ve bunların ilgili malonlanmış muadilleri olarak 6 temel çeşit antosiyaninlerin varlığı tespit edilmiş ve tanımlanmıştır. Geleneksel çözücü özütleme yöntemiyle karşılaştırıldığında MDÖ'nün, mor mısır koçanından antosiyaninlerin özütlenmesinde daha etkili ve hızlı olduğu gözlemlenmiştir. MDÖ'nün özütleme verimliliği üzerindeki etkilerini değerlendirmek için numuneler sırasıyla MDÖ ve geleneksel özütleme yöntemleriyle özütlenmiştir. Geleneksel özütleme 60 dakika gibi daha uzun bir süre için yapıldığında bile, toplam antosiyanin miktarı, MDÖ ile elde edilenden % 85.6 daha düşük olmuştur. Özütleme süresi arttıkça antosiyanin miktarı da artmıştır [56].

Yapılan bir başka çalışmada, MDÖ'nün, ekşi vişnelerden (*Prunus cerasus* var. *marasca*) antosiyanin ve fenolik asitlerin izolasyonu üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Toplam antosiyaninler ve toplam fenolik asitler üzerinde sıcaklığın (50-70 °C), özütleme süresinin (5-12 dakika) ve mikrodalga gücünün (350-500 W) etkisini incelemek için genel bir faktöriyel tasarım kullanılmıştır. En iyi mikrodalga destekli özütleme koşullarının antosiyaninler ve fenolik asitler için, özellikle sıcaklık ve süre açısından farklı olduğu tespit edilmiş ve dolayısıyla düşük sıcaklık (60 °C) ve daha kısa süre (6-9 dakika) antosiyanin özütlemesi için daha uygun iken, fenolik asitler için daha yüksek sıcaklıklarda (70 °C) ve daha uzun ışınlama süresinde (10 dk) daha yüksek özütleme verimi elde edilmiştir. En uygun mikrodalga gücü çalışılan bileşikler için önemli ölçüde, farklılık göstermemiş ve her ikisi için de değer 400 W civarı ölçülmüştür. Konvansiyonel özütleme

ile karşılaştırıldığında, mikrodalga destekli özütleme, çalışılan tüm bileşikler için daha yüksek etkinlik göstermiştir.

Vişne polifenollerini, geleneksel özütleme yöntemiyle MDÖ 'nün özüt verimliliği üzerindeki etkisini değerlendirmek için Cy-3-GR (siyanidin-3-glukozil rutinosid), TMA (toplam antosiyanin), ChA (klorojenik asit) ve TFM (toplam fenolik madde) için optimize edilmiş MDÖ prosedürü ile özütlenmiştir. İncelenen tüm bileşikler MDÖ özütlerinde daha yüksek konsantrasyonlarda çıkmıştır. Sun ve arkadaşları ayrıca, geleneksel özütlemeye özütleme süresi 12 ila 60 dakika arasında uzatılsa bile, MDÖ'nin kırmızı ahudududan elde edilen antosiyaninlerin özütlenmesi için daha verimli olduğunu bildirmişlerdir. Yang ve Zhai de benzer sonuçlar bildirmişlerdir, ayrıca MDÖ'nin özütleme süresine bakılmaksızın geleneksel yöntemden daha verimli olduğunu göstermişlerdir. MDÖ'deki yüksek verimin nedeninin genellikle mikrodalga ısıtma mekanizması olduğu ve bitki dokusunda lokal sıcaklık artışına neden olduğundan bitki dokularının bozulmalarına ve sonuç olarak fenolik bileşiklerin çevredeki çözücüye geçişine neden olduğu bildirilmiştir [57].

Zheng ve arkadaşlarının yaptığı, yaban mersini tozundaki antosiyaninlerin mikrodalga destekli özütleme ile elde edildiği çalışmada özütleme parametreleri olarak özütleme süresi, özütleme sıcaklığı, etanol konsantrasyonu ve katı-sıvı oranı seçilmiştir. Toz haline getirilmiş yaban mersininden gelen antosiyanin özüt verimi üzerindeki en önemli etki katı-sıvı oranı olmuş, bunu etanol konsantrasyonu ve özütleme sıcaklığı takip etmiş ve en az etki özütleme süresinin olmuştur. Yabanimersini tozundan en yüksek antosiyanin oranını (% 73.73) elde etmek için optimum parametreler; 7 dakika-47 °C, % 55.5'lik etanol konsantrasyonu (v / v) ve 1:34 (g / mL) sıvı oranı olmuştur [58].

Üzümde varlığı kanıtlanmış 11 antosiyaninin tespiti için Liazid ve arkadaşları sistematik bir çalışma yapmış ve yeni bir özütlee yöntemi kullanmışlardır. Mikrodalga destekli özütleme, özütlemeye antosiyaninlerin kromatografik tayinine bir önceki aşama olarak uygulanmıştır. Belirlenen özütleme koşulları altında antosiyaninlerin kararlılığı, üzüm kabuklarından standartlaştırılmış bir özüt kullanılarak kontrol edilmiştir. 50 ° C ila 150 ° C arasındaki sıcaklıklar kullanılmış ve altı farklı özütleme değişkeninin (çözücü (metanol ve su karışımları), karıştırma, özütleme sıcaklığı, özütleme süresi, mikrodalga gücü ve hacim) özütlemeye etkisini analiz etmek için bir fraksiyonel faktöryel deneysel tasarım geliştirilmiştir. Özütleme çözücüsünün, üzümlerden antosiyaninin geri kazanımı için en önemli değişken olduğu saptanmış ve son olarak özütleme süresinin analiz üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Bu yeni yöntemle, antosiyaninler; özütleme çözücüsü olarak su içinde, 100°C özütleme sıcaklığında, % 40 metanol kullanılarak, 5 dakikada üzümlerden

elde edilmişlerdir. Katı-sıvı maserasyon klasik yöntemi ve geliştirilen MDÖ yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen Tintilla de Rota üzüm çeşidinin özütlenme işlemlerinden önce aynı örnek hazırlama protokolü kullanılmıştır. Sonuçların aynı olduğu ve toplamda altı bileşik için istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu, bunlardan üçünün daha düşük geri kazanımlara sahip olduğu gözlemlenmiştir. MDÖ yönteminde analiz edilen bileşiklerin üçünün daha yüksek değere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bu yöntemle, klasik mettotla varlıkları gözlemlenemeyen malvidin 3-kumarolglukozit (cis), malvidin 3-kafeolglukozit, petunidin 3-p-kumarolglukozit bileşiklerinin miktarları belirlenebilmiştir. Mikroorganize yardımcı ekstraksiyon yoluyla üzümlerden antosiyaninlerin özütlenmesi üzerinde en önemli etkiye sahip olan değişkenin, özütlenme çözücüsü olduğu tespit edilmiştir. MDÖ yöntemiyle, 5 saatten 5 dakikaya kadar yapılan özütlemelerde kayda değer bir azalma gözlemlenmiş ve maserasyon özütlenme yöntemi ile bulunanlara benzer geri kazanımlar elde edilmiştir. Yeni yöntem kullanılarak, analiz edilen örneklerde, ölçülecek klasik yöntemle, önemli seviyelerde geri kazanılmayan üç ilave açıl türevleri belirlenmiştir. Mikrodalgaları kullanıldığı özütlenme sistemi aynı zamanda 10 örneğe kadar eşzamanlı olarak uygulanmaya izin verdiğinden, numune başına analiz süresini önemli ölçüde azaltmıştır [59].

Fenolik bileşikler gibi fitokimyasallar, sağlığa yararlı antioksidan içerikleri nedeniyle ve inflamasyona, kardiyovasküler hastalıklara, belirli kanser türlerine karşı koruma özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Ekstraksiyon sırasında bu fitokimyasalların maksimum tutulması, optimize edilmiş işlem parametresi koşullarını gerektirir. *Myrtus communis* yapraklarından toplam fenoliklerin özütlenmesi için mikrodalga destekli özütlenme (MDÖ) yönteminin kullanıldığı Dahmoune ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; optimize MDÖ koşulları ile yaprak ekstraktlarının toplam fenolik kapasitesi (TFM), ultrason destekli özütlenme (UDÖ) ve konvansiyonel çözücü özütlenme koşulları ile karşılaştırılmıştır. TFM tayininde etanol konsantrasyonu, mikrodalga gücü, ısınlama süresi ve çözücü-katı oranı, gibi özütlenme parametrelerinin etkisi ikinci mertebeden regresyon denklemi kullanılarak modellenmiştir. Optimal MDÖ koşulları %42 etanol konsantrasyonu, 500W mikrodalga gücü, 62 s ısınlama süresi ve 32 mL / g çözücü madde olmuştur. Etanol konsantrasyonu ve sıvı ve katı oranı özütlenme işlemi için önemli parametreler olmuştur ($p < 0.01$). MDÖ'nin optimize edilmiş koşulları altında tahmin edilen TFM içeriği yaklaşık olarak (166.13 mg GAE /g kuru ağırlık) iken TFM 'nin geri kazanımı 162.49 ± 16.95 mg GAE/g olmuştur. MDÖ kullanılarak özütlenmiş *MyEus* yapraklarındaki biyoaktif fitokimyasallar UDÖ ve geleneksel yöntem özütlenme

sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Tanenler (32.65 ± 0.01 mg / g), toplam flavonoidler (5.02 ± 0.05 mg QE/g kuru ağırlık) ve antioksidan aktiviteleri (38.20 ± 1.08 lg GAE / mL) MDÖ ekstralarında diğer iki ekstraktan daha yüksek çıkmıştır. Bu bulgular ayrıca MDÖ yöntemini kullanarak bitki materyallerinden biyoaktif fitokimyasalların özütlenmesinde, daha az özütleme çözücüsünün kullanıldığı ve MDÖ'nin çalışmaya zaman kazandırdığı gözlemlenmiştir [60].

İnce'nin yapmış olduğu bir başka çalışmada fenoliklerin özütlenmesinde, mikrodalga ve ultrason özütlemeleri için özütleme zamanının (mikrodalga için 5-20 dak; ultrason için 5-30 dak) ve katı maddenin çözücü miktarına oranının (1:10, 1:20, 1:30 g/ml) toplam fenolik madde (TFM) miktarına etkileri araştırılmıştır. Ultrason özütlemesi için değişik ultrason güçleri kullanılmıştır. Çözücü türünün (su, etanol ve etanol-su karışımı 50:50 v/v) etkileri de analiz edilmiş ve suyun daha iyi bir çözücü olduğu bulunmuştur. Fenoliklerin mikrodalga özütlenmesinde, ısırgan otu için 10 dak, 1:30 katı madde: çözücü oranı ve melisa için 5 dak ve 1:30 katı madde:çözücü oranı en uygun koşullar olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, ısırgan otu ve melisa özütlerinin TFM, sırasıyla 24.6 ve 145.8 mg GAE/g kuru madde bulunmuştur. Ultrason özütlenmesinde en uygun koşullar, ısırgan otu için 30 dak, 1:30 katı madde:çözücü oranı ve %80 ultrason gücü, melisa için ise 20 dak, 1:30 katı madde:çözücü oranı ve %50 ultrason gücü olmuştur. Bu koşullardaki TFM miktarları ısırgan otu ve melisa için sırasıyla 23.9 ve 105.5 mg GAE/g kuru maddedir. . Başlıca fenolik bileşenler ısırgan otunda naringenin, melisada ise rozmarinik asit olarak belirlenmiştir [61].

Şimşek ve arkadaşları, vişne posasının farklı koşullarda mikrodalga yardımıyla özütlenmesini, toplam fenolik içerik ve antiradikal etkinlik açısından konvansiyonel özütleme ile karşılaştırmışlardır [62]. Optimum koşullarda (700 W, etanol-su, 12 dk, 20 mL solvent/g katı) toplam fenolik içerik ve antiradikal etkinlik mikrodalga destekli özütlemelerde sırasıyla 14.14 mg GAE/g ve 28.32 mg DPPH/g bulunmuştur. Konvansiyonel özütleme ile elde edilen özütlerin toplam fenolik içeriği ve antiradikal etkinliği ise sırasıyla 13.78 mg GAE/g ve 24.74 mg DPPH/g bulunmuştur. Mikrodalga destekli özütleme, antiradikal etkinliğini ve fenolik asitlerin konsantrasyonu artırmış ve özütleme süresini önemli ölçüde kısaltmıştır.

2.7 Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Methodology-RSM)

Optimizasyon sistemleri maliyeti arttırmadan geliştirebilen ve süreçlerin veriminin artıran bir yöntemdir. Tek değişkenli tek zamanlı optimizasyon yönteminin (bilinen bir değişkenin olduğu diğer parametrelerin sabit tutulduğu yöntem) değişkenler arasındaki etkileşimi ve parametrelerin süreç üzerindeki tüm etkilerini göstermemesi gibi dezavantajları vardır. Yanıt yüzey metodu bu olumsuzlukları yok edebilecek alternatif bir uygulamadır [63]. RSM, yeni ürün tasarımında ve mevcut ürünlerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılan, bağımsız değişkenlerin tek başına veya kombinasyon halinde proses üzerindeki etkilerini ve kimyasal-biyokimyasal prosesleri tanımlayan bir takım istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir [63;64].

Yanıt yüzey metodunda yanıt ile girdi arasındaki ilişki eşitlik 2' de gösterilmiştir.;

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \epsilon \quad (2),$$

denklemleriyle açıklanmaktadır. Burada η yanıt, f yanıtın bilinmeyen işlevi ve $x_1, x_2, \dots, x_n$ doğal değişkenler olarak da adlandırılan bağımsız değişkenleri ifade eder, n bağımsız değişkenlerin sayısıdır ve son olarak ϵ , f tarafından hesaplanmayan diğer değişkenlik kaynaklarını temsil eden ölçüm hatalarından kaynaklanan istatistiksel hatadır. Genel olarak, ϵ 'nin ortalama sıfır ve varyans ile normal bir dağılıma sahip olduğu varsayılır [63]. RSM ile optimizasyonu 3 aşamada incelemek mümkündür: İlki bağımsız parametrelerin belirlenmesi, ikincisi deney tasarımı-model uyumu ve model doğrulaması, sonuncusu ise yanıt düzey optimum noktaların belirlenmesidir [63].

Fenolik maddelerin özütlenmesinde doğru analiz için RSM kullanılarak yapılacak deney sayısı azaltılmış olup kabul edilebilir sonuçlar elde edilmiştir. RSM farklı fenolik bileşiklerin farklı özütleme tekniklerinde kullanılmış ve özütlemeye oldukça yararlı olmuştur. Örneğin kırmızı lahanadan ultrasonik özütleme ile antosiyanin eldesinde, nar kabuğu polisakkaritlerinin ultrasonik özütleme analizinde optimizasyon için RSM yöntemi kullanılmış ve yöntem oldukça yararlı olmuştur [64]. Kırmızı lahanadan ultrason ve konvansiyonel özütleme yöntemiyle antosiyanin özütlemesinin yapıldığı çalışmada bağımsız değişkenler olarak zaman 5-75 dk, sıcaklık (40-80 °C) ve etanol konsantrasyonu (% 5-75) seçilmiş yanıt (antosiyenin içeriği) için en uygun koşullar tespit edilmiştir [65]. Yine kırmızı lahanadan antosiyanin özütlenmesinin yapıldığı bir başka çalışmada yanıt yüzey metodolojisi (RSM), ana parametrelere göre maksimum % verimi ve minimum partikül büyüklüğü ile tanımlanan optimum formülasyonları hazırlamak için kullanılmıştır [66]. Kırmızı ahudududan elde edilen antosiyanin ekstraktlarının optimum ekstraksiyon

verimini elde etmek için kullanılan çözücü oranı, ultrasonik güç ve ekstraksiyon süresi gibi çalışma koşulları, yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ile incelenmiştir. Çözücü oranı 4:1 (ml/g), ekstraksiyon süresi 200 sn ve ultrasonik güç 400 W olduğu koşullar optimum koşul olarak seçilmiştir [67].



3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada işlem görmemiş kırmızı lahanaların fiziko-kimyasal özellikleri tespit edilmiş; QUENCHER yöntemi kullanılarak toplam fenolik madde ve toplam antioksidan kapasite (DPPH ve CUPRAC) ölçülmüştür. Konvansiyonel ve mikrodalga destekli özütleme (MDÖ) yöntemleri kullanılarak özütlenen kırmızı lahanada; toplam antosiyanin miktarı (TMA), toplam fenolik madde (TFM) ve toplam antioksidan kapasite (TAK) değerleri (CUPRAC ve DPPH) belirlenmiş ve son olarak DAD-LC-MS ile kırmızı lahanada ve mikrodalga özütlerinde bulunan antosiyanin çeşitlerinin tespiti yapılmıştır.

3.1 Materyaller

Antosiyanin özütü elde etmek için kullanılacak olan kırmızı lahana (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* f. *rubra*) yerel bir marketten temin edilmiştir. Büyük ve ince yapraklar halinde ayrılan lahanalar, -80 °C sıcaklık'ta, 24 saat dondurulduktan sonra yaklaşık 36-48 saat liyofilizatör (Christ 2B,Almanya) kullanılarak kurutulmuştur. Kurutma sonrasında, örneklerin yüzey alanını artmasını sağlamak için ev tipi kahve öğütücüsü (Sinbo,Türkiye) ile homojen olacak şekilde parçalanmış, elekten geçirilmiş ve analizlere dek 4°C sıcaklıkta buzdolabı koşullarında depolanmıştır.

Deneylerde kullanılan kimyasallar sırasıyla metanol (Merck, Almanya), etanol (Merck, Almanya), asetik asit (Merck, Almanya), NaOH (Merck, Almanya), gallik asit (Merck, Almanya), Folin-Ciocalteu bileşeni (Merck, Almanya), amonyum asetat, neocuprine (Sigma Aldrich, Almanya), CuCl₂ (Sigma Aldrich, Almanya), sodyum karbonat (Sigma Aldrich, Almanya), KCl (Sigma Aldrich, Almanya), sodyum asetat (Sigma Aldrich, Almanya), HCl (Sigma Aldrich, Almanya), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich, Almanya), formik asit (HPLC grade, Sigma Aldrich, Almanya), asetonitril (HPLC grade, Sigma Aldrich, Almanya), Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Sigma Aldrich, Almanya), selüloz (Sigma Aldrich, Almanya).

3.2 İşlem görmemiş kırmızı lahanalarda fiziko-kimyasal özelliklerin belirlenmesi

3.2.1 Suda çözünür kuru madde tayini

Her hangi bir işleme tabi tutulmamış kırmızı lahana örneklerinde suda çözünür kuru madde (⁰Brix) dijital bir refraktometre kullanılarak saptanmıştır. Brix ölçümleri 20 ⁰C'de gerçekleştirilmiştir [68].

3.2.2 pH tayini

Laboratuvar tipi mutfak robotu/blender yardımıyla parçalanıp, homojen hale getirilen kırmızı lahana örneklerinin pH değerleri, bir pH-metre yardımı (PL-700AL, Türkiye) ile ölçülmüştür [68].

3.2.3 Toplam titrasyon asitliği tayini

Yaklaşık 10-15 g liyofilize kırmızı lahana örneğine 100 ml saf su eklenip süzdürülmüştür. Süzüntüden 25 ml örnek alınarak 0,1 N NaOH ile pH değeri 8 olana dek titrasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuç, sitrik asit cinsinden ifade edilmiştir. Toplam titrasyon asitliği için kullanılan eşitlik (Eşitlik 3) aşağıdaki gibidir [68].

$$\text{Asitlik} = V.N.E.1000 / M \quad (3)$$

Eşitlikte; V titrasyonda kullanılan alkali (ml) hacmi, N kullanılan alkalinin normalitesi, E meyvedeki baskın olan organik asitin miliekivalan ağırlığı (sitrik asit) ve M alınan örnek miktarıdır (ml).

3.2.4 Toplam monomerik antosiyanin (TMA) miktarı tayini

TMA miktarı tayini Wu ve arkadaşlarının kullandığı yöntemle göre yapılmıştır [69]. Öncelikle 1 gram liyofilize kırmızı lahana örneği 15 ml metanol/su/asetik asit (85:15:0,5, ml:ml:ml, MetOH/H₂O/AcAc) çözeltisinde çözündürülmüştür. Ardından 30 sn vorteksle

kariştırılan çözeltiliye 5 dk sonikasyon uygulanmış (arada 2 kez çalkalama/kariştırma yapılır) ve örnek 10 dk boyunca (5 dk da bir 30 sn vortekslenerek) oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında örnek 4550'g de 10 dk sentirüj edilmiştir. Supernatant kısmı alınan örnek tekrardan 10 ml metanol/su/asetik asit çözeltilisi içinde çözdürölüp yukarıda anlatılan aynı işlem bir kez daha gerçekteştirilmiştir. Buradan elde edilen supernatant ilk santrifüjden elde edilen supernatant ile birleştirilerek metanol/su /asetik asit çözeltilisi ile 25 ml ye gelecek şekilde seyreltilmiştir. Elde edilen örnek 0,22 nm'lik şırınga filtreden geçirilerek analizlere hazır hale getirilmiştir [70].

Yöntem, monomerik antosiyaninlerin pH 1.0'de renkli oksonium formunun, pH 4.5'de ise, renksiz hemiketal formunun egemen olmasına dayanmaktadır. Analize öncelikle çözeltilerin hazırlanmasıyla başlanmıştır.

0.025 M KCl tampon çözeltilisi (pH 1.0): Bir beherde 1.86 g KCl' ye 980 ml su eklenip kariştırılır ve pH değeri HCl ile 1.0'e ayarlanır. Sonra 1L'lik balona aktarılır ve damıtık su ile tamamlanır.

0.4 M Sodyum Asetat Tampon Çözeltilisi (pH 4.5): Bir behere 54.43 g sodium asetat tartılır. Üşüne 960 ml kadar damıtık su eklenerek çözeltili kariştırılır. Son olarak pH yoğun HCl ile 4.5'e ayarlanır. Sonrasında 1L'lik balona konulup üzeri damıtık su ile tamamlanır.

Gerekli çözeltiler hazırlandıktan sonra 4 ml 1/20 oranında kullanılan seyreltme çözeltileriyle seyreltilmiş kırmızı lahana çözeltilisinden 4 ml alınıp üzerine 4 ml 0.025 M KCl çözeltilisi eklenmiştir. Çözeltili vorktekte homojen kariştırılmış ve spektrofotometre cihazı KCl çözeltilisi ile sıfırlandıktan sonra hazırlanan örneklerin 520 nm de absorbans değeri ölçölmüştür.

Daha sonra 4 ml seyreltilmiş kırmızı lahana örneği ile 4 ml 0.4 M sodium asetat çözeltilisi, vortekte kariştırılıp 20 dakika bekletilmiş ve belirtilen 520 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

Toplam monomerik antosiyanin miktarının (mg siyanidin/L) hesaplanması (Eşitlik 4);

$$TMA(mg siyanidin/L) = A.Mw.Df.10^3 / \epsilon.1 \quad (4)$$

$$A = (A_{520})_{KCl} - (A_{520})_{Na-asetat}$$

Bu eşitlikte,

A:absorbans değeri

A₅₂₀: 520nm'de okunan absorbans değeri

Mw: Siyanidin-3-Glukozidin molekül ağırlığı, 449.2 g/mol

Df: Seyreltme faktörü

ϵ :Molar ekstinsiyon faktörü, 26900 L/mol.cm

l: 1 cm

10^3 = g-mg çevirme faktörü [71]

3.2.5 Toplam fenolik madde (TFM) tayini

İşlem görmemiş kırmızı lahanaların TFM miktarını belirlemek için QUENCHER yöntemi kullanılmıştır. OUENCHER yöntemi, özütleme ve hidrolize gerek duymadan katı numunenin serbest radikallerle karıştırılarak spektrofotometrik ölçümünün yapıldığı hızlı, kolay, ucuz, tekrarlanabilir ve doğrudan analiz yöntemidir [72].

OUENCHER yöntemiyle TFM tayini şu şekilde yapılmıştır: Liyofilizatörde kurutulduktan sonra elekten (450 μ m) geçirilerek aynı parçacık boyutuna getirilen kırmızı lahana örneğinden 10 mg alınmış ve bu örnek selüloz ile 1/80 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş örnekten 10 mg alınarak üzerine 2,5 ml Folin-Ciocalteu bileşeni (0,2 N) ilave edilip 5 dk karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra çözeltiye 2 ml sodyum karbonat çözeltisi (75g/l) eklenerek çözelti 26 dk karanlıkta çalkalayıcıda bekletilmiştir. Süre sonrasında örnekler 8000 rpm de 2 dk santrifüj edilmiş ve son olarak 760 nm de absorbans ölçümü yapılmıştır [73].

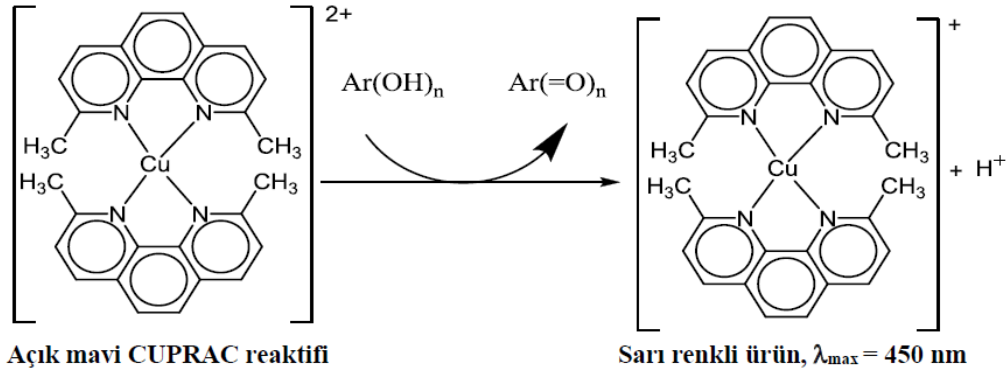
Standart olarak kullanılan gallik asit (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) farklı konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80, 100ppm) seyreltilerek kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon eğrisi kullanılarak (Ek A) TFM miktarı gallik asit cinsinden (ppm GAE/g) ifade edilmiştir [73].

