T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISPANAK KÖKÜNDE ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN KAZANIMI VE SÜRECİN YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU

HANDE ÖZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İREM DAMAR

EDİRNE-2022

HANDE ÖZCAN'ın hazırladığı "**ISPANAK KÖKÜNDE ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE BİYOAKTİF BİLEŞENLERİN KAZANIMI VE SÜRECİN YANIT YÜZEY YÖNTEMİ İLE OPTİMİZASYONU**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından **Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında** bir **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri :	İmza
Dr. Öğr. Üyesi İrem DAMAR	……
Dr. Öğr. Üyesi Emel YILMAZ	……
Dr. Öğr. Üyesi Buket AŞKIN	……

Tez Savunma Tarihi: 23/09/2022

Bu tezin **Yüksek Lisans tezi** olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

	İmza
Dr. Öğr. Üyesi İrem DAMAR Tez Danışmanı	……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

……
Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

23 / 09 / 2022

Hande ÖZCAN

Yüksek Lisans Tezi

Ispanak Kökünde Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Biyoaktif Bileşenlerin Kazanımı ve Sürecin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada gıda endüstrisinde ve evlerde ıspanağın temizlenmesiyle açığa çıkan değerli bir atık olan ıspanak kökünden geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak yeşil ve yenilikçi yöntemler arasında özellikle uygulama süresinin kısa olması nedeniyle dikkat çeken ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle biyoaktif bileşenlerin kazanılması hedeflenmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyon prob tipi ultrasonik homojenizatör ile gerçekleştirilmiş ve yöntemde ekstraksiyon değişkenleri genlik (%25-55), sıcaklık (10-30 °C), süre (3-5 dk) ve etanol konsantrasyonu (%20-60) olarak belirlenmiştir. Optimizasyon sürecinde ekstraksiyon değişkenlerinin ıspanak kökünün toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Süreç, yanıt yüzey yöntemi ve merkezi kompozit tasarım kullanılarak 30 farklı deneme koşulu içeren bir deney tasarımı olacak şekilde tasarlanmış ve bu koşullar için optimize edilmiştir. Ispanak kökünde maksimum miktarda fenolik bileşiğin (5579,51 mg GAE/kg LF), flavonoid maddenin (1824,34 mg KE/kg LF) ve antioksidan aktivitenin (20,79 mmol TE/kg LF) elde edildiği ekstraksiyon koşulları %55 genlik, %20 etanol konsantrasyonu, 10 °C sıcaklık ve 3 dk ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulunda elde edilen ıspanak kökü ekstraktının toplam fenolik madde miktarının %31,55 oranında ve toplam flavonoid madde miktarının %66,80 oranında arttığı, antioksidan aktivitesinin ise %11,15 oranında azaldığı tespit edilmiştir.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 136

Anahtar Kelimeler : Ispanak kökü, biyoaktif bileşenler, ultrason destekli ekstraksiyon, yanıt yüzey yöntemi, optimizasyon

Master Thesis

Recovery of Bioactive Ingredients by Ultrasound Aid Extraction Method in Spinach Root and Optimization of The Process by Response Surface Method

Trakya University Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

ABSTRACT

In this study, it was aimed to obtain bioactive components from spinach root, which is a valuable waste released by cleaning spinach in the food industry and homes, by ultrasound-assisted extraction method, which is among the green and innovative methods as an alternative to traditional extraction methods and attracts attention especially due to the short application time. Ultrasound assisted extraction was performed with probe type ultrasonic homogenizer and extraction variables were determined as amplitude (25-55%), temperature (10-30 °C), time (3-5 min) and ethanol concentration (20-60%) in the method. The effects of extraction variables on the total phenolic substance amount, total flavonoid substance amount and antioxidant activity of spinach root were investigated in the optimization process. The process was designed to be an experimental design with 30 different experimental conditions using the response surface method and a central composite design and optimized for these conditions. Extraction conditions in which the maximum amount of phenolic compounds (5579.51 mg GAE/kg LF), flavonoid substance (1824.34 mg KE/kg LF) and antioxidant activity (20.79 mmol TE/kg LF) were extracted from the spinach root, were determined as 55% amplitude, 20% ethanol concentration, 10 °C temperature and 3 min extraction time. It was found that the total amount of phenolic substance and the total amount of flavonoid substance of spinach root extract obtained under optimal extraction conditions increased by 31.55% and 66.80% respectively, while the antioxidant activity decreased by 11.15%.