3.2.6 Toplam antioksidan kapasite (TAK) tayini

TAK tayini iki ayrı metot QUENCHER_{CUPRAC} ve QUENCHER_{DPPH} yöntemi kullanılarak yapılmıştır. QUENCHER yöntemiyle hem çözülebilen hem çözünemeyen antioksidanlar sıvı-sıvı ve katı-sıvı reaksiyon tipiyle radikal çözelti ile temas ederek maksimum antioksidan verimi elde edildiği için işlem görmemiş kırmızı lahanalarda antioksidan ölçümlerinde kullanılmıştır [72].

CUPRAC (**CUPric Reducing Antioxidant Capacity**); Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifi pigment vb oluşturabilen yükseltgendir. CUPRAC bu reaktifi kullanan, birçok alanda kullanılan (gıda polifenoller, C-E vitamini, flavonoidler vb) antioksidan kapasitesi ölçüm

yöntemidir. Fenolik hidroksiller uygun konumda iken CUPRAC indirgeme-yükseltgeme reaksiyonları ile kinon yapısına dönüşürler. Bu tepkime sonucunda düzgün tetraedral yapıya sahip, stabil Cu(I)-Nc kelatı (Şekil 3.1) oluşur. Bu kelat 450 nm’de maksimum absorbands vermektedir. [74].



Şekil 3. 1 CUPRAC yönteminin Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla (Ar(OH)_n) reaksiyona girmesiyle, Cu(I)-Nc sarı renkli kelatının oluşumu [75]

QUENCHER_{CUPRAC} analizine başlamadan hazırlanması gereken çözeltiler bulunmaktadır. Bunlar;

Bakır (II) klorür çözeltisi: Çözelti 1.0×10^{-2} M olacak şekilde CuCl₂.2H₂O’tan 0,4262 g alınarak su ile 250 mL’ye tamamlanır.

Amonyum asetat tamponu: 1 M (pH=7) olacak şekilde 19.27 g Amonyum asetat alınarak su ile 250 mL’ye tamamlanır.

Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisi: 7.5×10^{-3} M olacak şekilde 0,156 g tartılıp etanolle 100 mL’ye tamamlanarak hazırlanır.

QUENCHER_{CUPRAC} analizinde, liyofilizatörden çıkan kurumuş kırmızı lahanalar mutfak robotuyla parçalanıp elekten geçirildikten sonra 1/100 oranında selüloz ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş numuneden alınan 10 mg örnek üzerine; 1 ml CuCl₂ çözeltisi, 1 ml sodyum karbonat çözeltisi, 1 ml neokuprin ile 1,1 ml etanol/su (1/1, v/v) eklenmiş; çözelti 1 dk vortekslendikten sonra 30 dk çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda çözelti 5000 rpm de 2 dk santrifüjden sonra 0,45 nm’ lik filtreden geçirilerek 450 nm’ de absorbands ölçümü yapılmıştır. Katı kırmızı lahana örneklerinde troloks eşdeğeri TAK değeri hesaplanması aşağıdaki Eşitlik 5 kullanılarak yapılmaktadır [76].

$$\text{TAK}_{\text{CUPRAC}} (\text{mmol TR/g-örnek}) = A/\epsilon \times Vt/Vö \times \text{S.f.} \times Ve/m \quad (5)$$

A: 450 nm’de ölçülen örnek absorbansı

ε: TR bileşiğinin CUPRAC yöntemindeki molar absorplama katsayısı ($13098 \text{ L mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Vt: CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (4.1 mL)

Vö: Örnek hacmi (mL)

S.f.: Seyreltme faktörü (seyreltme yapılmayacak ise bu faktör “1” alınır)

Ve: Hazırlanan ekstrenin hacmi (mL)

m: Ekstraksiyon işleminde alınan örnek miktarı (g)

CUPRAC yöntemi standart antioksidan bileşikler arasından Troloksa uygulanmıştır. Farklı hacimlerde alınan troloksun (50-100-150-200-250ppm) kalibrasyon eğrisi çizilerek sonuçlar **mmol TR/kg-örnek** olarak verilmiştir [76].

Kalibrasyon eğrisi EK A de verilmiştir.

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin süpürücü etkisiyle antioksidan analizi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. DPPH radikali 517 nm dalga boyunda en yüksek absorbans değerine sahiptir. DPPH molekülünde serbest bir elektron yer değiştirince mor renk oluşmaktadır. DPPH çözeltisi hidrojen atomu verebilen bileşik (antioksidan) ile karıştığında yapı indirgenir ve koyu mor olan renk kaybolur. Bu reaksiyon 517 nm’ de absorbansın azalmasına neden olmaktadır [77].

QUECNHER_{DPPH} analizine 25 ppm’lik DPPH radikal solüsyonu (2,5 mg DPPH /100 ml MetOH) hazırlanarak başlanmıştır. Sonrasında liyofilizatörden çıkan kurumuş kırmızı lahanalar mutfak robotuyla parçalanıp elekten geçirildikten sonra 1/80 oranında selüloz ile seyreltilmiş bundan 10 mg alınarak üzerine hazırlanan DPPH çözeltisinden 3,9 ml eklenip çözelti 26 dk karanlıkta çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda 8000 rpm de 2 dk santrifüjden sonra 525 de absorbans ölçümü yapılmıştır [78].

DPPH yöntemi standart antioksidan bileşikler arasından Troloksa uygulanmıştır. Farklı hacimlerde alınan troloksun (50-100-150-200-250ppm) kalibrasyon eğrisi çizilerek TAK_{DPPH} sonuçları **mmol TR/kg-örnek** cinsinden verilmiştir [78].

Kalibrasyon eğrisi EK A de verilmiştir.

3.3 Kırmızı lahana antosiyaninlerinin özütlenmesi

Özütleme işleminde hem konvansiyonel hem de mikrodalga destekli özütleme (MDÖ) yöntemleri kullanılmıştır.

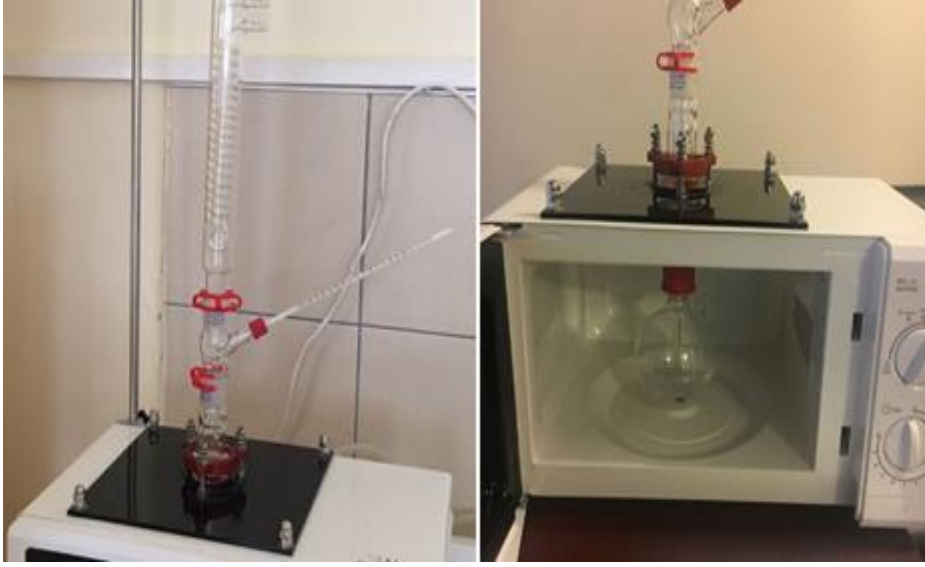
3.3.1 Geleneksel yöntemle özütlenme

Geleneksel özütlenme, çalkalamalı su banyosu (Memmert WBN, Almanya) kullanılarak maserasyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Su ve etanol-su (1:1, v:v) olarak iki ayrı çözücü kullanılmış olup 5 g liyofilize edilmiş kırmızı lahana örneği iki ayrı sıcaklık (40 ve 70 °C) ve iki ayrı sürede (4 ve 6 saat) bekletilmişlerdir. Liyofilize örneğin çözücüye oranı 1/40 olarak belirlenmiştir. Maserasyon öncesinde, pH değeri yaklaşık 3-3,3 aralığına getirilmiştir [34].

Maserasyon sonrası, elde edilen çözelti ön süzme işlemine tabi tutulmuş ve son olarak özüt vakum filtrasyon ile filtre edilmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra elde edilen özüt, toplam monomerik antosiyanin miktarı, toplam antioksidan kapasite ve toplam fenolik madde analizleri için hazır hale getirilmiştir [79].

3.3.2 Mikrodalga destekli özütlenme (MDÖ)

Mikrodalga destekli olarak özütlenmede çözücü olarak su ve su:etanol (1:1, v/v) karışımı kullanılmıştır. Her bir çözücü çeşidi için özütlenme işlemi farklı sürelerde (5, 10 ve 15 dakika), farklı katı-çözücü oranlarında (1:20, 1:30 ve 1:40 g/ml) ve mikrodalga güçlerinde (200, 400 ve 600 W) gerçekleştirilmiştir. Bağımsız değişkenler literatürdeki çalışmalar esas alınarak seçilmiştir [55;61]. MDÖ düzeneği, bir ısıtma ünitesi (mikrodalga fırın, yaklaşık 20 lt hacimli), özütlenme için bir balon joje (500 ml) ve yoğunlaştırıcı parçadan oluşturulmuştur. Liyofilize edilmiş 5 g kırmızı lahana örneği balon jojeye yerleştirilmiş ve üzerine uygun oranda çözücü ilave edilmiştir. Balon joje ısıtıcı ünitesi olan mikrodalga fırın içine yerleştirilip, uygun mikrodalga gücünde ve belirlenen sürede işlem gerçekleştirilmiştir [80].



Şekil 3. 2 Mikrodalga Destekli Özütlemeye Düzeneği

3.3.3 Mikrodalga destekli özütlemeye şartlarının optimizasyonu

MDÖ sırasında işlem şartlarının optimizasyonunu gerçekleştirmek için istatistiksel ve matematiksel yaklaşımın birleştirildiği bir yöntem olan yanıt yüzey metodu (Response Surface Methodology-RSM) kullanılmıştır. Bu yöntem, mühendislik proseslerinin analizi ve modellenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İstatistiksel yöntemlerin kullanılması öncesinde ilk ve en önemli adım olan deneysel tasarım aşamasında Box-Behnken deneysel tasarımı kullanılmıştır. Deney sayısının belirlenmesinde aşağıdaki eşitlik (eşitlik 6) kullanılmıştır [81];

$$N = k^2 + k + c_p \quad (6)$$

Bu eşitlikte k , faktör sayısı (bağımsız değişken) ve c_p ise merkez noktasındaki deneyin tekrarlanma sayısını belirtmektedir. Bu çalışmada, üç bağımsız değişken belirlenmiştir. Bu değişkenler, mikrodalga özütlemeye süresi (dakika), katı-çözücü oranı (1:X) ve mikrodalga gücüdür (W). Çizelge3.1’de belirtilen bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2 Yanıt yüzey metodunda kullanılacak olan bağımsız değişkenler ve kodlanmış/gerçek değerleri

Bağımsız değişkenler	Derecelerin kodlanmamış değerleri		
	-1	0	1
Özütleme süresi (dak.)	5	10	15
Katı/çözücü oranı (1:X)	1:20	1:30	1:40
Mikrodalga gücü (W)	200	400	600

Mikrodalga özütleme sırasında su ve su-etanol karışımı olarak iki farklı çözücü kullanılmış ve her çözücü türü için iki ayrı optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Box-Behnken deneysel tasarımına göre belirlenmiş deneylerin sayısı her bir optimizasyon için toplamda 17 adettir. Merkez noktasında (tüm faktörlerin kodlanmış değerlerinin 0 olduğu nokta) 5 tekrar yapılmıştır. Deneysel tasarımda bu merkez noktasındaki deneylerin tekrarlanması deneysel hatanın belirlenmesinde ve istatistiksel modelin uygunluğunun kontrol edilmesinde yardımcı olmaktadır. Tablo 3.2’de, bu çalışmadaki Box-Behnken deneysel tasarımına uygun olarak tüm deneyler gösterilmektedir.

Çizelge 3.3 Box-Behnken deneysel tasarımı (bağımsız değişkenler, X_1 :süre, X_2 :katı/çözücü oranı ve X_3 :mikrodalga gücü)

	X_1 (dk)	X_2 (1/X)	X_3 (W)
Deney No.	Kodlanmış Değerler		
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Yanıt yüzey metodu ile belirlenen deneylere göre özütleme sonrasında elde edilen sıvı özütlerde yapılan analizlerde TMA, TFM, TAK değerleri belirlenmiştir. Optimum mikrodalga özütleme şartlarının belirlenmesinde en yüksek değerde (maksimum) antosiyanin miktarını veren şartlar optimum özütleme şartları olarak kabul edilmiştir [79;83].

3.4 Antosiyanin özütlerinin analizi

3.4.1 Toplam Monomerik Antosiyanin (TMA) tayini

Konvansiyonel ve MDÖ' de elde edilmiş olan sıvı özütlerin antosiyanin miktarı 3.2.4'te anlatıldığı şekilde TMA miktarı tayini ile belirlenmiştir. Özütlerin seyreltme oranı 1/20'dir.

3.4.2 Toplam fenolik madde (TFM) tayini

Konvansiyonel ve mikrodalga destekli özütlemelerde elde edilmiş olan sıvı özütlerin TFM miktarının belirlenmesi amacıyla Folin-Ciocalteu metodu uygulanmıştır. Bu yöntemde, fenolik bileşiklerin varlığında Folin-Ciocalteu standardı sodyum karbonat ile indirgenir ve sonuç olarak renk değişikliği gözlemlenir [84].

Analiz için kırmızı lahana özütü etanol:su (1:1, v/v) ve %100 saf su ile 1/20 oranında seyreltilmiştir. TFM miktar tayini için 2,5 ml 0,2 N Folin-Ciocalteu ile 0,5 ml örnek vortex ile 5 sn karıştırılıp karışım 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Sonra çözeltiye 2 ml Sodium Karbonat çözeltisi (75g/l) eklenmiş ve çözelti tekrar 5 sn vortekslendikten sonra bütün örnekler karanlıkta 25 C de 1 saat bekletilmiştir. Hazırlanan örneklerin 760 nm de absorpsiyonları ölçülmüştür. Blank 2,5 ml 0,2 N Folin-Ciocalteu ve 2 ml sodium karbonat çözeltisi karışımıdır [84].

Standart olarak kullanılan gallik asit (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) farklı konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80, 100ppm) etanol:su (1:1 v/v) ve saf su ile seyreltilerek 2 adet kalibrasyon iki eğrisi (Ek A) oluşturulmuştur. Bu kalibrasyon eğrileri kullanılarak TFM miktarı gallik asit cinsinden (ppm GAE/ g) ifade edilmiştir [84].

3.4.3 Toplam antioksidan kapasite (TAK) tayini

Konvansiyonel ve MDÖ' de elde edilmiş olan sıvı özütlerin toplam antioksidan kapasitesi ölçümleri için iki ayrı spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler DPPH radikalinin süpürücü etki tayini ve CUPRAC yöntemidir.

DPPH yöntemi ile antioksidan kapasitesi ölçümlerinde, antioksidan kapasitesi ölçülmek istenen kırmızı lahana özütleri 1/20 oranında etanol:su(1:1 v/v) ve su ile seyreltilmiş ve 1 dakika boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Analize başlamadan önce 25 ppm'lik DPPH radikal solüsyonu (2,5 mg DPPH /100 ml MetOH) hazırlanmıştır. Hazırlanan DPPH çözeltisinden vakit kaybedilmeden 3,9 ml alınmış üzerine 100 µl metanol eklenerek vortekslendikten sonra blank metanol olacak şekilde 517 nm'de çözelti absorpsiyonu (A1) UV spektrometre kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra seyreltilmiş numunelerden 100 µl kadarlık miktar, 3,9 ml DPPH radikal solüsyonu ile karıştırılıp, karanlık bir odada 1 saat muhafaza edilmiştir. 1 saat sonunda numunelerin absorpsiyonları spektrometrik olarak ölçülmüştür (A2) [85].

Metanol kullanılarak farklı konsantrasyonlarda DPPH (5-10-15-20-25 ppm) çözeltisi ile oluşturulan Kalibrasyon eğrisi kullanılarak, A1 ve A2 için, konsantrasyonlar (C1 ve C2) belirlenmiştir. Sonuç olarak da antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki Eşitlik 7 kullanılarak hesaplanmıştır;

$$TAK_{DPPH} (\text{mg DPPH} / \text{g kuru ağırlık}) = ((C1 - C2) * d * V / m) * MW \quad (7)$$

Bu eşitlikte;

d : seyreltme (dilüsyon) faktörü

V : özüt (ekstrakt) hacmi

m : kuru numunenin ağırlığı

MW : DPPH'in moleküler ağırlığıdır.

Kalibrasyon eğrisi EK A de verilmiştir.

CUPRAC yöntemiyle antioksidan tayinine 3.2.6 da belirlenen çözeltiler hazırlanarak başlanmıştır.

Ekstraksiyon sonucu elde edilen örnekler 1/60 oranında etanol:su (1:1 v/v) ve %100 su ile seyreltilmiştir. Hazırlanmış çözeltilerden 1 ml CuCl₂ 1ml Nc 1 ml Amonyum asetat, 1 ml seyreltilmiş örnek ve 0,1 ml su vorteks ile 5 sn karıştırılıp 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda kör numune ile birlikte örneklerin 450 nm de Abs ölçümü yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir. Antioksidan kapasite hesaplaması aşağıdaki Eşitlik 8 kullanılarak yapılmıştır [75].

$$TAK_{CUPRAC} (\text{mM Trolox}) = (A/\epsilon) \times (Vt/Vö) \times S.f. \times 1000 \quad (8)$$

A: 450 nm'de ölçülen örnek absorbansı

ε: TR bileşiğinin CUPRAC yöntemindeki molar absorplama katsayısı (13098 L mol⁻¹.cm⁻¹)

Vt: CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (4.1 mL)

Vö: Örnek hacmi (mL)

S.f.: Seyreltme faktörü (seyreltme yapılmayacak ise bu faktör “1” alınır)

CUPRAC yöntemi standart antioksidan bileşikler arasından Troloksa uygulanmıştır. Farklı hacimlerde alınan troloksun (50-100-150-200-250 ppm) kalibrasyon eğrisi çizilerek sonuçlar Trolox cinsinden verilmiştir [75].

Kalibrasyon eğrisi EK A'da verilmiştir.

3.5 Antosiyanin özütlerinin kompozisyonunun DAD-LC-MS ile analizi

200 mg liyofilize edilmiş ve öğütülmüş kırmızı lahana örneği 15 mL santrifüj tüplerine tartılmış, üzerine 5 mL 80:20 su:asetonitril çözeltisi ilave edilmiş ve 5 dk çalkalanmıştır. Daha sonra 8000 rpm’de santrifüj edilmiş, üst kısımdaki berrak süpernatant başka bir santrifüj tüpünde toplanmış, kalan retentant üzerine tekrar 5 mL 80:20 su:asetonitril ilave edilerek aynı işlem 4 kez tekrar edilerek toplam 20 mL ile ekstrakte edilmiştir. En son toplanan ekstraktın 1 mL’si 45 µm nylon filtreden geçirilerek kahverengi viale alınmıştır. LC-MS ile kırmızı lahana özütlerinde antosiyanin analizi, Agilent 1200 HPLC sistemi (Agilent Technologies, Waldbronn, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistem bir adet kuaterner pompa, otomatik numune enjeksiyonu, bir tane diyot dizini dedektör (DAD) ve son olarak kolon fırınından oluşmaktadır. Sistem, elektrosprey iyonizasyonunda pozitif mod seçilerek kullanılmıştır ve diğer arayüzey parametreleri; kurutma gazı (azot) akış hızı 10 mL/dk, nebulizör basıncı 40 psig, kurutma gazı sıcaklığı 350°C, kapiler voltajı 4 kV ve fragmentör voltajı 70 eV olacak şekilde ayarlanmıştır. Kromatografik ayırım Hichrom 5 C18 kolonda (250 mm x 4.6 mm) 20 dakikada gerçekleştirilmiştir. Mobil faz 1 ml/dak akış hızında, %1 formik asit ve asetonitrildir. Gradiyen program; 0-2 dak; % 88 formik asitle başlamış, 8. dak kadar %70’e düşürülmüş, daha sonra 4 dak içerisinde tekrar % 88’e çıkarılmış ve 8 dak boyunca %88 oranında devam etmiştir. Kolon sıcaklığı 30°C’ dir. Enjeksiyon hacmi 10 µL’dir. Analizler 520 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrometresi SIM (Selected Ion Monitoring) modunda çalıştırılmıştır. Kırmızı lahana örneklerinde siyanidinglukozit türevleri baskın olduğundan, siyanidinglukozit türevleri ekstrakte edilmiş, toplam antosiyanin miktarı başlangıç konsantrasyonuna göre hesaplanmıştır [86].

4. BULGULAR & TARTIŞMA

4.1 İşlem Görmemiş Kırmızı Lahanalarda Fizikokimyasal Analizleri

Özütlemelerde kullanılan dondurularak kurutulmuş, işlem görmemiş kırmızı lahananın bazı fizikokimyasal özellikleri Çizelge 4.1'de görülmektedir. Saf suda çözünür kuru madde içeriği % 5,70 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, pH ve titrasyon asitliği değerleri sırasıyla % 6,43 ve % 0,013 g/100 ml sitrik asit olarak belirlenmiştir. Toplam monomerik antosiyanin miktarı (TMA) siyanidin-3-glukozit cinsinden hesaplanmıştır. İşlem görmemiş kırmızı lahanaların toplam fenolik madde (TFM) miktarı ve toplam antioksidan kapasitesini (TAK) ölçmek için hızlı, kolay yapılabilen, özütleme ve hidrolize gerek duymadan katı gıda ile sıvı radikal arasındaki reaksiyona bağlı bir metot olan QUENCHER yöntemi kullanılmıştır [87]. TMA, TFM ve TAK analizlerinin sonuçları sırasıyla; 228,44 mg siyanidin/L, 34,11 mg GAE/g kuru ağırlık, QUENCHER_{DPPH} ile elde edilen 141,13 ppm TE/kg ve QUENCHER_{CUPRAC} 369,37 mmol TE/kg olarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada geleneksel-ultrasonik yöntemlerle kırmızı lahana antosiyaninleri özütlenmiş ve işlem görmemiş kırmızı lahanalarda TMA miktarının 62,94 mg siyanidin/L olduğu belirtilmiştir [39]. Yapılan çalışmada sonuçların daha düşük çıkma sebebi kırmızı lahanaların yetiştirme koşullarından ve TMA ölçüm yöntemindeki farklılık kaynaklı olabilmektedir. Abderrahim ve arkadaşlarının, Tufan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda QUENCHER_{CUPRAC} yöntemiyle elde edilen toplam antioksidan kapasitesi QUENCHER_{DPPH} yöntemiyle elde edilen TAK' den yüksek çıkmıştır [76;88]. Bunun sebebi diğer elektron transferine bağlı TAK ölçüm metotlarına göre, CUPRAC ortam pH'sının fizyolojik pH'ya daha yakın olması, CUPRAC yönteminin uygun redoks potansiyeline sahip olması, reaktiflerin erişilebilirliği ve stabilitesi, en önemlisi de CUPRAC radikalının hem hidrofilik hem lipofilik antioksidanları etkileyebilmesidir [87;89]. Bu çalışmalar, yapılan çalışmada elde edilen TAK_{CUPRAC} sonuçlarının TAK_{DPPH} sonuçlarından yüksek çıkmasını desteklemektedir.

Çizelge 4.2 Kırmızı Lahananın Fizikokimyasal Özellikleri

Özellik	Değer
pH (%)	6.43±0,153
Suda çözünür kuru madde (%)	5.70±0,365
Titrasyon asitliği (g/100 ml sitrik asit)	0.013±0,548
TMA(mg siyanidin/L)	228,44±1,562
TFM (mg GAE/g kuru ağırlık)	34,11±1,055
TAK _{DPPH} (mmol TE/kg örnek ağırlık)	141,13±3,256
TAK _{CUPRAC} (mmol TE/kg örnek ağırlık)	369,37±6,260

Sonuçlar üç tekrar üzerinden ortalama değerleri ve standart sapmaları ile verilmiştir.

4.2 Kırmızı Lahana Antosiyaninlerinin Geleneksel Yöntemle Özütlenmesi

Çalışmada, 40 °C ve 70 °C olarak iki farklı sıcaklık değerinde; 4 ve 6 saat olarak da iki farklı sürede gerçekleştirilen özütlenme işleminde elde edilen sıvı özütlerin toplam monomerik antosiyanin miktarı (TMA), toplam fenolik madde içeriği (TFM) ve toplam antioksidan kapasiteleri (TAK) belirlenmiştir. Çözücü olarak su ve etanol-su (1/1,v/v) karışımı kullanılmış ve 4 farklı koşulda özütlenme yapılmıştır. Analiz sonuçları Çizelge 4.2' de gösterilmektedir. Belirtilen sonuçlara göre, TMA, TFM, TAK' ın hepsinin en yüksek değerleri verdiği şart; çözücünün etanol/su (1/1,v/v) olduğu 40 °C'de ve 4 saat' dir. Elde edilen değerler sırasıyla; 240,69 mg siyanidin/L, 1677,33 mg GAE/L, 66,34 mg DPPH/L, 16,77 mmol TE/L 'dir. TMA, TFM, TAK sonuçlarının en düşük çıktığı şart ise çözücünün %100 su olduğu 40 °C'de ve 4 saat özütlemenin gerçekleştirildiği koşuldur ve sonuçlar sırasıyla; 125,91 mg siyanidin/L, 1018,52 mg GAE/L, 33,12 mg DPPH/L, 8,91 mmol TE /L'dir.

Çizelge 4.2 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahanaların TMA, TFM, TAK miktarları

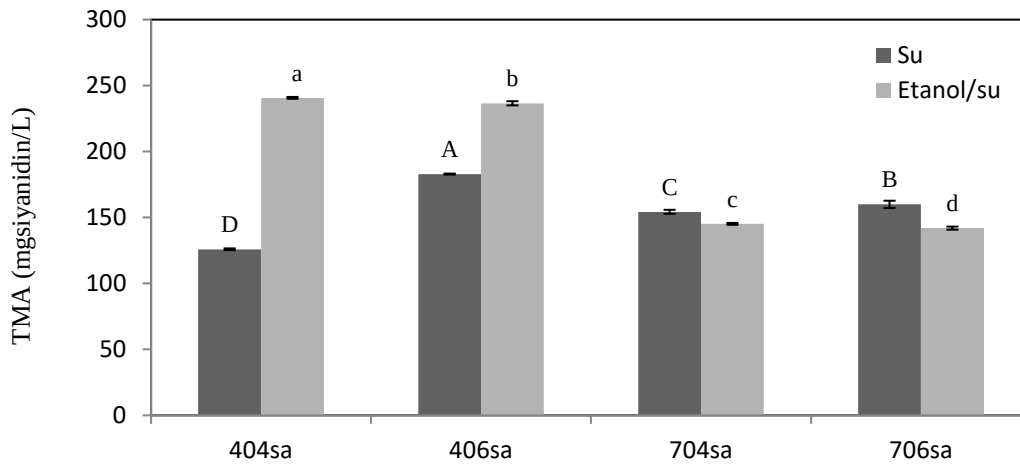
No	T (°C)	t (saat)	Çözücü	TMA(mg siyanidin/L)	TFM (mg GAE/L)	TAK _{DPPH} (mg DPPH/L)	TAK _{CUPRAC} (mmolTE/L)
1	40	4	su	125,91± 0,668 ^D	1018,52±1,283 ^D	33,12±0,745 ^B	8,91±0,029 ^B
2	40	6	su	182,91 ±0,385 ^A	1165,93±1,283 ^C	54,52±0,323 ^A	11,20 ± 0,022 ^A
3	70	4	su	154,30±1,530 ^C	1324,44±2,222 ^A	47,96±7,077 ^A	11,64 ±0,158 ^A
4	70	6	su	159,98±2,734 ^B	1192,59±1,283 ^B	50,22±1,777 ^A	11,64± 0,309 ^A
5	40	4	etanol+su	240,69±0,695 ^a	1677,33±1,155 ^a	66,34±0,812 ^a	16,77± 0,142 ^a
6	40	6	etanol+su	236,57±1,578 ^b	1515,33±1,155 ^b	58,50±0,493 ^b	14,20± 0,037 ^b
7	70	4	etanol+su	145,17±0,695 ^c	1268,00±2,000 ^c	36,13±1,478 ^d	10,00 ±0,029 ^d
8	70	6	etanol+su	141,94±1,157 ^d	1202,67±1,155 ^d	44,52±0,645 ^c	10,70 ±0,029 ^c

Sonuçlar üç tekrar üzerinden ortalama değer ve standart sapmaları ile verilmiştir. İstatistiksel değerlendirmelerde çözücü etanol-su ve su şartları ayrı ayrı değerlendirilmiştir ve her bir sütunda farklı harfler ile belirtilen değerler istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olduğunu belirtmektedir ($p \leq 0.05$). Harflendirmede etanol-su için küçük harf, su için büyük harf kullanılmıştır.

Şekil 4.1-4.4' te sırasıyla; kırmızı lahanadaki TMA, TFM, TAK'ın farklı şartlardaki değişimleri görülmektedir. Çift yönlü ANOVA uygulanarak özütlemelerde çözücünün etanol-su ve su olduğu farklı 4 koşul bir arada değerlendirilmiştir ($p \leq 0.05$).

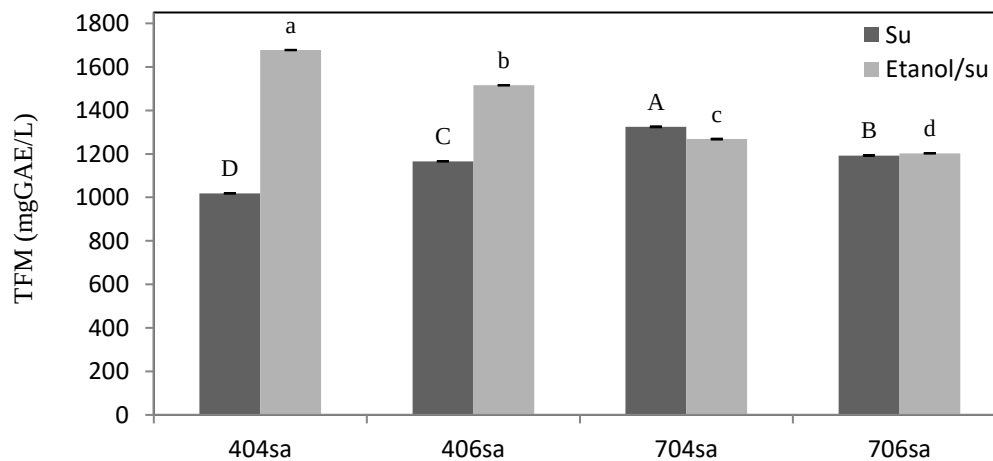
Bilindiği üzere gıda kaynaklarından izole edilen antosiyaninler çok hassas bileşenler olup kimyasal yapıları konsantrasyon, pH, depolama sıcaklığı, oksijen, ışık varlığı, çözücüler, gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedirler [8]. Bu yüzden çalışmadaki uygulama koşullarının değişmesiyle antosiyanin miktarında değişiklik gerçekleşmiştir. Kırmızı lahanadaki TMA miktarı 125,91-240,69 mg siyanidin/L (5,05-9,63 mg/gkuru ağırlık) aralığında çıkmıştır. Çözücünün sadece su olduğu özütlemelerde elde edilen antosiyanin miktarı genel olarak çözücünün etanol-su (1/1,v/v) olduğu sonuçlardan düşük veya yakın çıkmıştır (Şekil 4.1). Antosiyanin değerlerinin en yüksek olduğu çözücü tipinin etanol-su olması, literatürdeki bulgularla da benzerlik göstermektedir [34]. Yapılan bir çalışmada katı-sıvı özütleme yöntemiyle kırmızı lahanalarda antosiyanin ölçümü yapılmış ve TMA değerlerinin 30,69-56,72 mg siyanidin/L arasında olduğu belirtilmiştir [39]. Yapılan çalışmada TMA miktarının daha yüksek çıkma nedeni; özütleme yöntemindeki farklılıklar, özütleme süresinin daha uzun olmasından dolayı antosiyaninlerin iyice çözünmüş olması ve ortam pH'sının 3-3.30 değerleri arasında tutularak antosiyaninlerin çözünmesi için uygun ortam koşullarının sağlanmış olmasından kaynaklanabilmektedir. Gachovska ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kırmızı lahanalarda toplam antosiyanin miktarı 16-889 µg/mL değerleri arasında bulunmuştur [90]. Zaidel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çözücünün su olduğu konvansiyonel özütleme sonucunda kırmızı lahanalarda TMA miktarı 152.33 ± 2.0 mgsiyanidin/L olarak bulunmuştur [91]. Bu bulgular yapılan çalışmadaki sonuçları desteklemektedir.

Bernstein ve arkadaşının yaptığı çalışmada asitlendirilmiş su özütleme yöntemiyle kırmızı lahanalarda toplam antosiyanin miktarı 2.61 mg / g kuru ağırlık olarak bulunmuştur [92]. Çalışmada kullanılan özütleme yöntemindeki farklılıklar çalışmamızda elde edilen sonuçlar arasında farklılığa sebep olmuştur.



Şekil 4.2 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahanada TMA'nın farklı şartlardaki değişimi (404sa: 40°C, 4 saat, 406sa: 40°C, 6 saat, 704sa: 70°C, 4 saat, 706sa: 70°C, 6 saat)

Konvansiyonel yöntemle özütleme sonucu kırmızı lahanadaki TFM miktarı Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi 1018,52-1677,33 mg GAE/L (40.74-67,10 mg GAE/g kuru ağırlık) aralığındadır. Çözücünün etanol/su olduğu şartlarda TFM miktarı çözücünün su olduğu şartlara göre (Şekil 4.2) yüksek çıkmıştır. Özdoğan'ın yaptığı çalışmada TFM içeriği 191,59 mg/100 g olarak bulunmuştur [39]. Wu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kırmızı hanalarda TFM miktarı 251,18 mg GAE/100 g olarak bulunmuştur [93]. Bu çalışmada, TFM içeriği literatürdeki bulgulardan yüksek çıkmıştır. Bu farklılık kullanılmış özütleme yöntemi farklılığı, sıcaklık ve süre farklılıklarından kaynaklanabilmektedir.

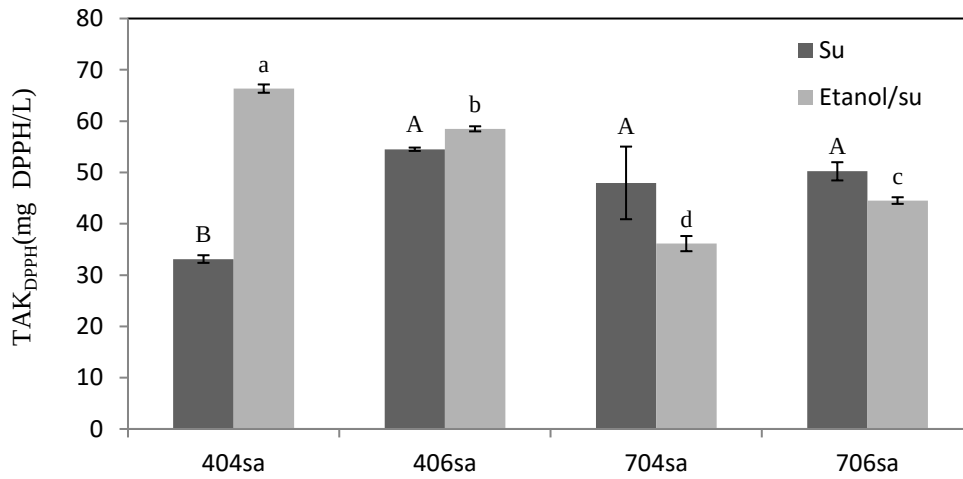


Şekil 4. 2 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahanada TFM'nin farklı şartlardaki değişimi (404sa: 40°C, 4 saat, 406sa: 40°C, 6 saat, 704sa: 70°C, 4 saat, 706sa: 70°C, 6 saat)

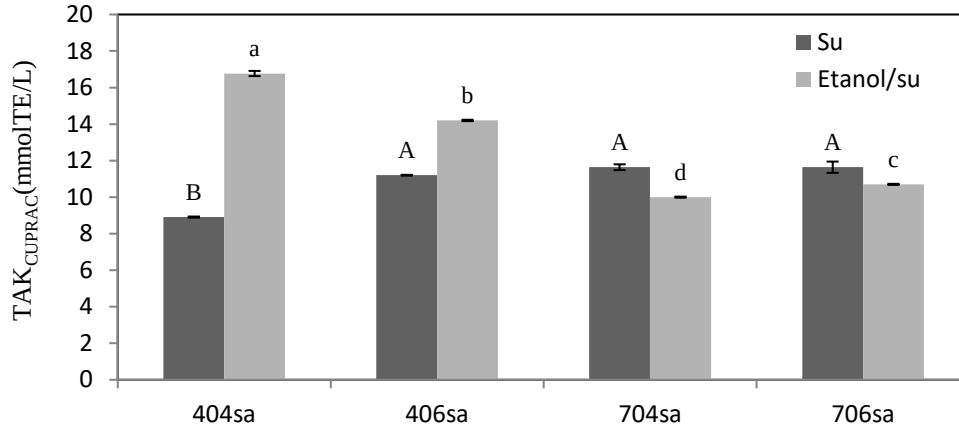
Toplam antioksidan kapasite ölçümü için 2 farklı yöntem kullanılmıştır; DPPH ve CUPRAC standartları yöntemleri.

Literatürde en çok kullanılan antioksidan kapasite tayini yöntemlerinden DPPH yöntemi çalışmamızda da kullanılmış ve sonuçlar 33,12 ile 66,34 mg DPPH/L değerleri arasında çıkmıştır. En yüksek değere çözücü etanol/su karışımı olduğunda ulaşılmışken en düşük değere çözücü su olduğunda ulaşılmıştır (Şekil 4.3). Bernstein ve arkadaşının yaptığı çalışmada asitlendirilmiş su özütleme yöntemiyle kırmızı lahanalarda TAK_{DPPH} analizi yapılmış ve TAK yaklaşık 7.4 ± 0.3 mmol trolox / kg olarak bulunurken [92] Özdoğan' ın yapmış olduğu çalışmada antioksidan kapasitesi değeri 11,27 (Mm Trolox/g kırmızı lahana) [39] olarak bulunmuştur.

Konvansiyonel yöntemle özütleme ile CUPRAC yöntemiyle elde edilmiş TAK değerleri 8,91 ile 16,77 mM TR/L değerleri arasında ve literatür çalışmalarına benzer çıkmıştır [8]. En yüksek değere çözücü etanol/su karışımı olduğunda ulaşılmışken en düşük değere çözücü su olduğunda ulaşılmıştır (Şekil 4.4). Cu(II)- neokuproin (Nc) reaktifinin kullanıldığı CUPRAC antioksidan kapasite tayin yöntemi, standart antioksidan bileşikler arasından troloksa uygulandığından çalışmada farklı konsantrasyonlarda trolox standart eğrisi oluşturularak sonuçlar trolox cinsinden verilmiştir [10].



Şekil 4. 3 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahana özütlerindeki TAK_{DPPH} 'in farklı şartlardaki değişimi (404sa: 40°C, 4 saat, 406sa: 40°C, 6 saat, 704sa: 70°C, 4 saat, 706sa: 70°C, 6 saat)



Şekil 4. 4 Konvansiyonel yöntemle özütlenmiş kırmızı lahana özütlerindeki TAK_{CUPRAC} 'ın farklı şartlardaki değişimi (404sa: 40°C, 4 saat, 406sa: 40°C, 6 saat, 704sa: 70°C, 4 saat, 706sa: 70°C, 6 saat)

Konvansiyonel özütleme yönteminde bağımsız değişken olarak özütleme süresi, özütleme sıcaklığı ve çözücü tipi olmak üzere 3 parametre seçilmiştir. Bu değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerinde (TMA, TFM, TAK) önemli derecede etkisinin olup olmadığını belirlemek için 2 farklı çözücü tipi için de ayrı ayrı Çift Yönlü ANOVA varyasyon analizi yapılmıştır. Karşılaştırma için Tukey' in çoklu karşılaştırma testi ($p \leq 0,05$) kullanılmıştır. Çözücünün etanol-su olduğu özütlemelerde kırmızı lahana özütlerindeki TMA miktarı üzerinde özütleme sıcaklığının ve süresinin istatistiksel açıdan önemli derecede etkili olduğu ($p \leq 0,05$) süre*sıcaklık korelasyonunun etkisiz olduğu; TFM miktarı üzerinde sıcaklık, süre ve süre*sıcaklık korelasyonunun üçünün de etkili olduğu ($p \leq 0,05$); TAK_{DPPH} üzerinde sıcaklığın ve süre*sıcaklık korelasyonunun etkili olduğu ($p \leq 0,05$) sürenin ise etkisiz olduğu; TAK_{CUPRAC} üzerinde ise süre, sıcaklık ve süre*sıcaklık korelasyonundan üçünün de etkili olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).

Konvansiyonel yöntemle çözücünün su olduğu özütlemelerde kırmızı lahana özütlerinin TMA, TFM, TAK_{DPPH} , TAK_{CUPRAC} kapasiteleri üzerinde seçilen 2 bağımsız değişkenin (sıcaklık-süre) ve süre*sıcaklık korelasyonunun istatistiksel olarak etkili olduğu görülmüştür ($p \leq 0,05$).

Çift Yönlü ANOVA varyasyon sonuçları EK B' de verilmiştir.

4.3 Mikrodalga Destekli Özütleme Şartlarının Optimizasyonu

Kırmızı lahanaların MDÖ optimal şartlarının belirlenmesi için Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Özütleme süresi (X_1), katı-sıvı oranı (X_2) ve mikrodalga ısınlama gücü (X_3) gibi çalışma koşullarının, antosiyaninlerin özütleme verimine etkileri, bir yanıt yüzey metodolojisi (RSM) ile incelenmiştir. Toplam 17 deney yapılmıştır. Etanol/su (1/1,v/v) ve %100 su olmak üzere iki çözücü kullanılmıştır ve iki çözücüyle de elde edilen TMA, TFM, TAK sonuçları RSM ile incelenmiş ve değerlendirmeler aşağıda açıklanmıştır.



Çizelge 4.3 Kırmızı Lahanaların Mikrodalga Destekli Özütleme Verilerinin Regresyon Denklemleri

Parametreler		Eşitlik	R ²
TMA (mg siyanidin/L)	(Etanol+su(1/1,v/v))	$Y_1=185,56- 12,47 X_1- 25,02 X_2- 0,75 X_3- 39,90 X_1X_1+ 3,12 X_2X_2-12,29 X_3X_3-10,02X_1X_2+5,62 X_1X_3- 5,51 X_2X_3$	80,23%
TFM (mg GAE/L)	(Etanol+su(1/1,v/v))	$Y_2=858,8- 48,0 X_1- 166,7 X_2- 15,1 X_3- 111,3 X_1X_1+ 62,4 X_2X_2+ 38,0 X_3X_3+ 3,1 X_1X_2 + 44,4 X_1X_3 - 34,5 X_2X_3$	89,69%
TAK _{DPPH} (mg DPPH/L)	(Etanol+su(1/1,v/v))	$Y_3=97,50- 0,19X_1- 31,38 X_2+ 0,93X_3- 10,83 X_1X_1+ 10,48 X_2X_2- 4,68 X_3X_3 - 2,47 X_1X_2 - 0,91 X_1X_3 + 0,94 X_2X_3$	94,58%
TAK _{CUPRAC} (mmol TE/L)	(Etanol+su(1/1,v/v))	$Y_4=9,085- 0,278 X_1- 4,190 X_2+ 0,569 X_3+ 0,763 X_1X_1+ 2,045 X_2X_2- 0,179 X_3X_3 + 0,558 X_1X_2 + 0,192 X_1X_3 - 1,100 X_2X_3$	96,80%
TMA (mg siyanidin/L)	(%100su)	$Y_5=71,47- 2,64 X_1- 23,89 X_2- 6,22 X_3+ 6,04 X_1X_1+ 9,35 X_2X_2+ 5,12 X_3X_3 + 8,27 X_1X_2 + 7,54 X_1X_3 + 6,35 X_2X_3$	88,06%
TFM (mg GAE/L)	(%100su)	$Y_6=1037,0+ 59,7 X_1- 471,3 X_2- 38,1 X_3+ 231,7 X_1X_1+ 217,4 X_2X_2- 140,2 X_3X_3 + 54,6 X_1X_2 + 58,5 X_1X_3 - 31,7 X_2X_3$	85,06%
TAK _{DPPH} (mg DPPH/L)	(%100su)	$Y_7=64,58+ 5,90 X_1- 30,97 X_2- 1,14 X_3+ 13,18 X_1X_1+ 11,33 X_2X_2- 7,03 X_3X_3 + 5,27 X_1X_2 + 9,60 X_1X_3 - 4,89 X_2X_3$	88,02%
TAK _{CUPRAC} (mmol TE/L)	(%100su)	$Y_8=9,862- 0,792 X_1- 4,086 X_2- 0,323 X_3+ 0,963 X_1X_1+ 1,028 X_2X_2+ 0,124 X_3X_3 + 3,776 X_1X_2 + 0,668 X_1X_3 - 0,178 X_2X_3$	91,14%

Çözücü tipinin etanol/su olduğu şartlardaki TMA, TFM, TAK yanıt yüzey regrasyonları şöyledir:

X_1 ve X_2 parametreleri kırmızı lahanadaki TMA miktarını istatistiksel olarak önemli derecede etkilerken ($p \leq 0,05$); gücün (X_3) verim üzerinde anlamlı etkisi bulunmamaktadır. Aynı şekilde X_1X_1 ($p=0,000$), X_3X_3 ($P=0,010$), X_1X_2 ($P=0,038$) korelasyonlarının istatistiksel açıdan TMA üzerinde etkili olduğu ($p \leq 0,05$); X_2X_2 , X_1X_3 X_2X_3 ikili kombinasyonların ise TMA verimi üzerinde etkili olmadıkları görülmüştür. Modelin ikinci dereceden polinom denklemi Çizelge 4.3' de verilmiştir ve modelin R^2 değeri 80,23% çıkmıştır. RSM' de model uygunsuzluğu (lack of fit) $p \leq 0,05$ olduğu ve modelin tahmini TMA değeri ile deneysel TMA verilerinin uyumu için çiziler grafiğın R^2 değeri 0,8126 çıktığından (Şekil 4.5.a) modelin deneysel verilerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

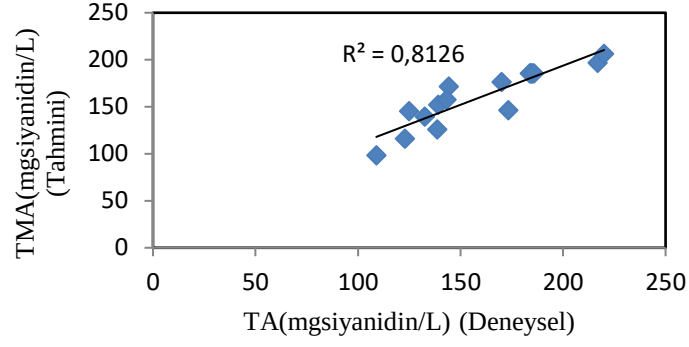
X_1 ve X_2 parametrelerinin kırmızı lahanalardaki TFM miktarını üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkili olduğu ($p \leq 0,05$) gücün ise etkili olmadığı tespit edilmiştir. X_1X_1 , X_2X_2 , X_3X_3 , X_1X_3 , X_2X_3 korelasyonları istatistik açıdan toplam fenolik madde miktarında önemli derecede etkiliyken ($p \leq 0,05$); X_1X_2 ' i TFM miktarında etkili değildir. Modelin ikinci derecede polinom denklemi Çizelge 4.3' de verilmiştir ve modelin R^2 değeri 89,69% çıkmıştır. RSM'de model uygunsuzluğunda (lack of fit) $p \leq 0,05$ bulunduğu ve modelin tahmini TFM değeri ile deneysel TFM verilerinin uyumu için çiziler grafiğın R^2 değeri 0,882 çıktığından (Şekil 4.5.b) modelin deneysel verilerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

MDÖ ile elde edilen kırmızı lahana özütlerinin TAK tayininde iki farklı yöntem kullanılmıştır: CUPRAC ve DPPH. CUPRAC ile antioksidan kapasitesi ölçümünde X_1 , X_2 , X_3 parametrelerinin üçünün de istatistiksel olarak kırmızı lahananın TAK üzerinde anlamlı ölçüde etkili olduğu görülmüştür ($p \leq 0,05$). X_3X_3 ($p=0,327$), X_1X_3 ($p=0,305$) korelasyonları dışında diğer tüm korelasyonlar istatistiksel olarak antioksidan kapasitesini önemli ölçüde etkilemektedir ($p \leq 0,05$). Modelin ikinci dereceden polinom denklemi Çizelge 4.3' de verilmiştir ve modelin R^2 değeri 96,80% çıkmıştır. RSM' de model uygunsuzluğunda (lack of fit) $p \leq 0,05$ bulunduğu ve modelin tahmini TAK değeri ile deneysel TAK verilerinin uyumu için çiziler grafiğın R^2 değeri 0,9017 çıktığından (Şekil 4.5.c) modelin deneysel verilerle uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

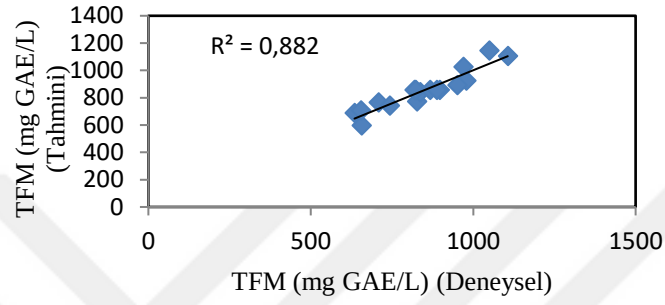
Antioksidan tayinini yapıldığı diğer bir yöntem olan DPPH yönteminde sadece X_2 parametresinin istatistiksel açıdan kırmızı lahanalarda TAK' da anlamlı ölçüde etkili olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$). İkili korelasyonlardan X_1X_1 , X_2X_2 , X_3X_3 korelasyonları TAK üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır ($p \leq 0,05$). Modelin ikinci dereceden

polinom denklemi Çizelge 4.43 de verilmiştir ve modelin R^2 değeri 94,58% çıkmıştır. RSM' de model uygunsuzluğunda (lack of fit) $p \leq 0,05$ çıkmamasına rağmen modelin tahmini TAK değeri ile deneysel TAK verilerinin uyumu için çiziler grafiğın R^2 değeri 0,9642 bulunmuş (Şekil 4.5.d) ve modelin deneysel verilerle uyumlu çıkmıştır.

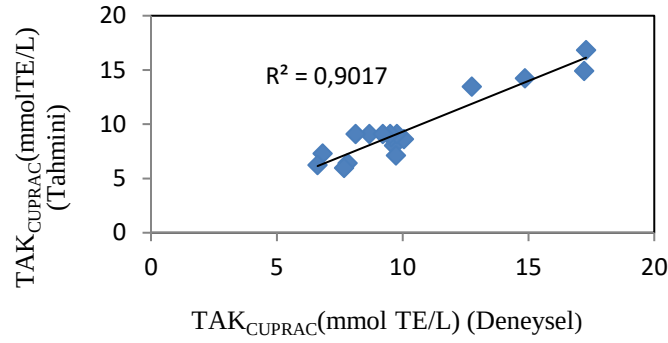




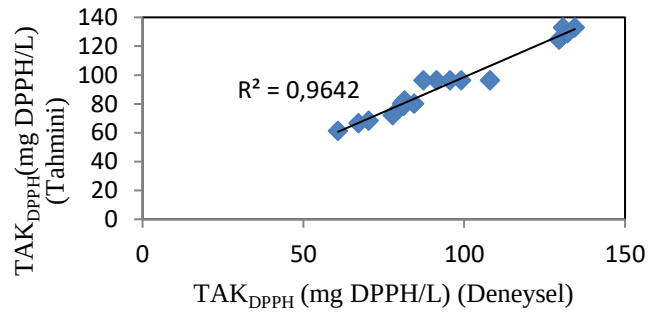
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.5 Kırmızı lahanalarda etanol/su (1/1,v/v) çözücü karışımıyla oluşturulan bağımlı değişkenlerin tahmin edilen ve deneysel değerlerinin karşılaştırılması (a) TMA, (b) TFM, (c) TAK_{CUPRAC} , (d) TAK_{DPPH}

Çözücü tipinin su olduğu şartlardaki TMA, TFM, TAK yanıt yüzey regrasyonları şöyledir: Yanıt yüzey regrasyonunda kırmızı lahanalardaki TMA miktarının değerlendirildiğinde; X_2 ve X_3 parametreleri kırmızı lahanalardaki TMA miktarı üzerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde etkiliyken ($p \leq 0,05$); X_1 değeri etkili değildir. X_1X_1 , X_2X_2 , X_3X_3 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_2X_3 korelasyonları toplam antosiyanin üzerinde anlamlı olarak etkilidirler ($p \leq 0,05$). Modelin ikinci dereceden polinom denklemi Çizelge 4.3' de verilmiştir ve metodun R^2 değeri 88,06% çıkmıştır. RSM' de model uygunsuzluğunda (lack of fit) $p \leq 0,05$ çıkmış ve modelin tahmini TMA değeri ile deneysel TMA verilerinin uyumu için çiziler grafiğinin R^2 değeri 0,8929 bulunmuştur (Şekil 4.6.a). Model deneysel verilerle uyumlu çıkmıştır.