Year : 2022

Number of Pages : 136

Keywords : Spinach root, bioactive components, ultrasound-assisted extraction, response surface method, optimization

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın tüm aşamalarında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak yol gösteren, sonsuz hoşgörüyle yardım ve desteğini esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi İrem DAMAR'a,

Tez çalışmam boyunca değerli fikir ve önerileriyle katkıda bulunan, zamanını bana ayırarak yardımını esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Emel YILMAZ'a,

2021/102 No'lu proje kapsamında maddi desteklerinden dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TÜBAP)'a,

Tez çalışmam boyunca benden sevgisini, sabrını ve desteğini esirgemeyen çok değerli eşim Fatih ÖZCAN'a, koşulsuz sevgi, fedakarlık ve anlayışla yanımda olan başta kıymetli annem Zehra KAYMAL olmak üzere sevgili aileme, sevgi ve destekleriyle bana güç veren değerli ailem ÖZCAN ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Hande ÖZCAN

Edirne - 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

SİMGELER DİZİNİ ..... **xii**

KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiv**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xviii**

1. GİRİŞ **1**

2. LİTERATÜR ÖZETİ **5**

2.1. Ispanak 5

2.2. Ispanakta Bulunan Fonksiyonel Bileşenler 9

2.3. Ekstraksiyon Yöntemleri 12

2.3.1. Geleneksel Ekstraksiyon Yöntemleri 13

2.3.2. Yenilikçi Ekstraksiyon Yöntemleri 15

2.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyon 17

2.4.1. Ultrasonun Etki Mekanizması 17

2.4.2. Ultrasonun Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları 24

2.4.3. Gıdalarda Bulunan Biyoaktif Bileşenlerin Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi İle Geri Kazanımı 25

2.5. Optimizasyon 28

2.5.1. Yanıt Yüzey Yöntemi 28

2.5.1.1. Merkezi Kompozit Tasarım 30

2.5.2. Model Oluşturma ve Modelin Değerlendirilmesi 34
2.5.3. Optimizasyonun Yapılması ve Değerlendirilmesi 38
3. MATERYAL VE YÖNTEM 40
3.1. Materyal 40
3.1.1. Ispanak 40
3.1.2. Ispanak Kökü 40
3.1.3. Örneğin Hazırlanması 41
3.1.4. Kullanılan Kimyasallar 42
3.2. Yöntem 42
3.2.1. Karakterizasyon Analizleri 42
3.2.1.1. pH Analizi 42
3.2.1.2. Suda Çözünür Kuru Madde Analizi 42
3.2.1.3. Toplam Kuru Madde Analizi 42
3.2.1.4. Toplam Kül Analizi 43
3.2.1.5. ICP-MS ile Mineral Kompozisyonu Analizi 43
3.2.1.6. Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS ile Belirlenmesi 43
3.2.1.7. Toplam Fenolik Madde Analizi 45
3.2.1.8. Toplam Flavonoid Madde Analizi 46
3.2.1.9. Antioksidan Aktivite Analizi 47
3.2.2. Ultrason Destekli Ekstraksiyon 48
3.2.3. Optimizasyon Analizi 49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 53
4.1. Karakterizasyon Analizleri 53
4.2. Merkezi Kompozit Tasarım ile Ekstraksiyon Sürecinin Analizi 57
4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Yanıtının Optimizasyon Süreci 60
4.3.1. Model seçimi 60

4.3.2. Modelin ANOVA ile İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 61
4.3.3. Faktörlerin İkili Etkileşimlerinin Toplam Fenolik Madde Yanıt Değişkenine Etkilerini Gösteren Grafiklerin İncelenmesi 65
4.4. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Yanıtının Optimizasyon Süreci 72
4.4.1. Model Seçimi 72
4.4.2. Modelin ANOVA ile İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 73
4.4.3. Faktörlerin İkili Etkileşimlerinin Toplam Flavonoid Madde Miktarı Yanıt Değişkenine Etkilerini Gösteren Grafiklerin İncelenmesi 77
4.5. Antioksidan Aktivite Yanıtının Optimizasyon Süreci 82
4.5.1. Model Seçimi 82
4.5.2. Modelin ANOVA ile İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi 83
4.5.3. Faktörlerin İkili Etkileşimlerinin Antioksidan Aktivite Yanıt Değişkenine Etkilerini Gösteren Grafiklerin İncelenmesi 88
4.6. Sürecin Optimizasyonu 94
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 104
KAYNAKLAR 107
ÖZGEÇMİŞ 117