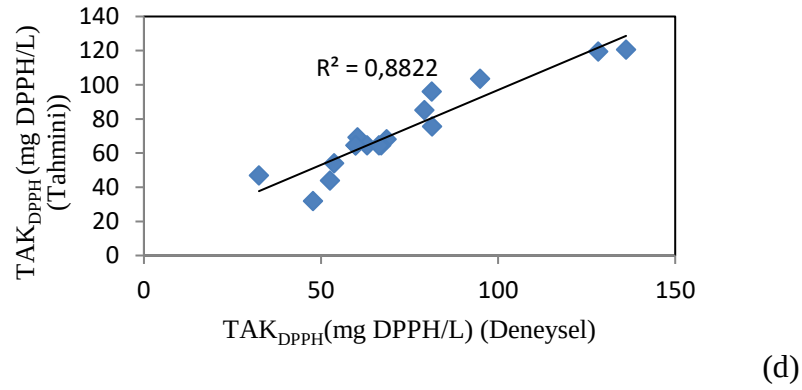
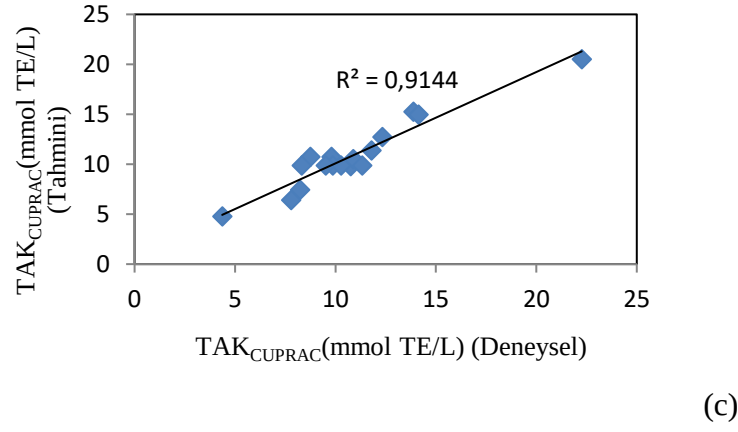
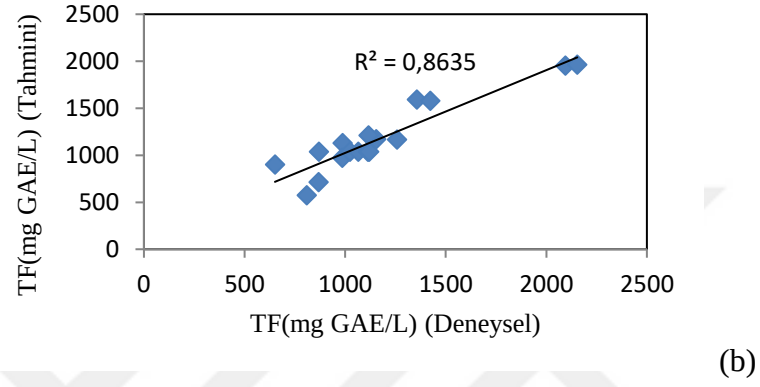
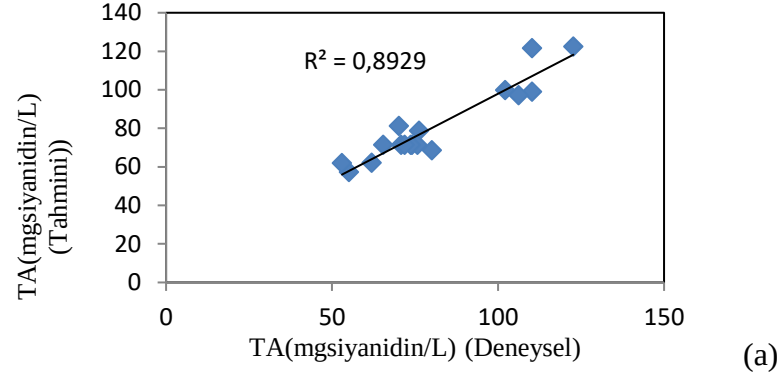
TFM miktarının regrasyon analizinde sadece X_2 (katı-sıvı oranı) parametresi TFM miktarını önemli düzeyde etkilemektedir ($p \leq 0,05$). X_1X_1 , X_2X_2 , X_3X_3 korelasyonları TFM miktarını istatistiksel olarak önemli ölçüde etkiliyor olduğu ($p \leq 0,05$); diğerlerinin ise etkilemediği tespit edilmiştir. Modelin ikinci dereceden polinom denklemi Çizelge 4.3' de verilmiştir ve oluşturulan modelin R^2 değeri 85,07% 'dir. RSM' de model uygunsuzluğunda (lack of fit) $p \leq 0,05$ çıkmış ve modelin tahmini TFM miktarı ile deneysel TFM verilerinin uyumu için çiziler grafiğinin R^2 değeri 0,8635 bulunmuş (Şekil 4.6.b), model deneysel verilerle uyumlu çıkmıştır.

CUPRAC yöntemiyle antioksidan regrasyonunda X_1 ve X_2 kırmızı lahanalarda TAK' ında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkiliyken ($p \leq 0,05$) özütlemeye kullanılan güç miktarının (X_3) etkili olmadığı tespit edilmiştir. $X_1.X_1$, $X_2.X_2$, $X_1.X_2$ korelasyonlarının toplam antioksidan üzerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede etkisi olduğu ($p \leq 0,05$) diğerlerinin ise TAK'ı etkilemediği tespit edilmiştir. Modelin ikinci dereceden polinom denklemi Çizelge 4.3' de verilmiştir ve oluşturulan modelin R^2 değeri 91,14% çıkmıştır. RSM' de model uygunsuzluğunda (lack of fit) $p \leq 0,05$ çıkmış ve modelin tahmini TAK değeri ile deneysel TAK verilerinin uyumu için çiziler grafiğinin R^2 değeri 0,9144 bulunmuştur (Şekil 4.6.c). Model deneysel verilerle uyumlu çıkmıştır.

TAK tayininde kullanılan DPPH yöntemi regrasyonunda seçilen 3 parametrelerden süre (X_1) ve katı-sıvı oranı (X_2) kırmızı lahanalarda TAK miktarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkiliyken ($p \leq 0,05$) uygulanan güç miktarının (X_3) etkili olmadığı tespit edilmiştir. X_1X_1 , X_2X_2 , X_1X_2 , X_1X_3 , X_3X_3 korelasyonlarının toplam antioksidan kapasitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkilediği ($p < 0,05$) diğer korelasyonların (X_2X_3 , X_1X_2) ise etkilemediği tespit edilmiştir. Modelin ikinci dereceden polinom denklemi Çizelge 4.3' de verilmiştir ve oluşturulan modelin R^2 değeri 88,02% çıkmıştır. RSM' de model uygunsuzluğunda (lack of fit) $p \leq 0,05$ çıkmış ve modelin tahmini TAK değeri ile deneysel

TAK verilerinin uyumu için çiziler grafiğın R^2 değeri 0,9642 bulunmuştur (Şekil 4.6.d). Model deneysel verilerle uyumlu çıkmıştır. MDÖ yönteminde yapılan 17 deneyin TMA, TFM, TAK regresyon sonuçları EK C de verilmiştir.

Literatürde bitkiler üzerinde yapılan MDÖ ile antosiyanin ve fenolik madde tayininde RSM optimizasyonu sıklıkla kullanılmış ve seçilen bağımsız değişkenlerin TMA, TFM üzerindeki etkileri yapılan çalışmayla paralellik göstermiştir. Zheng ve arkadaşlarının yaban mersini tozundan antosiyanin özütleme çalışmalarında katı-sıvı oranının seçilen diğer değişkenlere göre antosiyanin üzerinde en etkili parametre olduğu [58]; Vajic ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ısırgan otunun TFM içeriği üzerinde katı-sıvı oranının oldukça etkili olduğu katı-sıvı oranı arttıkça verimin azaldığı ve uygulama süresinin TFM üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir [94]. Afoakwah ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mikrodalga gücü ve ısınlama süresinin birbirlerini etkilediği, özütlemelerde genellikle düşük veya orta seviyede güç ile uzun süre uygulamasının tercih edildiği bildirilmiştir. 500-1000 W arasındaki güçlerin flavonoidler üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ve yüksek güç uygulamasının termal bozulmaya neden olabildiği belirtilmiştir [95].

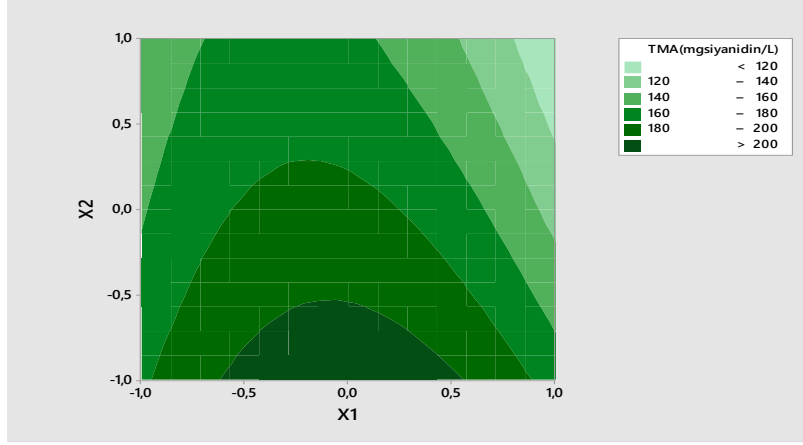


Şekil 4.6 Kırmızı lahanalarda %su çözücüsüyle oluşturulan bağımlı değişkenlerin tahmin edilen ve deneysel değerlerinin karşılaştırılması (a) TMA, (b) TFM, (c) TAK_{CUPRAC}, (d) TAK_{DPPH}

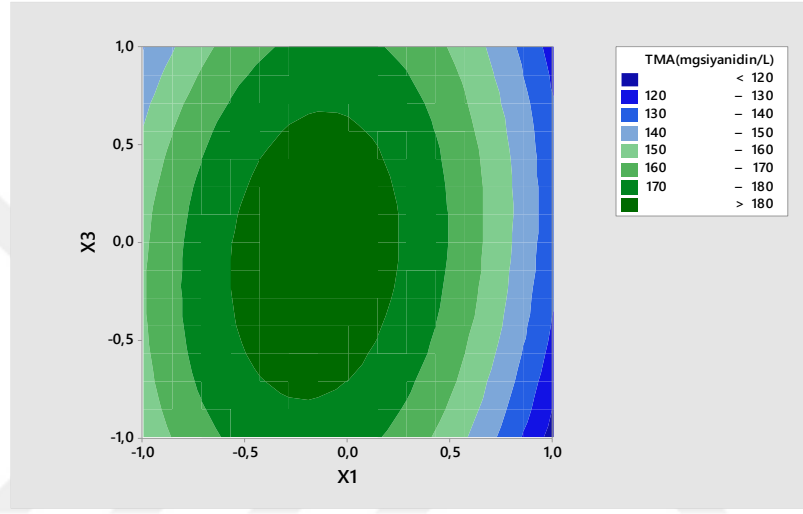
Kırmızı lahanaların çözücünün **etanol/su (1/1,v/v)** olduğu MDÖ ile elde edilen özütlerde bağımlı değişkenlerin (TMA, TFM, TAK) bağımsız değişkenlere göre değişimlerini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey eğrileri oluşturulmuş (maksimum noktaya göre) ve bunlar Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10' da gösterilmiştir. TMA miktarının; daha az çözücü kullanıldığında daha yüksek olduğu; uygulama süresinin artmasıyla önce arttığı daha sonra azaldığı; uygulanan gücün artmasıyla önce arttığı ancak yüksek güç seviyesi uzun süre uygulandığında antosiyaninlerin kimyasal yapısı bozulmaya başladığından verimde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Liazid ve arkadaşları MDÖ ile üzüm antosiyaninlerini tespit etmiş ve çalışmada da sürenin uzamasıyla TMA'nın önce arttığı daha sonra azalmaya başladığı görülmüştür [59]. Zou ve arkadaşları dut antosiyaninlerini MDÖ ile özütlemiş ve yaptıkları RSM istatistik sonuçlarına göre güç ve sürenin artırılmasıyla TMA miktarının ilk önce arttığı daha sonra azaldığı gözlemlenmiştir [83]. Çalışmamız sonuçları literatür ile benzerlik göstermiştir.

TFM veriminin; (etanol-su çözücü tipinde) özütleme süresinin uzamasıyla ilk önce arttığı bir süre sonra azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Bunun sebebi sürenin uzamasıyla ilk başta TFM' lerin çözülebileme fırsatı bulduğundan verimde artışa neden olması uygulama süresinin gittikçe artmasıyla da sıcaklığın artması ve fenolik bileşiklerin bozulmaya başlaması olabilmektedir. Literatürde olduğu gibi seyreltme oranının TFM verimi üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir [80]. Gücün TFM üzerinde çok da etkili olmadığı görülmüştür (Şekil 4.8). İnce ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MDÖ ve konvansiyonel yöntemle melisa bitkisinden fenolik madde özütlenmiş ve MDÖ ANOVA sonuçlarından MDÖ' de katı-sıvı oranının TFM üzerinde etkili olduğu, uygulama süresi çok uzadıkça TFM miktarının azalmaya başladığı tespit edilmiştir [80].

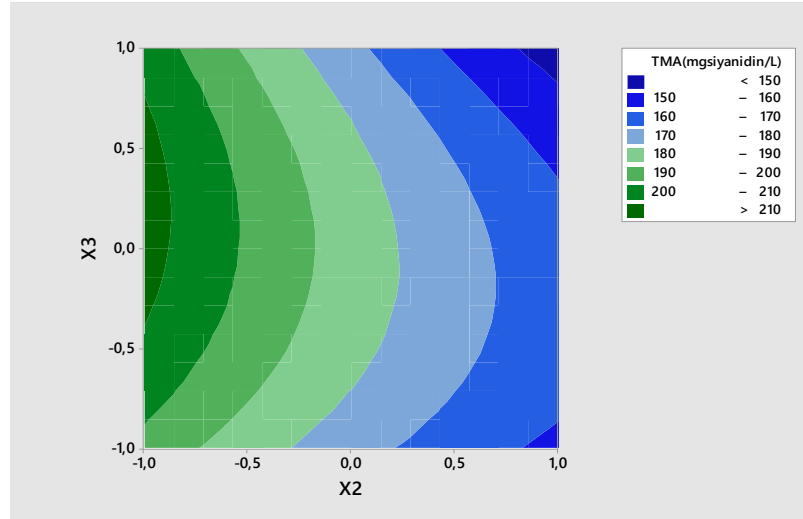
Toplam antioksidan kapasitesinin (DPPH yöntemiyle); uygulama süresi 10 dakikaya yaklaştıkça arttığı-sürenin gittikçe uzamasıyla minimuma doğru gittiği, katı-sıvı oranının artmasıyla azaldığı ve gücün TAK üzerinde çok etkili olmadığı görülmüştür (Şekil 4.9). Bulgular literatüre benzerlik göstermektedir [96]. Toplam antioksidan kapasitesinin (CUPRAC yöntemiyle); katı-sıvı oranı artarken azaldığı, güç artarken arttığı ve sürenin 5 dk olduğunda maksimum olduğu sürenin 10-15 dk arası bir noktaya kadar azaldığı sonra 15 dk ya doğru tekrar arttığı görülmüştür (Şekil 4.10).



a)

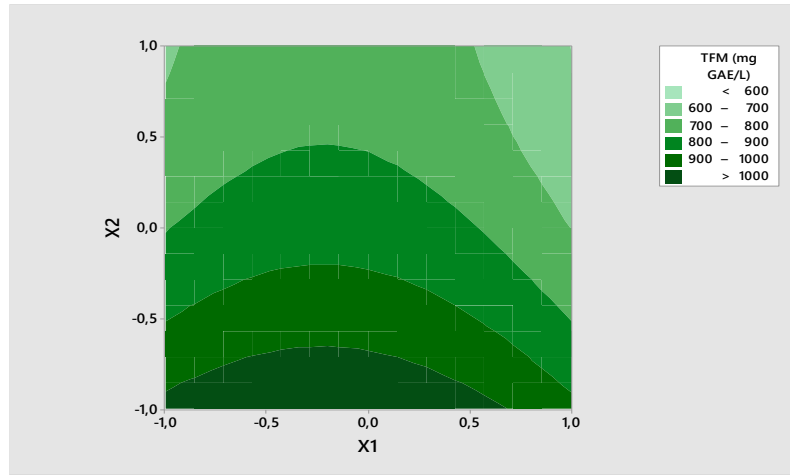


b)

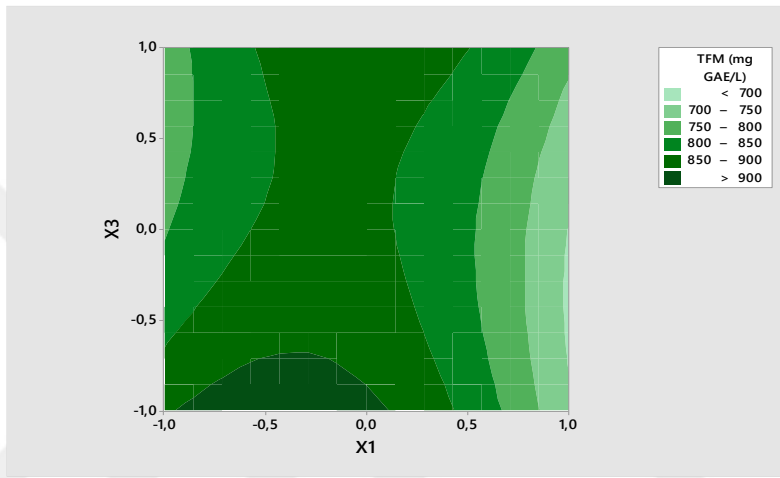


c)

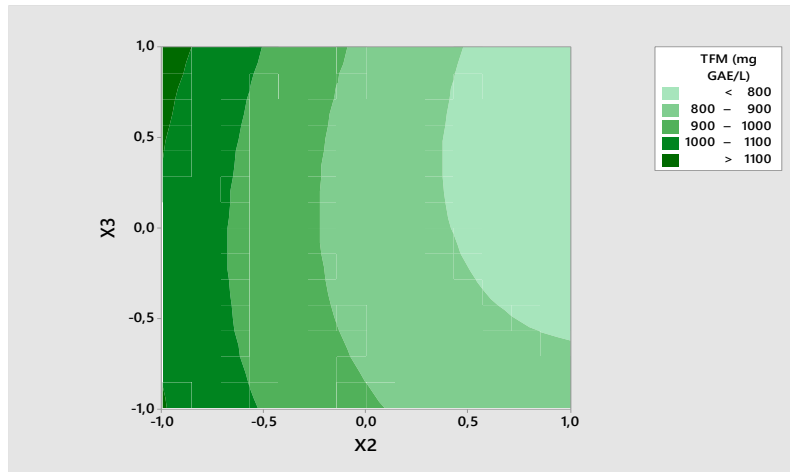
Şekil 4.7 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TMA üzerindeki etkisi (çözücü: etanol-su (1/1,v/v) iken) (a) $X_3=0$, (b) $X_2=0$, (c) $X_1=0$



a)

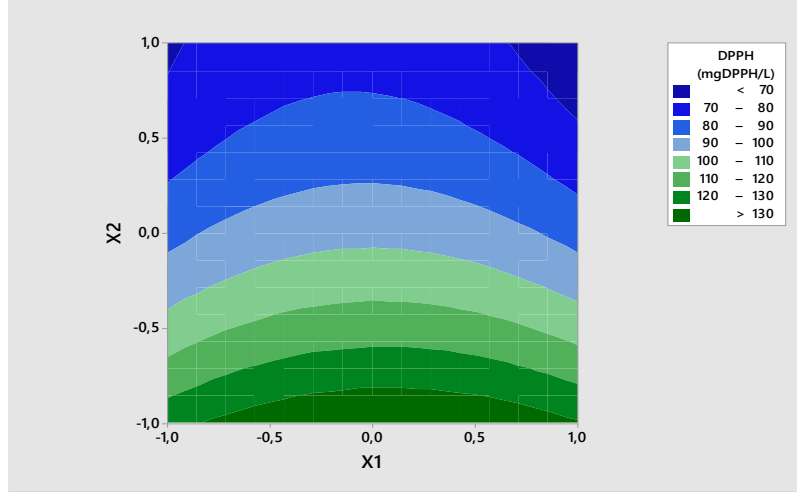


b)

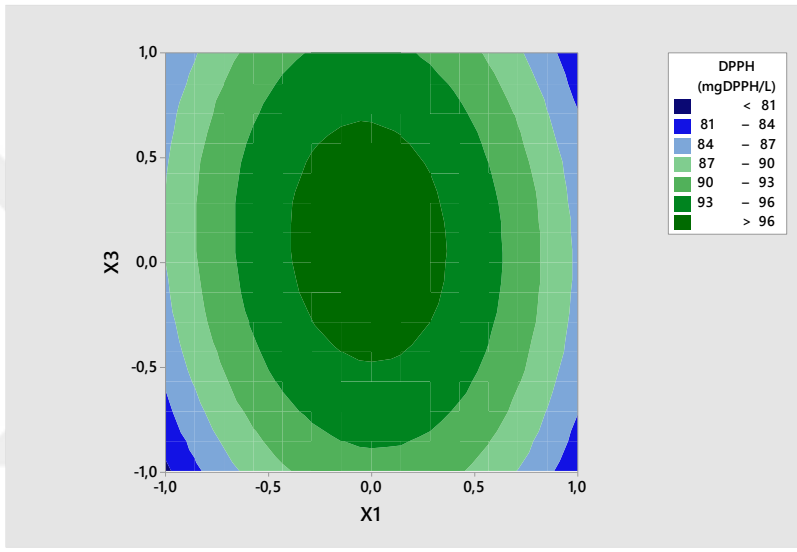


c)

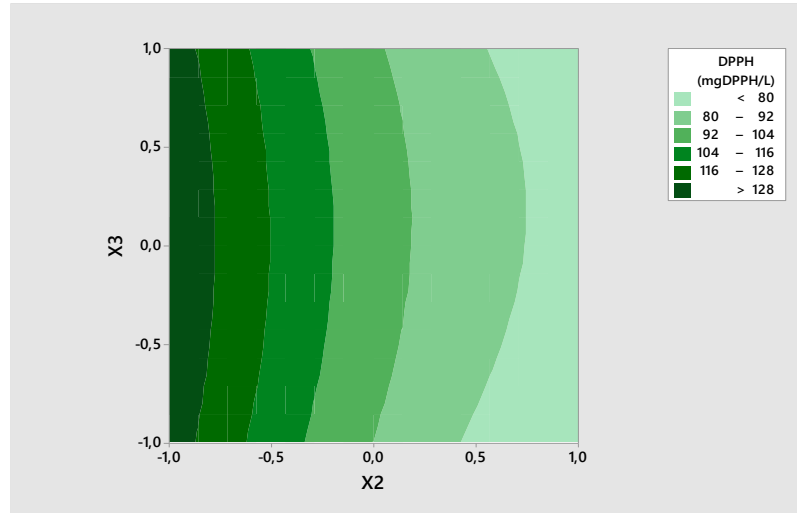
Şekil 4.8 Özütlenme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TFM üzerideki etkisi (çözücü: etanol-su (1/1,v/v) (a) $X_3=0$, (b) $X_2=0$, (c) $X_1=0$



a)

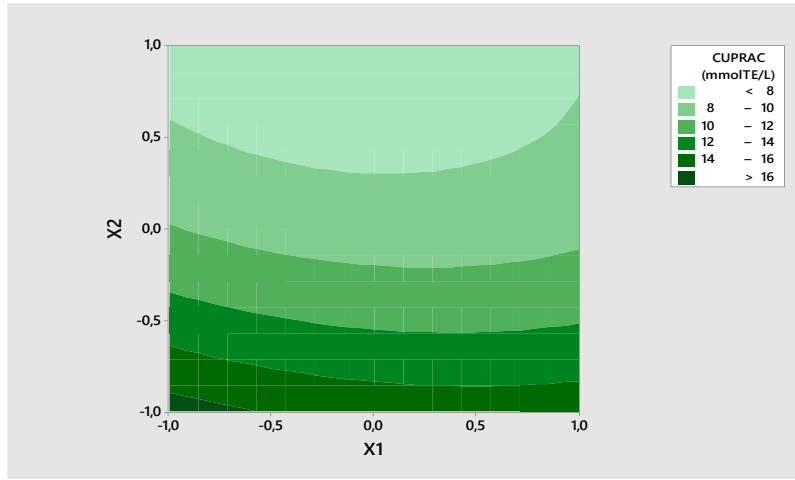


b)

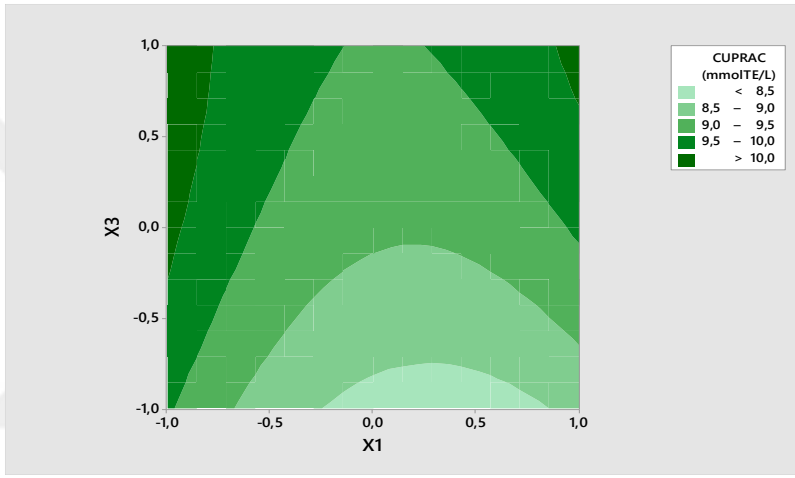


c)

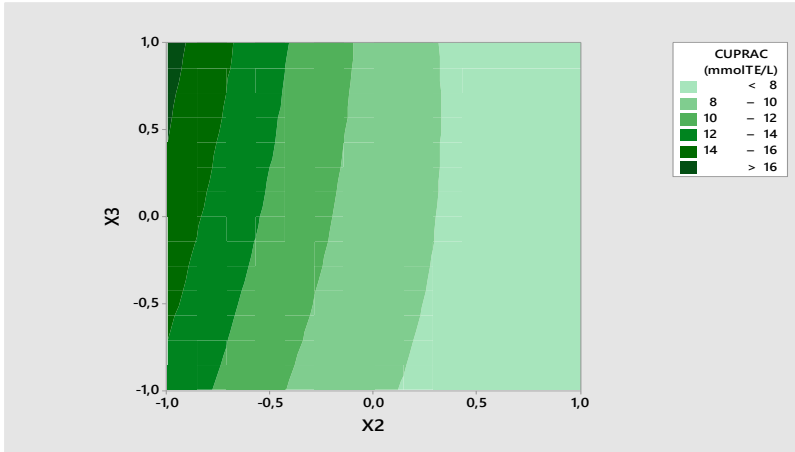
Şekil 4.9 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TAK_{DPPH} üzerindeki etkisi (çözücü: etanol-su (1/1,v/v) (a) $X_3=0$, (b) $X_2=0$, (c) $X_1=0$)



a)



b)

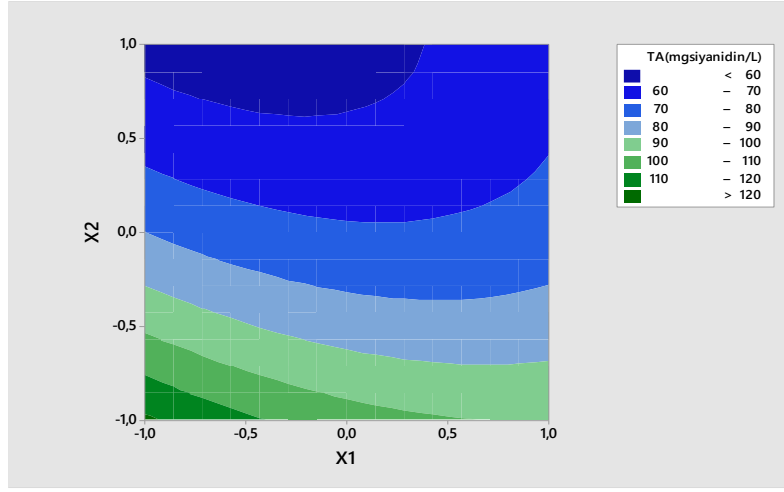


c)

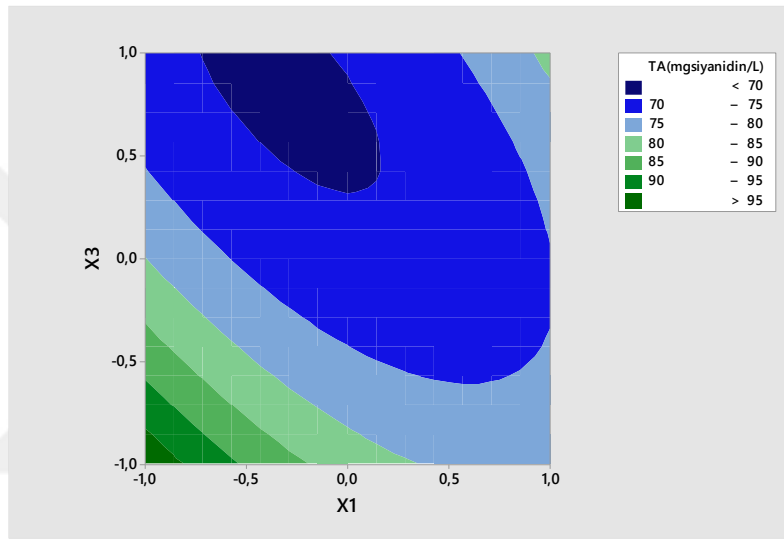
Şekil 4.10 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TAK_{CUPRAC} üzerindeki etkisi (çözücü: etanol-su (1/1,v/v) (a) $X_3=0$, (b) $X_2=0$, (c) $X_1=0$

Kırmızı lahanaların çözücünün **su** olduğu MDÖ ile elde edilen özütlerde bağımlı değişkenlerin (TMA, TFM, TAK) bağımsız değişkenlere göre değişimlerini gösteren 3 boyutlu yanıt yüzey eğrileri oluşturulmuş (maksimum noktaya göre) ve bunlar Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14’ de gösterilmiştir. Toplam antosiyanin miktarının; uygulama süresinin kısalmasıyla arttığı, katı-sıvı oranının azalmasıyla arttığı ve gücün artmasıyla arttığı görülmüştür (Şekil 4.11).

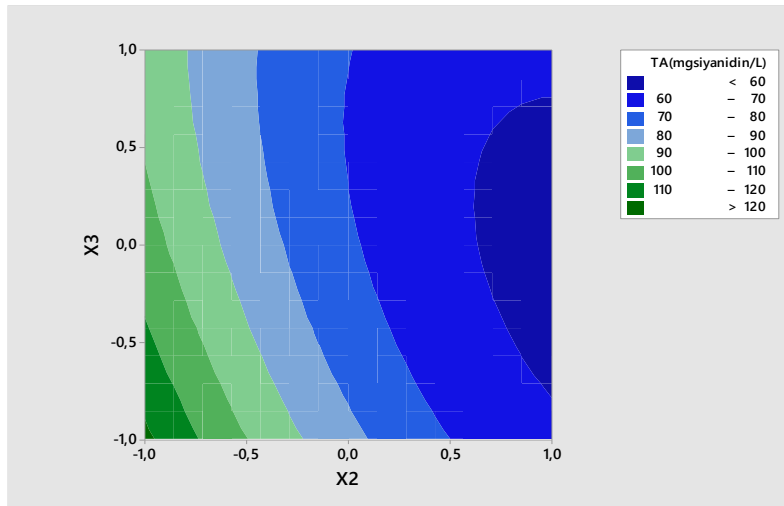
TFM miktarının; uygulanan süre 15 dk iken maksimum olduğu, süre 10 dk iken minimum olduğu, gücün artmasıyla arttığı, katı-sıvı oranının artmasıyla azaldığı görülmüştür (Şekil 4.12). Toplam antioksidan kapasitesinin (DPPH yöntemiyle); uygulanan süresi 5 dk iken maksimum olduğu ve 10 dk iken minimum olduğu, katı-sıvı oranının artmasıyla azaldığı, güç 600W iken verimin maksimum olduğu ve gücün artmasıyla arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Toplam antioksidan kapasitesinin (CUPRAC yöntemiyle); uygulama süresi 15 dk iken minimum olduğu 5 dk iken maksimum olduğu, gücün artmasıyla arttığı ve katı-sıvı oranının artmasıyla azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



a)

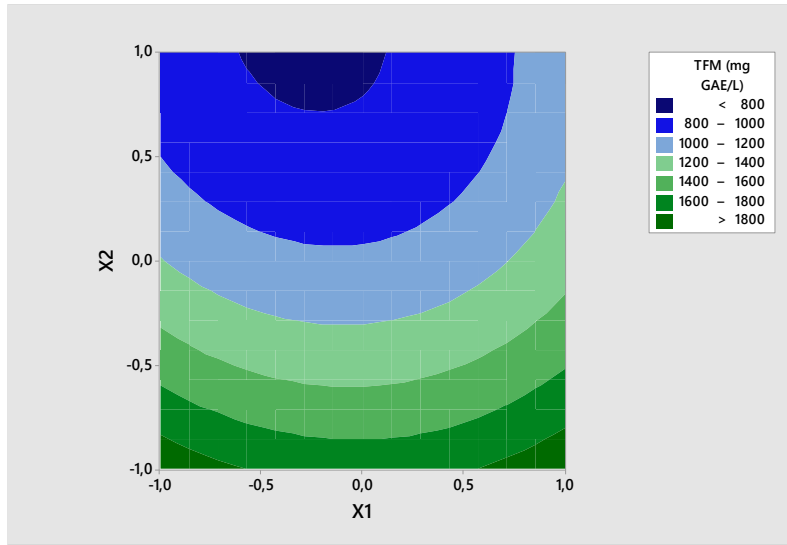


b)

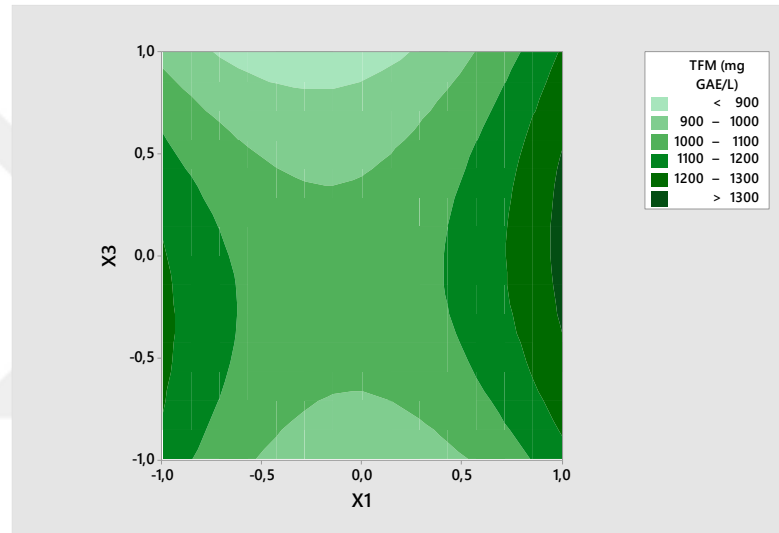


c)

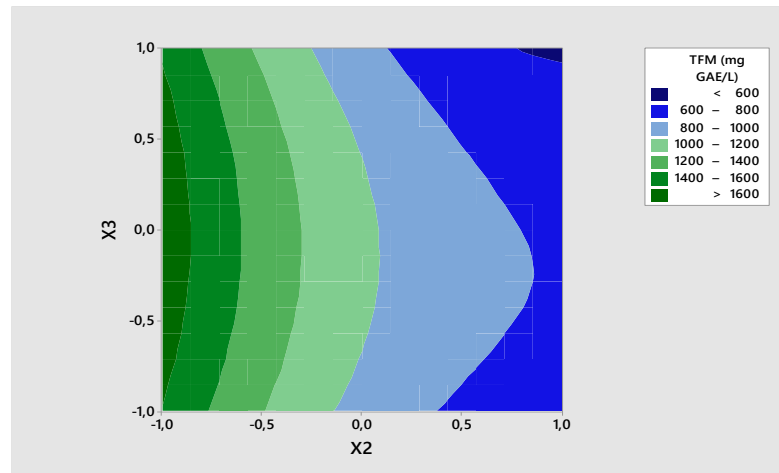
Şekil 4.11 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TMA üzerindeki etkisi (çözücü: %su iken) (a) $X_3=0$, (b) $X_2=0$, (c) $X_1=0$



a)

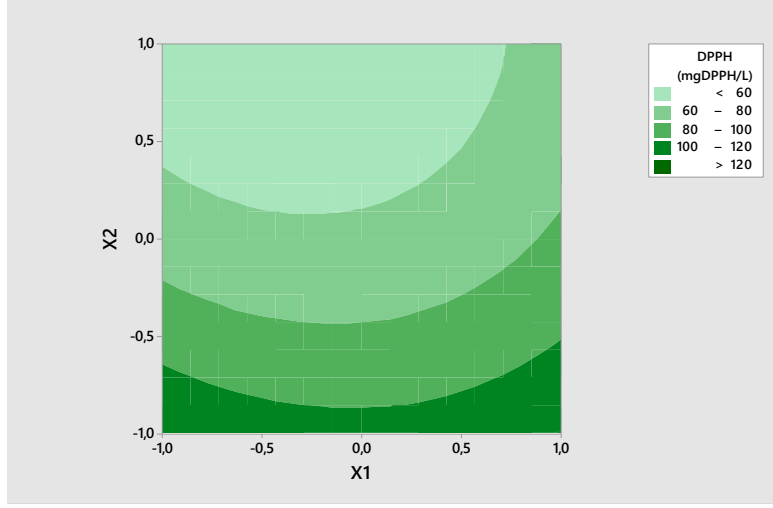


b)

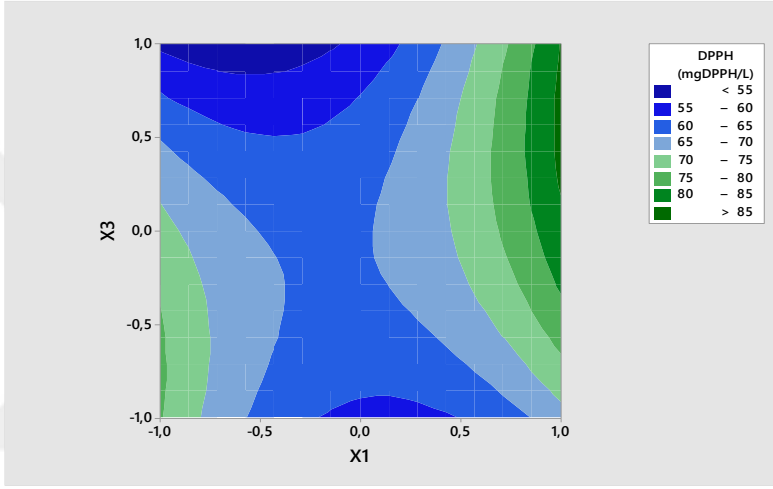


c)

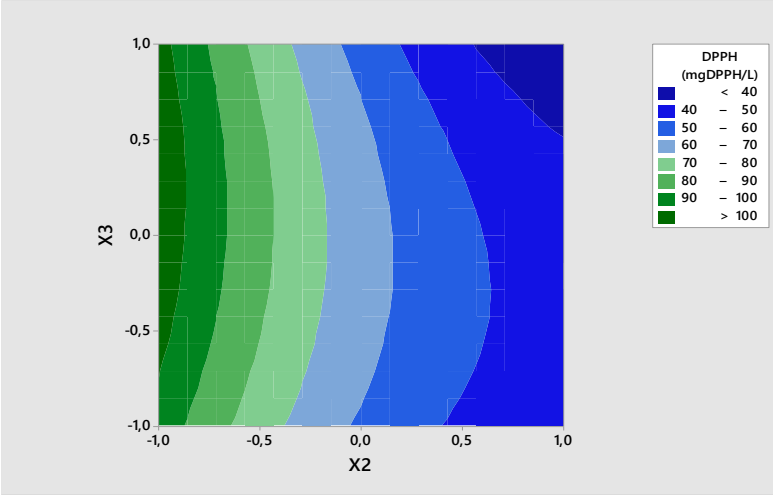
Şekil 4.12 Özütlenme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalgı gücü (X_3)' nün TFM üzerindeki etkisi (çözücü: %su iken) (a) $X_3=0$, (b) $X_2=0$, (c) $X_1=0$



a)

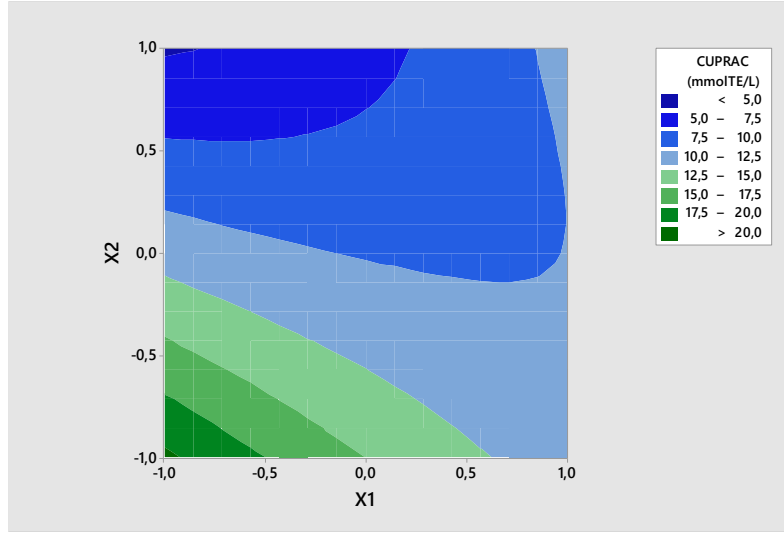


b)

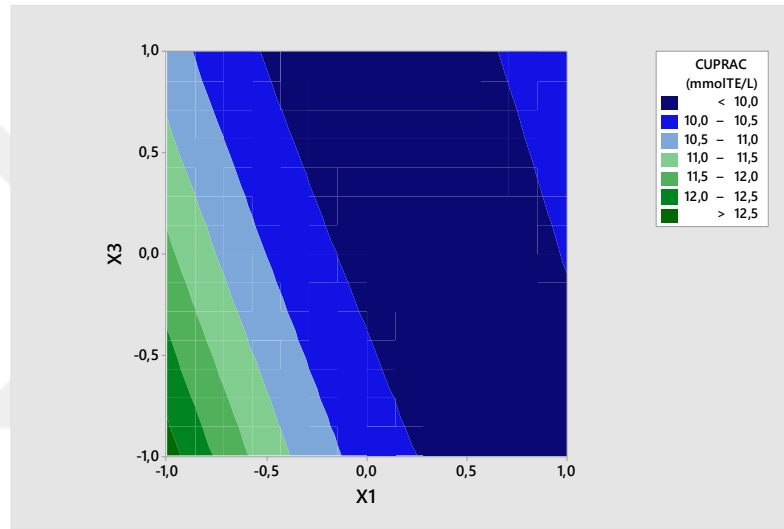


c)

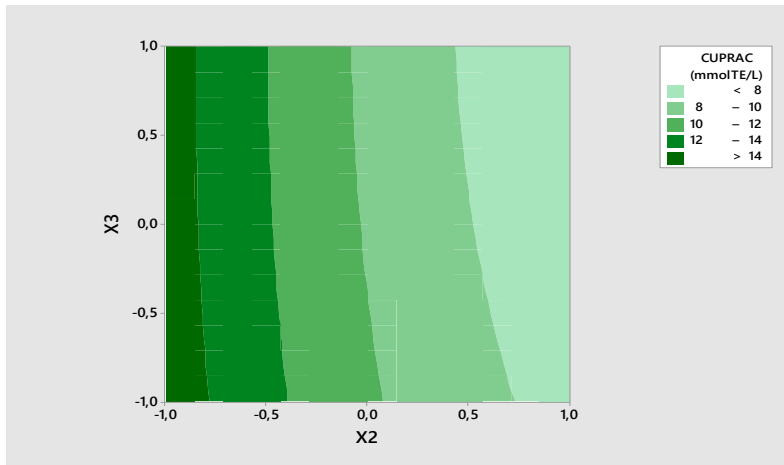
Şekil 4.13 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TAK_{DPPH} üzerindeki etkisi (çözücü: %su iken) (a) $X_3=0$, (b) $X_2=0$, (c) $X_1=0$



a)



b)



c)

Şekil 4.14 Özütleme süresi (X_1) Katı-sıvı oranı (X_2), mikrodalga gücü (X_3)' nün TAK_{CUPRAC} üzerindeki etkisi (çözücü: %su iken) (a) $X_3=0$, (b) $X_2=0$, (c) $X_1=0$

MDÖ ile özütlenen kırmızı lahana özütlerinin optimum TMA, TFM, TAK koşulları RSM kullanılarak çoklu optimizasyonla bulunmuştur. Çizelge 4.4' de % 100 su ve etanol/su (1/1, v/v) olmak üzere kullanılan 2 farklı çözücü için de optimum noktalar; kodlanmış ve kodlanmamış değerler olarak gösterilmiştir. Çözücü etanol/su (1/1, v/v) iken optimum şartlar; 9,85 dk, 1/20 katı-sıvı çözücü oranı ve 595,96 W olmuştur. Optimum TMA miktarı 438 mg siyanidin/L, optimum TFM miktarı 1143,43 mg GAE/L, optimum TAK_{CUPRAC} miktarı 16,80 mmol TE/L, optimum TAK_{DPPH} miktarı ise 134,82 mg DPPH/L olarak bulunmuştur.

Çözücünün %100 su iken optimum şartlar; 5 dk, 1/20 katı-sıvı oranı ve 309,09W güç olmuştur ve Çizelge 4.4'de gösterilmiştir. Optimum TMA miktarı 131,86 mg siyanidin/L, optimum TFM miktarı 1952,85 mg GAE/L, optimum TAK_{CUPRAC} miktarı 20,90 mmol TE/L, optimum TAK_{DPPH} miktarı 120,63 mg DPPH/L olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.4 RSM optimizasyonu ile elde edilen optimum değerler

Parametreler	Kodlanmış / Kodlanmamış		Kodlanmış / Kodlanmamış	
	etanol/su (1/1, v/v)		%100 su	
Süre (dk)	-0,03	9,85	-1	5
Katı-sıvı oranı	-1	20	-1	20
Güç (W)	0,98	595,96	-0,46	309,09

4.4 MDÖ ile Elde Edilen Özütlerin DAD-LC-MS ile Analizi

Çalışmada MDÖ yöntemiyle elde edilen kırmızı lahana özütlerinin toplam antosiyanin miktarıyla karşılaştırma yapabilmek için, konvansiyonel özütleme yöntemiyle elde edilen kırmızı lahana özütlerinin toplam antosiyanin miktarı ölçülmüştür. Konvansiyonel yöntemler ile MDÖ yöntemlerinden hangisinin daha verimli olduğunu tespit etmek için kullanılan 2 farklı konvansiyonel yöntem (3.3.1 ve 3.5) TMA sonuçları ile MDÖ TMA sonuçları LC-MC kullanılarak birbirleriyle oranlanmış ve böylece özütleme yöntemleri karşılaştırması yapılmıştır.

Çizelge 4.5' de; 3.3.1' de belirtilen konvansiyonel yöntem antosiyanin miktarının MDÖ ile karşılaştırılma oranları gösterilmiş 4.6' da ise 3.5' de belirtilen konvansiyonel yöntem antosiyanin miktarının MDÖ ile karşılaştırılma oranları gösterilmiştir. Tüm özütlemeye proseslerinde etanol/su ve su olmak üzere iki farklı çözücü kullanılmış ve her iki yöntemde de etanol/su karışımının kullanıldığı özütlemeye veriminin daha yüksek çıktığı görülmüştür. Çizelge 4.5' de görüldüğü gibi; çözücü olarak saf suyun kullanıldığı MDÖ sonuçları, etanol/su karışımı çözeltisi oranlarından düşük çıkmıştır.

Konvansiyonel yöntem ile MDÖ karşılaştırmasında, çözücü su olduğunda konvansiyonel yöntem sonuçları MDÖ' nün % 37,27 ile % 88' i arasında iken çözücü etanol/su olduğunda sonuçlar % 59,97 ile % 108,03 arasında çıkmıştır (Çizelge 4.5). Etanol-su karışımının kullanıldığı konvansiyonel yöntem sonuçları MDÖ sonuçlarına yakın çıkarken, su konvansiyonel sonuçları MDÖ sonuçlarından oldukça düşük çıkmıştır. 3,5' de anlatılan konvansiyonel yöntem sonuçları ise çözücü su iken MDÖ sonuçlarının % 29,29 ile % 60,97; çözücü etanol/su olduğunda ise bu oran % 50,06 ile % 64,09 arasında çıkmıştır (Çizelge 4.6). Böylece MDÖ yönteminin her iki konvansiyonel yöntemden de verimli olduğu tespit edilmiştir. Literatürde de MDÖ' nün konvansiyonel yöntemlere göre daha verimli bir özütlemeye yöntemi olduğu belirtilmiştir. Zou ve arkadaşlarının HPLC-ESI-MS ile duttan antosiyanin eldesi çalışmalarında konvansiyonel yöntem ile antosiyanin verimi MDÖ nün sadece % 67' si iken konvansiyonelde uygulanan sürenin artmasıyla bu oran % 85' lere çıkmıştır [83]. Yang ve arkadaşları HPLC-MS ile mor mısır koçanı antosiyaninlerini özütlemiş ve 10 dk uygulanan konvansiyonel yöntem sonuçları MDÖ sonuçlarının sadece % 67,8' i iken konvansiyonel özütlemeye süresi 60 dk' ya çıkınca bu oran % 85,6 olmuştur [56]. Yapılan çalışmalarda konvansiyonel özütlemeye yönteminden MDÖ' nün daha verimli yöntem olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5 Konvansiyonel yöntem ile özütlenen kırmızı lahana özütleri TMA sonuçlarının, MDÖ yöntem sonuçlarına oranları

Deney No	Süre	Oran	Güç	Su Özütleme Oranı	Etanol/su Özütleme Oranı
1	5	1:20	400	76,55%	78,33%
2	15	1:20	400	88,00%	80,45%
3	5	1:40	400	37,27%	87,07%
4	15	1:40	400	61,18%	108,03%
5	5	1:30	200	61,69%	88,72%
6	15	1:30	200	53,19%	85,21%
7	5	1:30	600	47,25%	83,66%
8	15	1:30	600	49,17%	85,23%
9	10	1:20	200	43,64%	59,97%
10	10	1:40	200	50,24%	79,06%
11	10	1:20	600	42,29%	72,26%
12	10	1:40	600	48,35%	82,43%
13	10	1:30	400	47,14%	90,85%
14	10	1:30	400	53,20%	88,70%
15	10	1:30	400	50,08%	92,26%
16	10	1:30	400	48,61%	98,19%
17	10	1:30	400	51,67%	98,39%

Sonuçlar iki tekrar üzerinden verilmiştir.