SİMGELER DİZİNİ

β_0	Sabit terim
β_1	Regresyon modeli katsayıları
ε	Deneysel hata terimi
$AlCl_3.6H_2O$	Alüminyum klorür hidrat
e(i)	İ noktası için tahmin hatası
$^{\cdot}OH$	Hidroksil radikali
H	Hidrojen
H_2O	Su
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HNO_3	Nitrik asit
k	Bağımsız değişken sayısı
$K_2S_2O_8$	Potasyum persülfat
n_0	Merkezde tekrarlanacak deney sayısı
$NaNO_2$	Sodyum nitrit
NaOH	Sodyum hidroksit
R^2	Determinasyon katsayısı
X_1	Bağımsız değişken
X_k	Doğrusal etki
X_kX_k	Etkileşim etkisi
X_k^2	Karesel etki
Y	Tahmin edilen cevap (yanıt)
y(i)	İ noktası için gözlemlenen değer
ŷ(i)	İ noktası için tahmin edilen değer

KISALTMALAR DİZİNİ

AB	Avrupa Birliği
ABTS	2,2’-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
ANOVA	Varyans analizi
BBD	Box-Behnken Tasarımı
BWP	Yabanmersini Şarap Posası
CCD	Merkezi Kompozit Tasarım
CV	Varyasyon katsayısı
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EDE	Enzim Destekli Ekstraksiyon
FFD	Fraksiyonel Faktöriyel Tasarım
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Hz	Hertz
ICP-MS	İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometrisi
KE	Kateşin Eşdeğeri
kHz	Kilohertz
LC-MS/MS	Kütle Spektrometreli Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LF	Liyofilize Örnek
MHz	Megahertz
PRESS	Tahmin edilen artık hata karelerinin toplamı
RSM	Yanıt Yüzey Yöntemi
TE	Trolox Eşdeğeri
TROLOX	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UDE	Ultrason Destekli Ekstaksiyon
UV	Ultraviole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması 9
Şekil 2.2. Ses dalgası tipleri 18
Şekil 2.3. Kativasyon kabarcıklarının oluşumu ve çökmesi 19
Şekil 2.4. Parçacıklara çarpan jetlerin mekanik etkileri, çöken baloncukların (a) simetrik ve (b) asimetrik gösterimi ve (c) halka şeklinin çizimi 20
Şekil 2.5. Kavitasyon kabarcığı çökmesi ve bitki materyalinin serbest bırakılması 20
Şekil 2.6. Ultrason tekniğinin resimli temsili 22
Şekil 2.7. Dolaylı sonikasyon için tankta çıkarma kabı konumlandırma. a: karıştırılmamış ekstraksiyon; b: karıştırılmış ekstraksiyon 23
Şekil 2.8. a) Dolaylı ekstraksiyon için ulrasonik temizleme banyosu b) Doğrudan ekstraksiyon için temizleme banyosu c) Doğrudan ekstraksiyon için ultrasonik prob.. 24
Şekil 2.9. Merkez nokta (□), faktöriyel noktaları (●) ve yıldız noktalarını (○) içeren 3 faktörlü bir deneme için oluşturulan merkezi kompozit tasarım 32
Şekil 2.10. Tahmin edilen örnek model denkleminin yanıt yüzeyi (sol) ve kontur (sağ) çizimleri 37
Şekil 3.1. Ispanak köklerinin elde edilmesi 40
Şekil 3.2. Ispanak köklerinin dondurularak kurutulması ve toz haline getirilmesi 41
Şekil 3.3. Gallik asit kalibrasyon eğrisi 46
Şekil 3.4. (+)- Kateşin kalibrasyon eğrisi 47
Şekil 3.5. Trolox kalibrasyon eğrisi 48
Şekil 3.6. Prob tipi ultrason destekli ekstraksiyon cihazı ve işlem basamakları 49
Şekil 4.1. Ekstraktların karesel model üzerinde toplam fenolik madde yanıtı için tahminlenen ve gerçek verileri 64
Şekil 4.2. Ekstraktların karesel model ile belirlenen toplam fenolik madde miktarlarının artık grafikleri: **a.** Normal % olasılık dağılımına karşı grafiği, **b.** Tahminlenen verilere karşı grafiği, **c.** Gerçek verilere karşı grafiği 65
Şekil 4.3. Sabit süre ve etanol konsantrasyonunda, sıcaklık ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Etanol konsantrasyonu %40, Sıcaklık 0-40°C, Genlik %10-70) 67