Çizelge 4.6 3.5' de belirtilen konvansiyonel yöntem ile özütlenen kırmızı lahana özütleri TMA sonuçlarının, MDÖ yöntem sonuçlarına oranları

Deney No	Süre	Oran	Güç	Su Özütleme Oranı	Etanol/su Özütleme Oranı
1	5	1:20	400	53,03%	54,26%
2	15	1:20	400	60,97%	55,74%
3	5	1:40	400	25,82%	60,32%
4	15	1:40	400	42,39%	64,09%
5	5	1:30	200	42,74%	61,46%
6	15	1:30	200	36,85%	59,03%
7	5	1:30	600	32,73%	57,96%
8	15	1:30	600	34,07%	59,04%
9	10	1:20	200	30,23%	59,11%
10	10	1:40	200	34,81%	54,77%
11	10	1:20	600	29,29%	50,06%
12	10	1:40	600	33,50%	57,11%
13	10	1:30	400	32,66%	62,94%
14	10	1:30	400	36,86%	61,45%
15	10	1:30	400	34,70%	63,92%
16	10	1:30	400	33,68%	68,03%
17	10	1:30	400	35,80%	68,16%

Sonuçlar iki tekrar üzerinden verilmiştir.

LC-MS ile kırmızı lahana özütlerinde antosiyanin analizi yapılmıştır. Ethanol-su ve su özütlerinde aranan moleküllerin kütleleri MS-Scan modu ile taranmıştır. Bu kütleler MS Scan modunda tarandıktan sonra, baskın pikler seçilmiş, buna göre seçilen kütleleri içeren SIM metodu yazılmıştır. Daha sonra bu kütlelerin gözlemlendiği pikler DAD ile dedekte edilerek kuantifikasyona gidilmiştir. Özütlerde gözlenen kütlelere ait antosiyanin molekülleri ve alıkonma süreleri Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8' de verilmiştir. Literatür çalışmalarında da olduğu gibi standart antosiyaninlere ulaşamadığından tanımlanacak antosiyaninlerin alıkonma süreleri ve molekül ağırlıkları literatürden karşılaştırma yapılarak tespit edilmiş [32;56] ve böylece baskın antosiyanin çeşitleri belirlenmiştir. Çözücü su iken; konvansiyonel yöntemde en yüksek verimin elde edildiği (40°C sıcaklıkta 6 saat özütleme) koşul ile MDÖ' de en yüksek verimin elde edildiği (1:20 katı:çözücü oranı, 400 W gücünde 15 dakika özütleme) koşul seçilerek, çözücü etanol-su olduğunda ise yine her iki yöntemde de maksimum verimin elde edildiği şartlar (konvansiyonelde; 40°C sıcaklıkta 4 saat özütleme-MDÖ' de; 1:30 katı:çözücü oranı, 400 W gücünde 10 dakika özütleme) seçilerek LC-MS ile antosiyanin tespiti yapılmıştır. Her iki özütleme yönteminde de elde edilen antosiyanin çeşitleri aynı olmuştur. Bu bulgulara bakarak mikrodalga ısımasının antosiyaninlerin yapısını bozmadığı tespit edilmiştir. Literatürde de mikrodalga ısımasının antosiyaninlerin kimyasal yapısını bozmadığı belirtilmiştir [89].

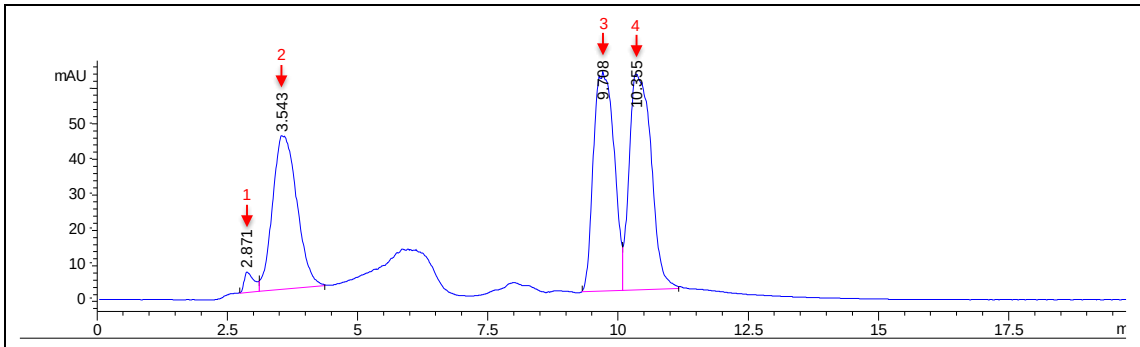
Kırmızı lahanalardaki ana antosiyaninler, siyanidin-3-O-diglukozit-5-O-glikozit çekirdeği bazında tanımlanmıştır ve bunlar p-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitlerle açillenmemiş, mono-açillenmiş veya di-açillenmiştir. Ethanol-su özütlerinde baskın olarak 4 pik gözlenip 8 çeşit antosiyanin elde edilmişken, su özütlerinde 3 pik gözlenmiş ve 7 çeşit antosiyanin elde edilmiştir (Şekil 4.15 Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18). Siyanidin-3-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-glukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(p-kumarol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(sinapol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(ferulol)(ferulol)-diglukozit-5glukozit, siyanidin-3-(ferulol)(sinapol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(sinapol)(sinapol)-diglukozit-5glukozit her iki çözücü tipinde ve her iki özütleme yönteminde gözlemlenen antosiyaninler olmuştur. Etanol-su özütlerinde su özütlerinden farklı olarak Siyanidin-3-o-glukosit pikine de rastlanmıştır.

Çalışmamızda tespit edilen kırmızı lahana antosiyanin çeşitleri literatürde belirtilen kırmızı lahana antosiyanin çeşitleri ile benzerlik göstermiştir [90;91;92;93;98;99]. Ancak tanımlanan antosiyanin sayılarında farklılıklar söz konusudur. Literatürde kırmızı lahana antosiyaninlerinin tanımlandığı çalışmalarda; Winczkowski ve arkadaşları 20 çeşit [32], Mizgier ve arkadaşları 21 çeşit [97], Gachovska ve arkadaşları 12 çeşit antosiyanin tespit

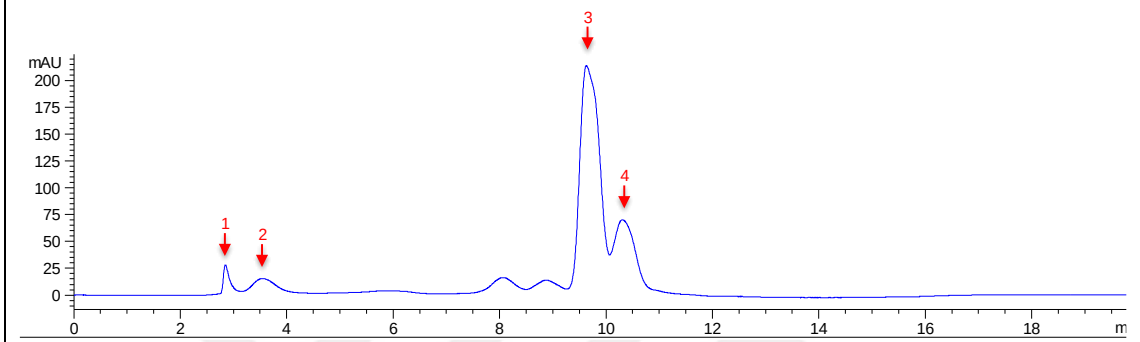
etmişlerdir [90]. Diğer çalışmalarda gözlemlenen antosiyanin sayısı 9'dan 24'e ve hatta 36'ya kadar değişiklik göstermiştir [98;99;100]. Bu gibi çeşitli sonuçlar, çeşitli hammaddeler, yetiştirme koşulları, iklim ve özütleme işleminin kendisi (parametreler, çözücü tipi) ve işaretleme ve tanımlama yöntemi gibi birçok faktörden kaynaklanabilmektedir [97].

Çizelge 4.7 Ethanol-su özütünde gözlenen kütleler ve kromatogramları

Pik	Alıkonma süresi (dk)	Bileşik	$[M]^+$ (m/z)
1	2,86	Siyanidin-3-o-glukosit	449
2	3,49	Siyanidin-3-diglukozit-5-glukozit	773
2	3,54	Siyanidin-3-glukozit-5-glukozit	611
3	9,69	Siyanidin-3-(p-kumarol)-diglukozit-5-glukozit	919
3	9,70	Siyanidin-3-(sinapol)-diglukozit-5-glukozit	979
4	10,36	Siyanidin-3-(ferulol)(ferulol)-diglukozit-5-glukozit	1125
4	10,40	Siyanidin-3-(ferulol)(sinapol)-diglukozit-5-glukozit	1155
4	10,41	Siyanidin-3-(sinapol)(sinapol)-diglukozit-5-glukozit	1185



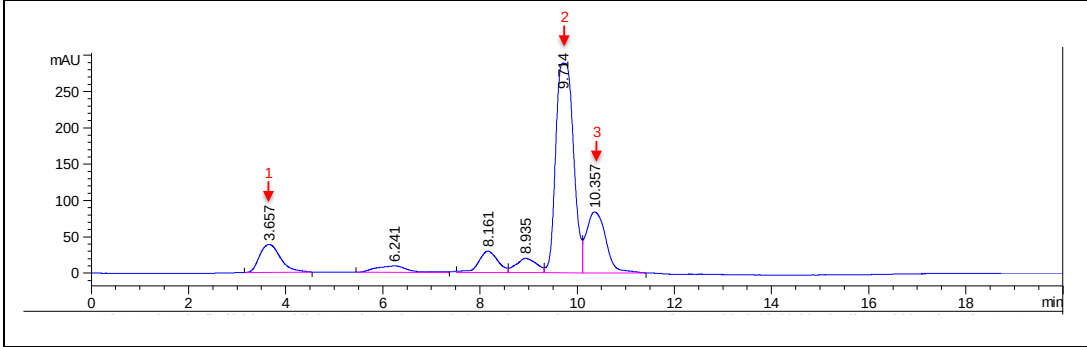
Şekil 4.15 Konvansiyonel etanol-su özüt kromatogramı (40°C sıcaklıkta 4 saat özütleme)



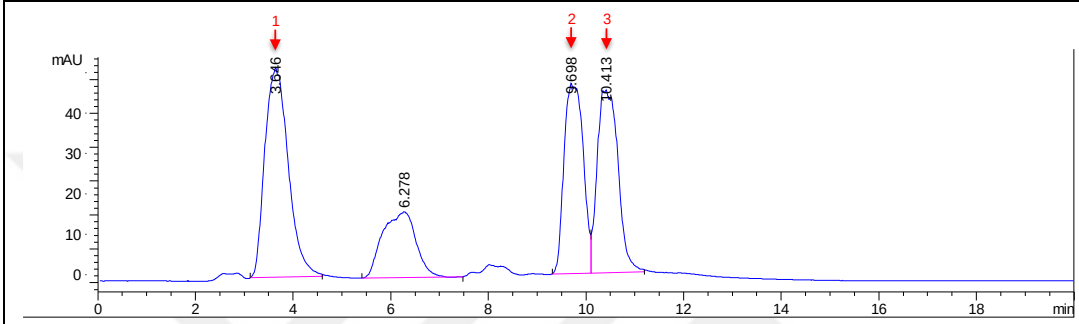
Şekil 4.16 Mikrodalga etanol-su özütü kromatogramı (1:30 katı:çözücü oranı, 400 W gücünde 10 dakika özütleme)

Çizelge 4.8 Su özütünde gözlenen kütleler ve kromatogramı

Pik	Alıkonma süresi (dk)	Bileşik	$[M]^+$ (m/z)
1	3,65	Siyanidin-3-diglukozit-5-glukozit	773
1	3,65	Siyanidin-3-glukozit-5-glukozit	611
2	9,69	Siyanidin-3-(p-kumarol)-diglukozit-5-glukozit	919
2	9,70	Siyanidin-3-(sinapol)-diglukozit-5-glukozit	979
3	10,36	Siyanidin-3-(ferulol)(ferulol)-diglukozit-5-glukozit	1125
3	10,40	Siyanidin-3-(ferulol)(sinapol)-diglukozit-5-glukozit	1155
3	10,41	Siyanidin-3-(sinapol)(sinapol)-diglukozit-5-glukozit	1185



Şekil 4.17 Konvansiyonel su özüt kromatogramı ((40°C sıcaklıkta 6 saat özütleme)



Şekil 4.18 Mikrodalga su özütü kromatogramı (1:20 katı:çözücü oranı, 400 W gücünde 15 dakika özütleme)

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada kırmızı lahanaların fizikokimyasal özellikleri belirlenmiş ve toplam monomerik antosiyanin (TMA), toplam fenolik madde (TFM) ve toplam antioksidan kapasiteleri (TAK) ölçülmüştür. Konvansiyonel özütleme (maserasyon) yöntemiyle ve mikrodalga destekli özütleme (MDÖ) yöntemiyle kırmızı lahanalar özütlenmiştir. Elde edilen özütlerin TMA, TFM ve TAK miktarları ölçülmüştür. DAD-LC-MS ile geleneksel yöntem ve MDÖ ile elde edilen kırmızı lahana özütlerinin TMA miktarları karşılaştırılmış ve kullanılan kırmızı lahanalarda hakim antosiyanin çeşitleri tespit edilmiştir.

İşlem görmemiş kırmızı lahanaların TMA değeri 228,44 mg siyanidin/L bulunmuştur. TFM, TAK değerlerini ölçmek için QUENCHER yöntemi kullanılmıştır. TFM ve TAK sonuçları sırasıyla; 34,11 mg GAE/g kuru ağırlık, QUENCHER_{DPPH} ile elde edilen 141,13 ppm TE/kg örnek ağırlık ve QUENCHER_{CUPRAC} 369,37 mmol TE/kg olarak belirlenmiştir. QUENCHER_{CUPRAC} ile elde edilen değer, QUENCHER_{DPPH} ile elde edilenden daha yüksek çıkmıştır.

Geleneksel yöntemle özütlemeye seçilmiş olan bağımsız değişkenlerin (40°C ve 60°C sıcaklık ve 4 ve 6 saat özütleme süresi), TMA, TFM ve TAK üzerine etkilerinin olup olmadığını tespiti için çift etkili ANOVA ile çözücünün etanol-su ve su olduğu her iki durumda da özütlemelerde sıcaklık ve sürenin, kırmızı lahana özütlerindeki TMA miktarı üzerinde istatistiksel açıdan önemli derecede etkili olduğu ($p \leq 0,05$) tespit edilmiştir.

MDÖ'de yanıt yüzey yöntemi kullanılarak, su ve etanol-su çözücüler için Box-Behnken deneysel tasarımı ile 17'şer deney yapılmış; MDÖ için bağımsız değişkenlerin optimum olduğu şartlar tespit edilmiştir. Geleneksel yöntemle (maserasyon) özütlemeye 4 ve 6 saatlik özütleme süreleri uygulanırken, MDÖ'de 5, 10 ve 15 dakikalık özütleme süreleri uygulanmıştır. Geleneksel yöntemde; 1/40 (katı/çözücü) seyreltme oranında, 40°C sıcaklıkta, 4 saatlik özütlemeye ve çözücünün etanol/su karışımı olduğu durumda en yüksek verim elde edilmiştir. Sonuçlar sırasıyla şöyledir; 240,69 mg siyanidin/L, 1677,33 mg GAE/L, 66,34 mg DPPH/L, 16,77 (CUPRAC) mmol TE/L. Geleneksel yöntemde en yüksek antosiyanin miktarı 240,69 mg siyanidin/L olarak ölçülmüşken MDÖ' de elde edilen en yüksek antosiyanin miktarı yine çözücünün etanol/su olduğu 10 dk-1/20 katı-sıvı oranı 600(W) güçte 220,01 mg siyanidin/L olarak bulunmuştur. Geleneksel yöntemin seyreltme oranının 1/40 iken MDÖ'de 1/20 olması ve birbirine yakın bu sonuçların geleneksel özütlemeye 4 saat sürerken, MDÖ' de 10 dakikada elde edilmesi ve daha az

çözücü kullanıyor olması, MDÖ'nün üstün özelliklerini ortaya çıkarmıştır. MDÖ ile elde edilen antosiyanin miktarının konvansiyonel yöntemle elde edilenden biraz düşük çıkma sebebi MDÖ' de uygulanan güç ve sürenin artmasıyla sıcaklıktaki artışın antosiyaninlerin yapısında bozulmaya sebep olmasından kaynaklanabilmektedir.

MDÖ yönteminde yanıt yüzey yönteminin uygulanması ile bulunan optimum şartlar çözücü etanol/su (1/1,v/v) iken; 9,85 dk, 1/20 katı/çözücü oranında, 595,96 W; çözücünün sadece su olduğu koşullarda ise optimum değerler 5 dk, 1/20 katı/çözücü oranı ve 309,09 W olarak bulunmuştur. Bu koşullarda optimum TMA, TFM ve TAK değerleri çözücü etanol/su iken sırasıyla 206,438 mg siyanidin/L, 1143,43 mg GAE/L, 134,823 mg DPPH/L, 16,8041 mmol TE/L iken çözücünün su olduğu durumda 131,863 mgsiyanidin/L, 1952,85 mgGAE/L, 120,626 mg DPPH/L, 20,9017 mmol TE/L olmuştur. Çözücünün etanol-su olduğu koşullarda sonuçlar daha yüksek elde edilmiştir.

Yanıt yüzey yönteminde elde edilen model denklemlerine göre elde edilen tahmini TMA, TFM, TAK sonuçları ile yapılan çalışmanın deneysel verilerinin uyumlu olduğu gözlenmiştir.

DAD-LC-MC ile MDÖ sonucu elde edilen kırmızı lahana özütlerindeki antosiyanin çeşitleri tespit edilmiştir. Kırmızı lahanalardaki ana antosiyaninler, siyanidin-3-O-diglukozit-5-O-glikozit çekirdeği bazında tanımlanmıştır; bunlar p-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitlerle açillenmemiş, mono-açillenmiş veya di-açillenmiştir. Etanol-su özütlerinde su özütlerinden farklı olarak siyanidin-3-o-glucosit pikine rastlanmıştır. Dolayısıyla ethanol-su özütlerinde baskın olarak 4 pik gözlenirken, su özütlerinde 3 pik gözlenmiştir. Siyanidin-3-glukozit-5-glucosit, siyanidin-3-(p-kumarol)-diglukozit-5-glukozid, siyanidin-3-(sinapol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(ferulol)(ferulol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(ferulol)(sinapol)-diglukozit-5-glukozit, siyanidin-3-(sinapol)(sinapol)-diglukozit-5-glukozit her iki çözücü tipinde de gözlemlenen antosiyaninler olmuştur.

Çalışmada MDÖ yöntemi ile konvansiyonel özütleme yöntem karşılaştırılması yapılmıştır. Daha kısa süre ve daha az çözücü kullanılarak gerçekleştirilen MDÖ yönteminde fenolik madde verimi yüksek çıkmış, fenolik madde özütlenmesi için uygun bir yöntem olduğu görülmüştür. Böylece MDÖ'nün daha çevreci, daha az maliyetli, gelişmiş bir özütleme yöntemi olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Clifford, M.N., Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 362–372, **1999**.
- [2] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 45, 287–306, **2005**.
- [3] Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L., Exon, J.H., A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 161–183, **2006**.
- [4] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., R  m  sy, C., Jimenez, L. Am. J. Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747, **2004**.
- [5] Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., Piskula, M.K., Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods, *Molecular Nutrition Food Research*, 53, S151–S183, **2009**.
- [6] Selma, M. V., Espin, J. C., Tomas-Barberan, F.J., Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6485–6501, **2009**.
- [7] M Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibanez, E., Extraction Techniques for the Determination of Phenolic Compounds in Food, *Institute of Food Science Research (CIAL-CSIC)*, Madrid, Spain, **2012**.
- [8] Saldamlı, İ., Acar, J., Gökmen, V., *Gıda Kimyası*, 6. Baskı, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, **2017**.
- [9] Bueno, J.M., Ramos-Escudero, F., Sáez-Plaza, P., Mu  noz, A.M., Navas, M.J., Asuero, A.G., Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42:2, 102-125, **2012**.
- [10] Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N., Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1024–1032, **2000**.

- [11] Clifford, M. N., Scalbert, A., Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118–1125, **2000**.
- [12] Adlercreutz, H., Mazur, W., Phyto-oestrogens and Western diseases, *Annals of Medicine*, 29, 95–120, **1997**.
- [13] Milder, I.E.J., Arts, I.C.W., Van de Putte, B., Venema, D.P., Hollman, P.C.H., Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol, *British Journal of Nutrition*, 93/3, 393-402, **2005**.
- [14] Crozier, A., Lean, M.E.J., McDonald, M.S., Black, C. Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 590–595, **1997**.
- [15] Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J., *Fruit Phenolics*, CRC Press: Boca Raton London New York Washington, D.C, **1990**.
- [16] Price, S.F., Breen, P.J., Valladao, M., Watson, B.T., Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot noir Grapes and Wine, *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 187–194, **1995**.
- [17] Feng, Y., McDonald, C.E., Vick, B.C., Glycosylflavones from Hard Red Spring Wheat Bran, *Cereal Chemistry*, 65, 452–456, **1988**.
- [18] Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N., Flavanones, chalcones and dihydrochalcones–nature, occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1073-1080, **2000**.
- [19] Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B., Engelhardt, U.H., Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2848–2852, **2000**.
- [20] Arts, I.C., Van De Putte, B., Hollman, P.C.J., Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands 2. Tea, wine, fruits juices, and chocolate milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1752–1757, **2000**.
- [21] Santos-Buelga, C., Scalbert, A., Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80:1094-1117, **2000**.
- [22] Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins, *Phytochemistry*, 64, 923–933, **2003**.
- [23] Andersen, O., Markham, K.R., *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*, First Edition, CRC Press, **2006**.

- [24] Rolle, L., Guidoni, S., Color And Anthocyanin Evaluation of Red Winegrapes By CIE L*, A*, B* Parameters, *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 41, 193–198, **2007**.
- [25] Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., Anthocyanins in cereals., *Journal of Chromatography A*, 1054, 129–141, **2004**.
- [26] Damar, İ., *Vişne Suyunun Antosiyanin Profili Ve Antioksidan Kapasitesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [27] María José Navas, M.J., Jiménez-Moreno, A.M., Julia Martín Bueno J.M.J., Sáez-Plaza, P., Asuero, A.G., Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part III: An Introduction to Sample Preparation and Extraction, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42:4, 284-312, **2012**.
- [28] Silva, E.M. Costa, C. Calhau, R.M. Morais, M.E. Pintado Anthocyanin extraction from plant tissues: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:14, 3072-3083, **2017**.
- [29] Yousuf, B., Gulb, K., Wani, A., Singh, P., Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2;56(13):2223-30, **2016**.
- [30] Bernstein, A., Noreña, C.P.Z., Encapsulation of Red Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *rubra*) Anthocyanins by Spray Drying using Different Encapsulating Agents, *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, Vol.58, n.6: pp. 944-952, **2015**.
- [31] Türkiye İstatistik Kurumu - İstatistik Tablolar ve Dinamik Sorgulama - Başka Yerde Sınıflandırılmamış Diğer Sebzeler, Kaynak Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001, (2017).
- [32] Wiczowski, W., Szawara-Nowak, D., Topolska, J., Red cabbage anthocyanins: Profile, isolation, identification, and antioxidant activity, *Food Research International*, Volume 51, Issue, 1303-309, **2013**.
- [33] Park, S., Arasu, M.V., Lee, M.K., Chun, J.H., Seo, J.M., Al-Dhabi, N.A., Kim, S.J., Analysis and metabolite profiling of glucosinolates, anthocyanins and free amino acids in inbred lines of green and red cabbage (*Brassica oleracea* L.), *Food Science and Technology*, 58:1, 203-213, **2014**.
- [34] Chandrasekhar, J., Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption, *Food And Bioproducts Processing*, 90, 615–623, **2012**.

- [35] Routray, W., Orsat, V., Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review, *Food Bioprocess Technology*, 5:409–424, **2012**.
- [36] Stalikas, C.D., Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295, **2007**.
- [37] Søltoft, M., Christensen, J.H., Nielsen, J., Knuthsen, P., Pressurised liquid extraction of flavonoids in onions. Method development and validation, *Talanta*, 80(1), 269–278, **2009**.
- [38] Kalia, K., Sharma, K., Singh, H.P., Singh, B., Effect of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10129–10134, **2008**.
- [39] Özdoğan, K., *Geleneksel Ve Ultrasonik Yöntemlerle Kırmızı Lahana Antosiyaninlerinin Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tokat, **2015**.
- [40] Qian, Z. M., Lu, J., Gao, Q. P., Li, S. P., Rapid method for simultaneous determination of flavonoid, saponins and polyacetylenes in *Folium ginseng* and *Radix ginseng* by pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216(18), 3825–3830, **2009**.
- [41] Rao, M.A., Rizvi, S.S.H., Datta, A.K., Engineering properties of Foods, 4th edition, CRC Press, **2014**.
- [42] Zhongdong, L., Guohua, W., Yunchang, G., Kennedy, J. F., Image study of pectin extraction from orange skin assisted by microwave, *Carbohydrate Polymers*, 64(4), 548–552, **2006**.
- [43] Roberts, J.S., Gerard, K.A., Development and evaluation of microwave heating of apple mash as a pretreatment to pressing, *Journal of Food Process Engineering*, 27(1), 29–46, **2004**.
- [44] Sanchez-Prado L., Lamas J.P., Lores M., Garcia-Jares C., Llompарт M., Simultaneous in-cell derivatization pressurized liquid extraction for the determination of multiclass preservatives in leave-on cosmetics, *Analytical Chemistry*, 15;82(22):9384-92, **2010**.
- [45] Zhang, F., Yang, Y., Su, P., Guo, Z., Microwave assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb, *Phytochemical Analysis*, 20(1), 33–37, **2009**.

- [46] Du, F.Y., Xiao, X.H., Luo, X.J. Li, G.K., Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants, *Talanta*, 78(3), 1177–1184, **2009**.
- [47] Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C.G., Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 1140(1–2), 29–34, **2007**.
- [48] Xiao, W., Han, L., Shi, B., Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix astragali*, *Separation and Purification Technology*, 62(3), 614–618, **2008**.
- [49] Nkhili, E.; Tomao, V.; El Hajji, H.; El Boustani, E. S.; Chemat, F.; Dangles, O. Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols, *Phytochemical Analysis*, 20, 408–415, **2009**.
- [50] Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., ÓKeefe, S., Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins, *Food Chemistry*, 120, 1185–1192, **2010**.
- [51] Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., Xia, W., Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*, *Separation and Purification Technology*, 70, 63–70, **2009**.
- [52] Yang, Z., Zhai, W., Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC-MS, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 470–476, **2010**.
- [53] Liazid, A., Guerrero, R.F., Cantos, E., Palma, M., Barroso, C.G., Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skin, *Food Chemistry*, 3, 1238–1243, **2011**.
- [54] Zou, T., Wang, D., Guo, H., Zhu, Y., Luo, X., Liu, F., Ling, W., Optimization of microwave assisted extraction of anthocyanins from mulberry and identification of anthocyanins in extract using HPLC-ESI-MS, *Journal of Food Science*, 77(1), 46–50, **2012**.
- [55] Ince, A.E., Sahin, S., Sumnu, S.G., Extraction of phenolic compounds from *Melissa* using microwave and ultrasound, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 69–75, **2013**.
- [56] Yang, Z., Zhai, W., Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 470–476, **2010**.
- [57] Garofulic, I.E., Dragovic-Uzelac, V., Jambrak, A.R., Jukic, M., The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from

sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca), *Journal of Food Engineering*, 117 437–442, **2013**.

[58] Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z., Liu, H., Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions, *Separation and Purification Technology*, 104, 17–25, **2013**.

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

[60] Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K., Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves, *Food Chemistry*, 166, 585–595, **2015**.

[61] İnce, A.E., *Usage Of Microwave And Ultrasound In The Extraction Of Essential Oils And Phenolic Compounds*, The Degree of Master of Science, Middle East Technical University, Ankara, **2011**.

[62] Simsek, M., Sumnu, G., Sahin, S., Microwave Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Sour Cherry Pomace, *Separation Science and Technology*, 47: 1248–1254, **2012**.

[63] Baş, D., Boyacı, İ.H., Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 8, 836–845, **2007**.

[64] Eren, İ., *Patateslerin Osmotik Dehidrasyonunun “Response Surface” Metodu Kullanılarak Optimizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2004**.

[65] Demirdöven, A., Karabıyıklı, Ş., Tokatlı, K., Öncül, N., Inhibitory effects of red cabbage and sour cherry pomace anthocyanin extracts on food borne pathogens and their antioxidant properties, *Food Science and Technology*, 63:1, 8-13, **2015**.

[66] Ravanfar, R., Tamaddon, A.M, Niakousari, M., Moein, M.R., Preservation of anthocyanins in solid lipid nanoparticles: Optimization of a microemulsion dilution method using the Plackett–Burman and Box– Behnken designs, *Food Chemistry*, 199, 573–580, **2016**.

[67] Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., Wang, Z., Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 767–778, **2007**.

[68] Damar, İ., *Vişne Suyunun Antosiyanin Profili Ve Antioksidan Kapasitesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.

- [69] Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., Characterization of Anthocyanins and Proanthocyanidins in Some Cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and Their Antioxidant Capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7846–7856, **2004**.
- [70] Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F 1.2.1-F 1.2.13, **2001**.
- [71] Xu, Z., Wu, J., Zhang, Y., Hu, X., Liao, X., Wang, Z., Extraction of anthocyanins from red cabbage using high pressure CO₂, *Bioresource Technology*, 101, 7151–7157, **2010**.
- [72] Doğan, Cömert, E., Gökmen, V., Antioxidants Bound to an Insoluble Food Matrix: Their Analysis, Regeneration Behavior and Physiological Importance, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, doi: 10.1111/1541-4337.12263, **2017**.
- [73] Doğan, E., *Increasing The Total Antioxidant Capacity Bound To Insoluble Dietary Fiber*, Master Of Science, Hacettepe University, Department of Food Engineering, Ankara, **2015**.
- [74] Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 30, No. 4, **2011**.
- [75] Bekdeşer, B., Bener, M., Önem, A.N., Apak, R., Toplam Antioksidan Kapasite Tayini için CUPRAC Yöntemi Uygulama Föyü, <file:///C:/Users/hp/Downloads/CUPRAC+Y%C3%B6ntemi+Uygulama+F%C3%B6y%C3%BC.pdf>.
- [76] Tufan, A.N., Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method, *Talanta*, 108, 136-142, 2013.
- [77] Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A., Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4), 401-9, **2010**.
- [78] Serpen, A., Gökmen, V., Fogliano, V., Total antioxidant capacities of raw and cooked meats, *Meat Science*, 90, 60–65, **2012**.
- [79] Demirdöven, A., Özdoğan, K., Erdoğan-Tokatlı, K., Extraction of anthocyanins from red cabbage by ultrasonic and conventional methods: optimization and evaluation, *Journal of Food Biochemistry*, ISSN 1745-4514, **2015**.
- [80] İnce, A.E., Şahin, S., Şümnü, S.G., Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound, *Turkey Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37: 69-75 c, doi:10.3906/tar-1201-1, **2013**.

- [81] Myers H.R., Montgomery, C.D., Anderson-Cook, C.M., *Response Surface Methodology: Process And Product Optimization Using Designed Experiments*, 4th Edition, **2016**.
- [82] He, B., Zhang, L.L., Yue, X.Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X.L., Yue, P.X., Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace, *Food Chemistry*, 204,70–76, **2016**.
- [83] Zou, T., Wang, D., Guo, H., Zhu, Y., Luo, X., Liu, F., Ling, W., Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Anthocyanins from Mulberry and Identification of Anthocyanins in Extract Using HPLC-ESI-MS, *Journal of Food Science*, Vol. 71, Nr. 1, **2012**.
- [84] Akdeniz. B., *Evaluation of different coating materials for encapsulation of phenolic compounds extracted from onion (Allium Cepa) skin*, Yüksek Lisans Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, **2017**.
- [85] Akdeniz, B., Şümnü, G., Şahin, S., Microencapsulation of phenolic compounds extracted from onion (*Allium cepa*) skin, *Journal of food Processing and Preservation*, DOI: 10.1111/jfpp.13648, **2018**.
- [86] Gil, M.I., Tomàs-Barberà, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48, 4581–9, **2000**.
- [87] Abderrahim, F., Huanatico, E., Segura, R., Arribas, S., Gonzalez, M.C., Condezo-Hoyos, L., Physical features, phenolic compounds, betalains and total antioxidant capacity of coloured quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Peruvian Altiplano, *Food Chemistry*, 183:83–90, **2015**.
- [88] Doğan-Cömert, E., Gökmen, V., Antioxidants Bound to an Insoluble Food Matrix: Their Analysis, Regeneration Behavior, and Physiological Importance, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol.16, **2016**.
- [89] Özyürek, M.K.E., Sözgen Başkan, K., Erçağ, E., Çelik, S.E., Baki, S., Yıldız, L., Karaman, Ş., Reşat Apak, R., A comprehensive review of CUPRAC methodology, *Analytica Lmethod*, 11, **2011**.
- [90] Gachovska, T., Cassada, D., Subbiah, J., Hanna, M., Thippareddi, H., Snow, D., Enhanced Anthocyanin Extraction from Red Cabbage Using Pulsed Electric Field Processing, *Journal of Food Science*, Vol. 75, Nr. 6, **2010**.

- [91] Sahat, N.S., Zaidal, D.N.A, Muhamad, I.I., Alam, M.N.H.Z., Stability Study of Water-in-Oil Emulsion Containing Anthocyanins from Red Cabbage, *Jurnal Teknologi*, 69[4], 158, **2014**.
- [92] Bernstein, A., Noreña, C.P.Z., Thermodynamic sorption of red cabbage extract (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *rubra*) encapsulated by spray drying, *Journal Food Science Technology*, 52(12):8180–8187, **2015**.
- [93] Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 4026–4037, **2004**.
- [94] Vajić, U.J., Mihailović, J.G., Zivković, J., Savikin, K., Godevac, D., Miloradović, Z., Bugarski, B., Stanojević, M.N., Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology, *Industrial Crops and Products*, 74, 912–917, **2015**.
- [95] Afoakwa A.N., Owusu, J., Adomako, C., Teye E., Microwave assisted extraction (MAE) of antioxidant constituents in plant materials, *Global Journal of Bio-Science&Biotechnology*, Vol.1 (2), 132-140, **2012**.
- [96] Safari, P., Rezaei, M., Shaviklo, A.R., The optimum conditions for the extraction of antioxidant compounds from the Persian gulf green algae (*Chaetomorpha* sp.) using response surface methodology, *Journal Food Science Technology*, 52(5):2974–2981, **2015**.
- [97] Mizgier, P., Kucharska, A.Z., Sokół-Łętowska, A., Kolniak-Ostek, J., Kidon, M., Fecka, I., Characterization of phenolic compounds and antioxidant and anti-inflammatory properties of red cabbage and purple carrot extracts, *Journal of Functional Foods*, 21, 133–146, **2016**.
- [98] Pliszka, B., Huszcza-Ciołkowska, G., Mieleszko, E., Czaplicki, S. Stability and antioxidative properties of acylated anthocyanins in three cultivars of red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *rubra*), *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1154–1158, **2009**.
- [99] Arapitsas, P., Sjöberg, P.J.R., Turner, C.H., Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry, *Food Chemistry*, 109, 219–226, **2008**.

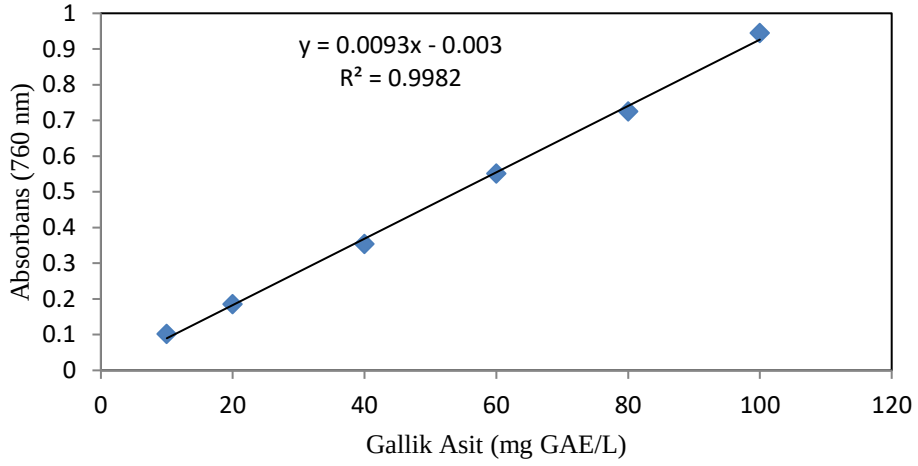
[100] Charron, C.S., Clevidence, B.A., Britz, S.J., Novotny, J.A., Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5354–5362, 2007.



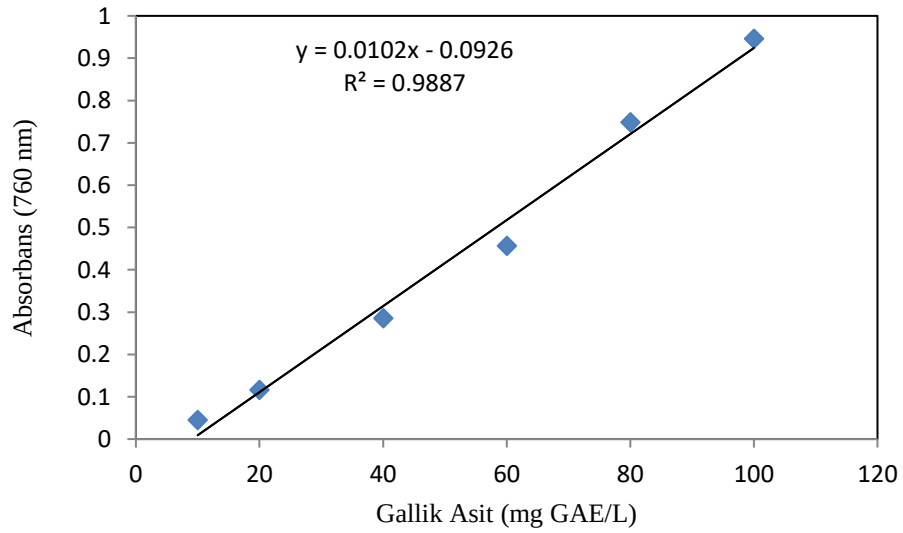
EKLER

EK A

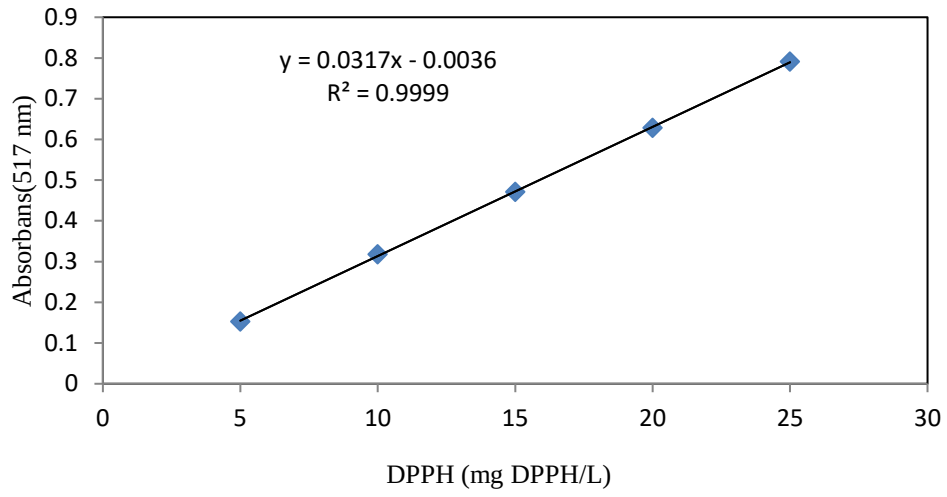
KALİBRASYON EĞRİLERİ



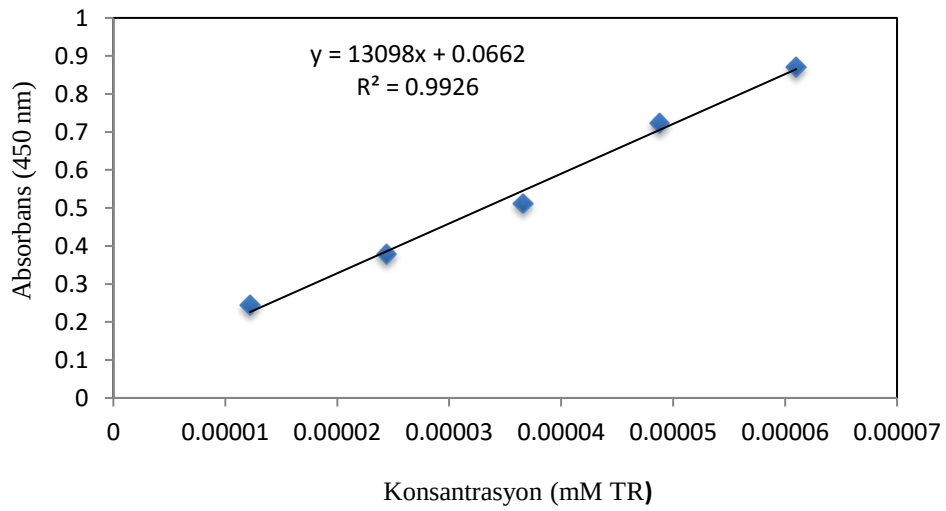
Şekil A.1 Toplam Fenolik madde miktarını hesaplamak için kullanılan %100 su ile çözülmüş gallik asit kalibrasyon eğrisi



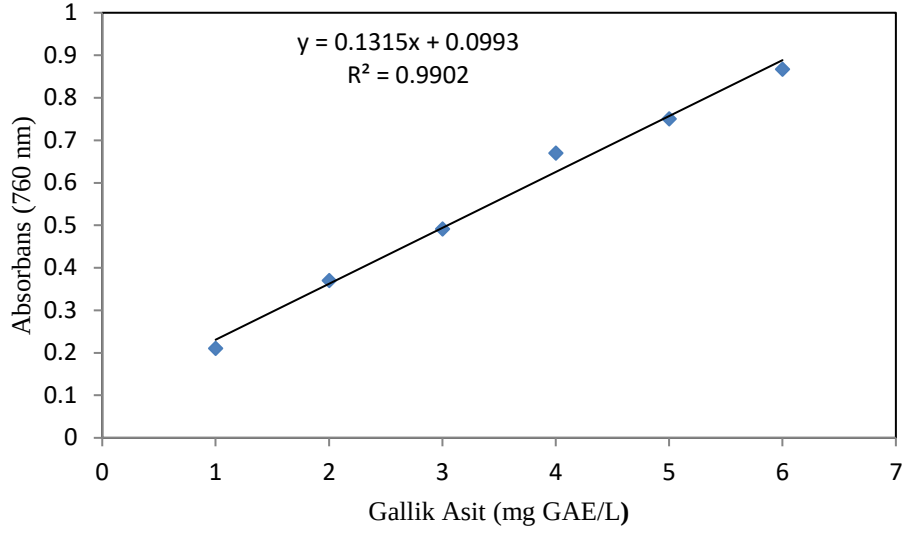
Şekil A.2 Toplam Fenolik madde miktarını hesaplamak için kullanılan etanol/su (1/1,v/v) karışımıyla çözülmüş gallik asit kalibrasyon eğrisi



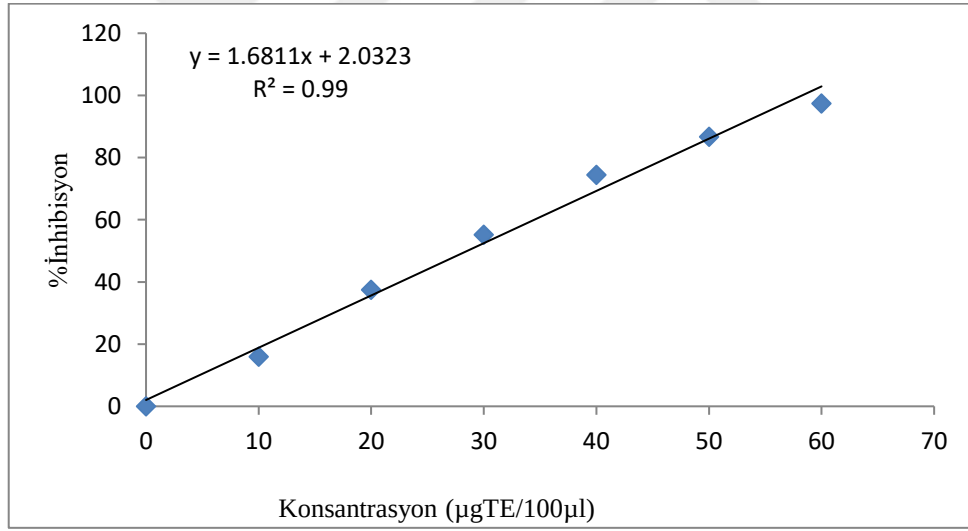
Şekil A.3 Toplam antioksidan kapasitesinin ölçümü için metanolde hazırlanmış DPPH kalibrasyon eğrisi



Şekil A.4 Toplam antioksidan kapasitesinin CUPRAC ve QUENCHER_{CUPRAC} yöntemleriyle ölçümü için hazırlanmış Trolox kalibrasyon eğrisi



Şekil A.5 QUENCHER yöntemiyle toplam fenolik madde miktarının ölçümü için hazırlanmış Gallik asit kalibrasyon eğrisi



Şekil A.6 QUENCHER-DPPH yöntemiyle toplam antioksidan kapasitesi ölçümü için hazırlanmış Trolox kalibrasyon eğrisi

EK B

EK B.1: Çözücü Etanol/su iken Konvansiyonel Yöntemle Özütlenen Kırmızı Lahana Özütlerindeki TMA'nın Sıcaklığa ve Süreye Göre Değişimleri

General Linear Model: TMA(mg siyanidin/L) versus T(°C); t(saat)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
T(°C)	1	27116,2	27116,2	22614,45	0,000
t(saat)	1	40,5	40,5	33,77	0,000
T(°C)*t(saat)	1	0,6	0,6	0,50	0,501
Error	8	9,6	1,2		
Total	11	27166,9			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,09502	99,96%	99,95%	99,92%

Comparisons for TMA(mg siyanidin/L)

Tukey Pairwise Comparisons: T(°C)*t(saat)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

T(°C)*t(saat)	N	Mean	Grouping
40 4	3	240,687	A
40 6	3	236,568	B
70 4	3	145,169	C
70 6	3	141,941	D

Means that do not share a letter are significantly different.

EK B.2: Çözücü Etanol/su iken Konvansiyonel Yöntemle Özütlenen Kırmızı Lahana Özütlerindeki TFM' nin Sıcaklığa ve Süreye Göre Değişimleri

General Linear Model: TFM(mg GAE/L) versus T(°C); t(saat)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
T(°C)	1	390963	390963	195481,50	0,000
t(saat)	1	38760	38760	19380,17	0,000
T(°C)*t(saat)	1	7008	7008	3504,17	0,000
Error	8	16	2		
Total	11	436748			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,41421	100,00%	99,99%	99,99%

Comparisons for TFM(mg GAE/L)

Tukey Pairwise Comparisons: T(°C)*t(saat)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

T(°C)*t(saat)	N	Mean	Grouping
40 4	3	1677,33	A
40 6	3	1515,33	B
70 4	3	1268,00	C
70 6	3	1202,67	D

Means that do not share a letter are significantly different.

EK B.3: Çözücü Etanol/su iken Konvansiyonel Yöntemle Özütlenen Kırmızı Lahana Özütlerindeki TAK_{DPPH} ' in Sıcaklığa ve Süreye Göre Değişimleri

General Linear Model: DPPH (mgDPPH/L) versus T(°C); t(saat)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
T(°C)	1	1464,99	1464,99	1672,79	0,000
t(saat)	1	0,21	0,21	0,24	0,634
T(°C)*t(saat)	1	197,65	197,65	225,69	0,000
Error	8	7,01	0,88		
Total	11	1669,86			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,935828	99,58%	99,42%	99,06%

Comparisons for DPPH (mgDPPH/L)

Tukey Pairwise Comparisons: T(°C)*t(saat)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

T(°C)*t(saat)	N	Mean	Grouping
40 4	3	66,3441	A
40 6	3	58,4946	B
70 6	3	44,5133	C
70 4	3	36,1290	D

Means that do not share a letter are significantly different.

EK B.4: Çözücü Etanol/su iken Konvansiyonel Yöntemle Özütlenen Kırmızı Lahana Özütlerindeki TAK_{CUPRAC}' ın Sıcaklığa ve Süreye Göre Değişimleri

General Linear Model: CUPRAC (mmol TE/L) versus T(°C); t(saat)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
T(°C)	1	79,0618	79,0618	13583,84	0,000
t(saat)	1	2,6104	2,6104	448,51	0,000
T(°C)*t(saat)	1	8,0098	8,0098	1376,18	0,000
Error	8	0,0466	0,0058		
Total	11	89,7286			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,0762908	99,95%	99,93%	99,88%

Comparisons for CUPRAC (mmol TE/L)

Tukey Pairwise Comparisons: T(°C)*t(saat)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

T(°C)*t(saat)	N	Mean	Grouping
40 4	3	16,7656	A
40 6	3	14,1988	B
70 6	3	10,6992	C
70 4	3	9,9980	D

Means that do not share a letter are significantly different.

EK B.5: Çözücü Su iken Konvansiyonel Yöntemle Özütlenen Kırmızı Lahana Özütlerindeki TAM' ın Sıcaklığa ve Süreye Göre Değişimleri

General Linear Model: TMA(mg siyanidin/L) versus T(°C); t(saat)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
T(°C)	1	22,32	22,32	8,57	0,019
t(saat)	1	2946,26	2946,26	1132,03	0,000
T(°C)*t(saat)	1	1975,40	1975,40	759,00	0,000
Error	8	20,82	2,60		
Total	11	4964,80			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,61327	99,58%	99,42%	99,06%

Comparisons for TMA(mg siyanidin/L)

Tukey Pairwise Comparisons: T(°C)*t(saat)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

T(°C)*t(saat)	N	Mean	Grouping
40 6	3	182,908	A
70 6	3	159,975	B
70 4	3	154,298	C
40 4	3	125,910	D

Means that do not share a letter are significantly different.

EK B.6: Çözücü Su iken Konvansiyonel Yöntemle Özütlenen Kırmızı Lahana Özütlerindeki TFM' nin Sıcaklığa ve Süreye Göre Değişimleri

General Linear Model: TFM(mg GAE/L) versus T(°C); t(saat)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
T(°C)	1	82960	82960,2	33570,84	0,000
t(saat)	1	181	181,4	73,42	0,000
T(°C)*t(saat)	1	58490	58489,8	23668,58	0,000
Error	8	20	2,5		
Total	11	141651			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,57200	99,99%	99,98%	99,97%

Comparisons for TFM(mg GAE/L)

Tukey Pairwise Comparisons: T(°C)*t(saat)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

T(°C)*t(saat)	N	Mean	Grouping
70 4	3	1324,44	A
70 6	3	1192,59	B
40 6	3	1165,93	C
40 4	3	1018,52	D

Means that do not share a letter are significantly different.

EK B.7: Çözücü Su iken Konvansiyonel Yöntemle Özütlenen Kırmızı Lahana Özütlerindeki TAK_{DPPH} ' in Sıcaklığa ve Süreye Göre Değişimleri

General Linear Model: DPPH (mgDPPH/L) versus T(°C); t(saat)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
T(°C)	1	83,21	83,21	6,17	0,038
t(saat)	1	419,61	419,61	31,14	0,001
T(°C)*t(saat)	1	274,95	274,95	20,40	0,002
Error	8	107,81	13,48		
Total	11	885,58			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
3,67101	87,83%	83,26%	72,61%

Comparisons for DPPH (mgDPPH/L)

Tukey Pairwise Comparisons: T(°C)*t(saat)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

T(°C)*t(saat)	N	Mean	Grouping
40 6	3	54,5167	A
70 6	3	50,2100	A
70 4	3	47,9567	A
40 4	3	33,1167	B

Means that do not share a letter are significantly different.

EK B.8: Çözücü Su iken Konvansiyonel Yöntemle Özütlenen Kırmızı Lahana Özütlerindeki TAK_{CUPRAC} ' ın Sıcaklığa ve Süreye Göre Değişimleri

General Linear Model: CUPRAC (mmol TE/L) versus $T(^{\circ}C)$; t(saat)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
$T(^{\circ}C)$	1	7,5561	7,55605	248,36	0,000
t(saat)	1	3,9592	3,95923	130,13	0,000
$T(^{\circ}C)*t(saat)$	1	3,9162	3,91620	128,72	0,000
Error	8	0,2434	0,03042		
Total	11	15,6749			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,174425	98,45%	97,86%	96,51%

Comparisons for CUPRAC (mmol TE/L)

Tukey Pairwise Comparisons: $T(^{\circ}C)*t(saat)$

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

$T(^{\circ}C)*t(saat)$	N	Mean	Grouping
70 6	3	11,6445	A
70 4	3	11,6383	A
40 6	3	11,2000	A
40 4	3	8,9087	B

Means that do not share a letter are significantly different.

EK C

EK C.1 Çözücünün eth/su (1/1, v/v) olduğu MDÖ ile elde edilen kırmızı lahana özütlerinin TMA,TFM, TAK analiz sonuçları

No	Süre(dk)	Çözücü oranı	Güç(W)	TMA (mg siyanidin/L)	TFM (mg GAE/L)	TAK _{CUPRAC} (mmolTE/L)	TAK _{DPPH} (mgDPPH/L)
1	5	20	400	169,99±0,333	969,80±1,961	17,22± 0,189	129,56±1,862
2	15	20	400	144,27±0,598	978,95±2,995	14,86±0,175	132,15±3,849
3	5	40	400	173,34 ±0,666	634,51±1,960	7,81±0,066	67,10±3,368
4	15	40	400	108,93 ± 0,82	656,73±4,934	7,68±0,131	60,75±0,985
5	5	30	200	139,15± 0,840	951,50 ±1,132	9,660±0,451	81,18±0,671
6	15	30	200	122,90±1,204	654,12 ±1,960	9,74±0,435	84,41±2,891
7	5	30	600	132,59± 1,670	827,32±4,081	9,55±0,327	81,40±5,144
8	15	30	400	138,66 ±0,577	708,37 ±1,132	10,06±0,630	80,65±0,645
9	10	20	200	216,86± 2,72	1106,41±2,995	12,75±0,975	130,75±2,744
10	10	40	200	143,11 ±0,152	837,12±1,132	6,82±0,508	70,32±1,163
11	10	20	600	220,01 ±0,696	1050,20 ±1,960	17,29±0,328	134,41± 2,997
12	10	40	600	124,90± 2,031	743,01±1,132	6,62± 0,346	77,74± 1,935
13	10	30	400	184,23 ±0,230	896,60±1,132	9,779± 0,272	91,40±5,000
14	10	30	400	184,98 ±1,166	818,82±1,960	8,68± 0,476	99,03± 5,069
15	10	30	400	184,48 ±0,169	823,40±4,082	9,51± 0,484	95,59± 0,493
16	10	30	400	183,77 ±0,485	867,84±1,961	9,21±0,611	108,06± 1,796
17	10	30	400	185,69± 2,33	888,10±1,132	8,126± 0,313	87,31±5,144

Sonuçlar üç tekrar üzerinden ortalama değer ve standart sapmaları ile verilmiştir.

EK C.2 Çözücünün %su olduğu MDÖ ile elde edilen kırmızı lahana özütlerinin TMA, TFM, TAK analiz sonuçları

No	Süre(dk)	Çözücü oranı	Güç(W)	TMA (mg siyanidin/L)	TFM (mg GAE/L)	TAK _{CUPRAC} (mmol TE/L)	TAK _{DPPH} (mg DPPH/L)
1	5	20	400	110,22± 1,670	2094,07±1,283	22,26±0,192	128,28±0,186
2	15	20	400	102,09± 6,070	2154,07±2,566	11,79±0,160	136,12±2,756
3	5	40	400	55,11 ± 4,184	651,11±1,849	4,36±0,403	32,47±0,493
4	15	40	400	80,04±0,386	986,67±3,849	8,75±0,239	60,32±2,756
5	5	30	200	110,21± 2,086	1258,52±1,283	12,34±0,380	81,40±2,607
6	15	30	200	76,15±1,767	1154,07±3,395	10,76±0,285	68,49±1,524
7	5	30	600	74,03±1,020	985,93±2,566	9,80±0,244	53,76±2,333
8	15	30	400	70,14±6,257	1115,56±5,879	10,89±0,430	79,28±2,705
9	10	20	200	122,68±3,428	1356,30±4,625	13,88±0,677	81,29±1,163
10	10	40	200	52,99±0,51	868,15±3,395	8,24±0,353	52,58±2,867
11	10	20	600	106,20±3,221	1422,96±3,395	14,14±0,575	94,95±2,781
12	10	40	600	61,900±2,041	808,89±2,222	7,79±0,315	47,74±2,678
13	10	30	400	75,70±1,839	868,89±5,879	9,87±0,533	66,67±1,133
14	10	30	400	70,80±1,00	1024,44±2,222	11,33±0,337	67,00±0,671
15	10	30	400	73,70±2,507	1064,44±2,222	9,53±0,548	63,01±0,492
16	10	30	400	65,35±1,543	1112,59±6,789	8,31±0,235	66,34±0,372
17	10	30	400	71,81±1,670	1119,26±3,395	10,27±0,146	59,78±0,671

Sonuçlar üç tekrar üzerinden ortalama değer ve standart sapmaları ile verilmiştir.

EK C.3 Çözücünün %100 Su Olduğu MDÖ İçin Kullanılan TMA İstatistiksel Verileri

Box-Behnken Dizaynı

Design Summary

Factors:	3	Replicates:	3
Base runs:	17	Total runs:	51
Base blocks:	1	Total blocks:	1
Center points:	15		

Response Surface Regression: TMA(mgsiyanidin/L) versus A; B; C

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	18882,3	2098,0	33,59	0,000
Linear	3	14797,8	4932,6	78,96	0,000
A	1	167,8	167,8	2,69	0,109
B	1	13701,4	13701,4	219,34	0,000
C	1	928,6	928,6	14,87	0,000
Square	3	2098,8	699,6	11,20	0,000
A*A	1	460,7	460,7	7,38	0,010
B*B	1	1104,6	1104,6	17,68	0,000
C*C	1	331,3	331,3	5,30	0,026
2-Way Interaction	3	1985,7	661,9	10,60	0,000
A*B	1	819,9	819,9	13,13	0,001
A*C	1	682,6	682,6	10,93	0,002
B*C	1	483,2	483,2	7,74	0,008
Error	41	2561,1	62,5		
Lack-of-Fit	3	2083,7	694,6	55,29	0,000
Pure Error	38	477,4	12,6		
Total	50	21443,4			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
7,90354	88,06%	85,43%	79,40%

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	71,47	2,04	35,02	0,000	
A	-2,64	1,61	-1,64	0,109	1,00
B	-23,89	1,61	-14,81	0,000	1,00
C	-6,22	1,61	-3,86	0,000	1,00
A*A	6,04	2,22	2,72	0,010	1,01
B*B	9,35	2,22	4,21	0,000	1,01
C*C	5,12	2,22	2,30	0,026	1,01
A*B	8,27	2,28	3,62	0,001	1,00
A*C	7,54	2,28	3,31	0,002	1,00
B*C	6,35	2,28	2,78	0,008	1,00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{TMA(mgsiyanidin/L)} = 71,47 - 2,64 A - 23,89 B - 6,22 C + 6,04 A*A + 9,35 B*B + 5,12 C*C \\ + 8,27 A*B + 7,54 A*C + 6,35 B*C$$

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	TMA(mgsiyanidin/L)	Fit	Resid	Std Resid	
25	65,13	81,31	-16,18	-2,36	R

R Large residual

EK C.4 Çözücünün %100 Su Olduğu MDÖ İçin Kullanılan TAK_{CUPRAC} İstatistiksel Verileri

Response Surface Regression: CUPRAC mmolTE/L versus A; B; C

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	622,250	69,139	46,88	0,000
Linear	3	418,249	139,416	94,54	0,000
A	1	15,060	15,060	10,21	0,003
B	1	400,682	400,682	271,71	0,000
C	1	2,507	2,507	1,70	0,200
Square	3	27,140	9,047	6,13	0,002
A*A	1	11,721	11,721	7,95	0,007
B*B	1	13,335	13,335	9,04	0,004
C*C	1	0,192	0,192	0,13	0,720
2-Way Interaction	3	176,862	58,954	39,98	0,000

A*B	1	171,120	171,120	116,04	0,000
A*C	1	5,360	5,360	3,63	0,064
B*C	1	0,382	0,382	0,26	0,613
Error	41	60,461	1,475		
Lack-of-Fit	3	40,924	13,641	26,53	0,000
Pure Error	38	19,537	0,514		
Total	50	682,711			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1,21435	91,14%	89,20%	85,74%

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	9,862	0,314	31,45	0,000	
A	-0,792	0,248	-3,20	0,003	1,00
B	-4,086	0,248	-16,48	0,000	1,00
C	-0,323	0,248	-1,30	0,200	1,00
A*A	0,963	0,342	2,82	0,007	1,01
B*B	1,027	0,342	3,01	0,004	1,01
C*C	0,123	0,342	0,36	0,720	1,01
A*B	3,776	0,351	10,77	0,000	1,00
A*C	0,668	0,351	1,91	0,064	1,00
B*C	-0,178	0,351	-0,51	0,613	1,00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{CUPRAC mmolTE/L} = 9,862 - 0,792 A - 4,086 B - 0,323 C + 0,963 A*A + 1,027 B*B + 0,123 C*C + 3,776 A*B + 0,668 A*C - 0,178 B*C$$

EK C.5 Çözücünün %100 Su Olduğu MDÖ İçin Kullanılan TAK_{DPPH} İstatistiksel Verileri

Response Surface Regression: DPPH ppm/L versus A; B; C

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	30041,8	3338,0	33,46	0,000
Linear	3	23883,0	7961,0	79,79	0,000
A	1	835,6	835,6	8,38	0,006
B	1	23016,0	23016,0	230,69	0,000
C	1	31,3	31,3	0,31	0,578
Square	3	4433,3	1477,8	14,81	0,000
A*A	1	2194,4	2194,4	22,00	0,000
B*B	1	1620,3	1620,3	16,24	0,000
C*C	1	625,1	625,1	6,27	0,016
2-Way Interaction	3	1725,5	575,2	5,77	0,002
A*B	1	333,1	333,1	3,34	0,075
A*C	1	1105,2	1105,2	11,08	0,002
B*C	1	287,2	287,2	2,88	0,097
Error	41	4090,5	99,8		
Lack-of-Fit	3	3706,5	1235,5	122,25	0,000
Pure Error	38	384,0	10,1		
Total	50	34132,3			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
9,98842	88,02%	85,39%	79,10%

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	64,58	2,58	25,04	0,000	
A	5,90	2,04	2,89	0,006	1,00
B	-30,97	2,04	-15,19	0,000	1,00
C	-1,14	2,04	-0,56	0,578	1,00
A*A	13,18	2,81	4,69	0,000	1,01
B*B	11,33	2,81	4,03	0,000	1,01
C*C	-7,03	2,81	-2,50	0,016	1,01
A*B	5,27	2,88	1,83	0,075	1,00
A*C	9,60	2,88	3,33	0,002	1,00
B*C	-4,89	2,88	-1,70	0,097	1,00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{DPPH ppm/L} = 64,58 + 5,90 A - 30,97 B - 1,14 C + 13,18 A*A + 11,33 B*B - 7,03 C*C + 5,27 A*B + 9,60 A*C - 4,89 B*C$$

EK C.6 Çözücünün %100 Su Olduğu MDÖ İçin Kullanılan TFM İstatistiksel Verileri

Response Surface Regression: TFMmg GAE/L versus A; B; C

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	7054581	783842	25,96	0,000
Linear	3	5451244	1817081	60,19	0,000
A	1	85602	85602	2,84	0,100
B	1	5330885	5330885	176,58	0,000
C	1	34757	34757	1,15	0,290
Square	3	1514398	504799	16,72	0,000
A*A	1	677930	677930	22,46	0,000
B*B	1	597044	597044	19,78	0,000
C*C	1	248234	248234	8,22	0,007
2-Way Interaction	3	88939	29646	0,98	0,411
A*B	1	35813	35813	1,19	0,282
A*C	1	41093	41093	1,36	0,250
B*C	1	12033	12033	0,40	0,531
Error	41	1237773	30190		
Lack-of-Fit	3	1027660	342553	61,95	0,000
Pure Error	38	210114	5529		
Total	50	8292354			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
173,752	85,07%	81,80%	74,44%

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	1037,0	44,9	23,12	0,000	
A	59,7	35,5	1,68	0,100	1,00

B	-471,3	35,5	-13,29	0,000	1,00
C	-38,1	35,5	-1,07	0,290	1,00
A*A	231,7	48,9	4,74	0,000	1,01
B*B	217,4	48,9	4,45	0,000	1,01
C*C	-140,2	48,9	-2,87	0,007	1,01
A*B	54,6	50,2	1,09	0,282	1,00
A*C	58,5	50,2	1,17	0,250	1,00
B*C	-31,7	50,2	-0,63	0,531	1,00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{TFMmg GAE/L} = 1037,0 + 59,7 A - 471,3 B - 38,1 C + 231,7 A*A + 217,4 B*B - 140,2 C*C + 54,6 A*B + 58,5 A*C - 31,7 B*C$$

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	TFMmg GAE/L	Fit	Resid	Std Resid
36	2382,2	1962,5	419,7	2,79

R Large residual

EK C.7 Çözücünün %100 Su Olduğu MDÖ İçin Kullanılan TMA, TFM, TAK Yüzey Optimizasyonları

Response Optimization: TFmg GAE/L; DPPH ppm/L; ... (mgsiyanidin/L)

Parameters

Response	Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Importance
TFmg GAE/L	Maximum	646,667	2382,22		1	1
DPPH ppm/L	Maximum	31,935	136,13		1	1
CUPRAC mmolTE/L	Maximum	4,094	22,43		1	1
TA(mgsiyanidin/L)	Maximum	51,099	125,58		1	1

Solution

Solution				CUPRAC			
	A	B	C	TFmg GAE/L	DPPH ppm/L	mmolTE/L	TA(mgsiyanidin/L)
				Fit	Fit	Fit	Fit
1	-1	-1	-0,454545	1952,85	120,626	20,9017	131,863

	Composite
Solution	Desirability
1	0,875447

Multiple Response Prediction

Variable	Setting
A	-1
B	-1
C	-0,454545

Response	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
TFmg GAE/L	1952,9	91,8	(1767,4; 2138,3)	(1556,0; 2349,7)
DPPH ppm/L	120,63	5,28	(109,97; 131,29)	(97,81; 143,44)
CUPRAC mmolTE/L	20,902	0,642	(19,606; 22,198)	(18,128; 23,675)
TA(mgsiyanidin/L)	131,86	4,18	(123,43; 140,30)	(113,81; 149,92)

EK C.8 Çözücünün etanol/ su (1/1, v/v) olduğu MDÖ İçin Kullanılan TMA İstatistiksel Verileri

Box-Behnken Dizaynı

Design Summary

Factors:	3	Replicates:	3
Base runs:	17	Total runs:	51
Base blocks:	1	Total blocks:	1
Center points:	15		

Response Surface Regression: TMA(mgsiyanidin/L) versus A; B; C

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	43450,8	4827,9	18,49	0,000
Linear	3	18767,2	6255,7	23,96	0,000
A	1	3733,2	3733,2	14,30	0,000
B	1	15020,4	15020,4	57,52	0,000
C	1	13,6	13,6	0,05	0,821
Square	3	22736,2	7578,7	29,02	0,000
A*A	1	20112,5	20112,5	77,02	0,000
B*B	1	123,3	123,3	0,47	0,496

C*C	1	1908,0	1908,0	7,31	0,010
2-Way Interaction	3	1947,4	649,1	2,49	0,074
A*B	1	1203,7	1203,7	4,61	0,038
A*C	1	379,3	379,3	1,45	0,235
B*C	1	364,4	364,4	1,40	0,244
Error	41	10705,9	261,1		
Lack-of-Fit	3	9647,4	3215,8	115,45	0,000
Pure Error	38	1058,4	27,9		
Total	50	54156,6			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
16,1592	80,23%	75,89%	65,46%

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	185,56	4,17	44,47	0,000	
A	-12,47	3,30	-3,78	0,000	1,00
B	-25,02	3,30	-7,58	0,000	1,00
C	-0,75	3,30	-0,23	0,821	1,00
A*A	-39,90	4,55	-8,78	0,000	1,01
B*B	3,12	4,55	0,69	0,496	1,01
C*C	-12,29	4,55	-2,70	0,010	1,01
A*B	-10,02	4,66	-2,15	0,038	1,00
A*C	5,62	4,66	1,21	0,235	1,00
B*C	-5,51	4,66	-1,18	0,244	1,00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{TMA(mgsiyanidin/L)} = 185,56 - 12,47 A - 25,02 B - 0,75 C - 39,90 A*A + 3,12 B*B - 12,29 C*C \\ - 10,02 A*B + 5,62 A*C - 5,51 B*C$$

EK C.9 Çözücünün eyanol/ su (1/1, v/v) olduğu MDÖ İçin Kullanılan TAK_{CUPRAC} İstatistiksel Verileri

Response Surface Regression: CUPRAC mmolTE/L versus A; B; C

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	512,127	56,903	137,77	0,000
Linear	3	430,975	143,658	347,83	0,000
A	1	1,855	1,855	4,49	0,040
B	1	421,352	421,352	1020,18	0,000
C	1	7,768	7,768	18,81	0,000
Square	3	62,421	20,807	50,38	0,000
A*A	1	7,342	7,342	17,78	0,000
B*B	1	52,826	52,826	127,90	0,000
C*C	1	0,407	0,407	0,98	0,327
2-Way Interaction	3	18,731	6,244	15,12	0,000
A*B	1	3,725	3,725	9,02	0,005
A*C	1	0,446	0,446	1,08	0,305
B*C	1	14,559	14,559	35,25	0,000
Error	41	16,934	0,413		
Lack-of-Fit	3	7,334	2,445	9,68	0,000
Pure Error	38	9,600	0,253		
Total	50	529,061			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0,642665	96,80%	96,10%	95,08%

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	9,084	0,166	54,75	0,000	
A	-0,278	0,131	-2,12	0,040	1,00
B	-4,190	0,131	-31,94	0,000	1,00
C	0,569	0,131	4,34	0,000	1,00
A*A	0,762	0,181	4,22	0,000	1,01
B*B	2,045	0,181	11,31	0,000	1,01
C*C	-0,179	0,181	-0,99	0,327	1,01
A*B	0,557	0,186	3,00	0,005	1,00
A*C	0,193	0,186	1,04	0,305	1,00
B*C	-1,101	0,186	-5,94	0,000	1,00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{CUPRAC mmolTE/L} = 9,084 - 0,278 A - 4,190 B + 0,569 C + 0,762 A*A + 2,045 B*B - 0,179 C*C \\ + 0,557 A*B + 0,193 A*C - 1,101 B*C$$

EK C.10 Çözücünün etanol/ su (1/1, v/v) olduğu MDÖ İçin Kullanılan TFM İstatistiksel Verileri

Response Surface Regression: TFmg GAE/L versus A; B; C

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	978263	108696	39,65	0,000
Linear	3	727347	242449	88,44	0,000
A	1	55198	55198	20,13	0,000
B	1	666667	666667	243,18	0,000
C	1	5483	5483	2,00	0,165
Square	3	212833	70944	25,88	0,000
A*A	1	156588	156588	57,12	0,000
B*B	1	49110	49110	17,91	0,000
C*C	1	18246	18246	6,66	0,014
2-Way Interaction	3	38083	12694	4,63	0,007
A*B	1	116	116	0,04	0,838
A*C	1	23704	23704	8,65	0,005
B*C	1	14264	14264	5,20	0,028
Error	41	112399	2741		
Lack-of-Fit	3	75466	25155	25,88	0,000
Pure Error	38	36933	972		
Total	50	1090662			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
52,3586	89,69%	87,43%	82,74%

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	858,8	13,5	63,53	0,000	
A	-48,0	10,7	-4,49	0,000	1,00

B	-166,7	10,7	-15,59	0,000	1,00
C	-15,1	10,7	-1,41	0,165	1,00
A*A	-111,3	14,7	-7,56	0,000	1,01
B*B	62,4	14,7	4,23	0,000	1,01
C*C	38,0	14,7	2,58	0,014	1,01
A*B	3,1	15,1	0,21	0,838	1,00
A*C	44,4	15,1	2,94	0,005	1,00
B*C	-34,5	15,1	-2,28	0,028	1,00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{TFmg GAE/L} = 858,8 - 48,0 A - 166,7 B - 15,1 C - 111,3 A*A + 62,4 B*B + 38,0 C*C + 3,1 A*B + 44,4 A*C - 34,5 B*C$$

Fits and Diagnostics for Unusual Observations

Obs	TFmg GAE/L	Fit	Resid	Std	Resid
45	1256,1	1145,2	110,9	2,45	R

R Large residual

EK C.11 Çözücünün etanol/ su (1/1, v/v) olduğu MDÖ İçin Kullanılan TAK_{DPPH} İstatistiksel Verileri

Response Surface Regression: DPPH ppm/L versus A; B; C

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	26803,7	2978,2	79,48	0,000
Linear	3	23661,0	7887,0	210,50	0,000
A	1	0,8	0,8	0,02	0,881
B	1	23639,5	23639,5	630,92	0,000
C	1	20,6	20,6	0,55	0,462
Square	3	3048,6	1016,2	27,12	0,000
A*A	1	1556,5	1556,5	41,54	0,000
B*B	1	1318,5	1318,5	35,19	0,000
C*C	1	308,8	308,8	8,24	0,006
2-Way Interaction	3	94,0	31,3	0,84	0,482
A*B	1	73,4	73,4	1,96	0,169
A*C	1	10,0	10,0	0,27	0,608

B*C	1	10,6	10,6	0,28	0,597
Error	41	1536,2	37,5		
Lack-of-Fit	3	202,8	67,6	1,93	0,142
Pure Error	38	1333,4	35,1		
Total	50	28339,9			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
6,12116	94,58%	93,39%	92,11%

Coded Coefficients

Term	Coef	SE Coef	T-Value	P-Value	VIF
Constant	98,03	1,58	62,03	0,000	
A	-0,19	1,25	-0,15	0,881	1,00
B	-31,38	1,25	-25,12	0,000	1,00
C	0,93	1,25	0,74	0,462	1,00
A*A	-11,10	1,72	-6,45	0,000	1,01
B*B	10,22	1,72	5,93	0,000	1,01
C*C	-4,94	1,72	-2,87	0,006	1,01
A*B	-2,47	1,77	-1,40	0,169	1,00
A*C	-0,91	1,77	-0,52	0,608	1,00
B*C	0,94	1,77	0,53	0,597	1,00

Regression Equation in Uncoded Units

$$\text{DPPH ppm/L} = 98,03 - 0,19 A - 31,38 B + 0,93 C - 11,10 A*A + 10,22 B*B - 4,94 C*C - 2,47 A*B - 0,91 A*C + 0,94 B*C$$

EK C.12 Çözücünün etanol/ su (1/1, v/v) olduğu MDÖ İçin TMA, TFM, TAK yüzey optimizasyonları

Response Optimization: DPPH ppm/L; TFmg GAE/L;
... (mg siyanidin/L)

Parameters

Response	Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Importance
DPPH ppm/L	Maximum	53,226	136,45		1	1
TFmg GAE/L	Maximum	630,588	1256,08		1	1
CUPRAC mmolTE/L	Maximum	6,217	17,56		1	1
TA(mgsiyanidin/L)	Maximum	101,529	232,45		1	1

Solution

				CUPRAC			
				DPPH ppm/L	TFmg GAE/L	mmolTE/L	TA(mgsiyanidin/L)
Solution	A	B	C	Fit	Fit	Fit	Fit
1	-0,0303030	-1	0,979798	134,823	1143,43	16,8041	206,438

Composite

Solution	Desirability
1	0,880548

Multiple Response Prediction

Variable	Setting
A	-0,0303
B	-1
C	0,979798

Response	Fit	SE Fit	95% CI	95% PI
DPPH ppm/L	134,82	3,01	(128,74; 140,90)	(121,05; 148,60)
TFmg GAE/L	1143,4	25,8	(1091,4; 1195,4)	(1025,6; 1261,3)
CUPRAC mmolTE/L	16,804	0,316	(16,166; 17,442)	(15,358; 18,250)
TA(mgsiyanidin/L)	206,44	7,95	(190,39; 222,49)	(170,07; 242,81)

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri:

Adı Soyadı : Ünzile YİĞİT
Doğum Yeri : İspir/ERZURUM
Doğum Yılı : 1989
Medeni Hali : Bekar
E-posta : unzileyigit@hotmail.com

Eğitim:

Lisans :2009-2014 Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
Yüksek Lisans : 2015- Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : 2017- Mühendis, Şile İlçe Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, İstanbul

Deneyim Alanları : -

Projeler : Kırmızı Lahana Antosiyaninlerinin Mikrodalga ve Konvansiyonel Yöntemler ile Özütlenmesi ve Antosiyanin Özütlerinin Enkapsülasyonu, Hacettepe üniversitesi BAP- Kapsamli Araştırma-FBA-2017-12587, (Araştırmacı).

Tezden Üretilmiş Yayınlar : -

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar : -



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih:24/09/2018

Tez Başlığı / Konusu: KIRMIZI LAHANA ANTOSİYANİNLERİNİN MİKRODALGA VE KONVANSİYONEL YÖNTEMLER İLE ÖZÜTLENMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 79 sayfalık kısmına ilişkin, 21/09/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dağılı
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

24.09.2018
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: ÜNZİLE YİĞİT
Öğrenci No: N14327796
Anabilim Dalı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ
Programı: GIDA MÜHENDİSLİĞİ
Statüsü: ☒ Y.Lisans ☐ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Dr. Elif YOLAĞANER

(Unvan, Ad Soyad, İmza)