Şekil 4.4. Sabit sıcaklık ve etanol konsantrasyonunda, süre ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Etanol konsantrasyonu %40, Süre 2-6 dk, Genlik %10-70).....68
Şekil 4.5. Sabit etanol konsantrasyonu ve genlikte, sıcaklık ve süre değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Etanol konsantrasyonu %40, Genlik %40, Sıcaklık 0-40, Süre 2-6 dk).....69
Şekil 4.6. Sabit sıcaklık ve sürede, etanol konsantrasyonu ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Süre 4 dk, Etanol konsantrasyonu %0-80, Genlik %10-70).....70
Şekil 4.7. Sabit süre ve genlikte, sıcaklık ve etanol konsantrasyonu değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Genlik %40, Sıcaklık 0-40 °C, Etanol konsantrasyonu %0-80).....71
Şekil 4.8. Sabit sıcaklık ve genlikte, süre ve etanol konsantrasyonu değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Genlik %40, Süre 2-6 dk, Etanol konsantrasyonu %0-80).....71
Şekil 4.9. Ekstraktların karesel model üzerinde toplam flavonoid madde yanıtı için tahminlenen ve gerçek verileri 75
Şekil 4.10. Ekstraktların Karesel model ile belirlenen toplam flavonoid madde yanıtının artık grafikleri: **a.** Normal % Olasılık dağılıma karşı grafiği, **b.** Tahminlenen verilere karşı grafiği, **c.** Gerçek verilere karşı grafiği 76
Şekil 4.11. Sabit etanol konsantrasyonu ve sürede, sıcaklık ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Etanol konsantrasyonu %40, Süre 4 dk, Sıcaklık 0-40 °C, Genlik %10-70).....77
Şekil 4.12. Sabit etanol konsantrasyonu ve sıcaklıkta, süre ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Etanol konsantrasyonu %40, Sıcaklık 20 °C, Süre 2-6 dk, Genlik %10-70).....78
Şekil 4.13. Sabit etanol konsantrasyonu ve genlikte, süre ve sıcaklık değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Etanol konsantrasyonu %40, Genlik %40, Süre 2-6 dk, Sıcaklık 0-40 °C).....79
Şekil 4.14. Sabit süre ve sıcaklıkta, etanol konsantrasyonu ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Sıcaklık 20 °C Etanol konsantrasyonu %0-80, Genlik %10-70).....80

Şekil 4.15. Sabit süre ve genlikte, etanol konsantrasyonu ve sıcaklık değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Genlik %40, Sıcaklık 0-40 °C, Etanol konsantrasyonu %0-80).....81
Şekil 4.16. Sabit sıcaklık ve genlikte, etanol konsantrasyonu ve süre değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Genlik %40, Süre 2-6 dk, Etanol konsantrasyonu %0-80).....82
Şekil 4.17. Ekstraktların karesel model üzerinde antioksidan aktivitesi yanıtı için tahminlenen ve gerçek verileri.....86
Şekil 4.18. Ekstraktların Karesel model ile belirlenen antioksidan aktivitesi yanıtının artık grafikleri: **a.** Normal % Olasılık dağılıma karşı grafiği, **b.** Tahminlenen verilere karşı grafiği, **c.** Gerçek verilere karşı grafiği 88
Şekil 4.19. Sabit etanol konsantrasyonu ve sürede, sıcaklık ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Etanol konsantrasyonu %40, Sıcaklık 0-40 °C, Genlik %10-70) 89
Şekil 4.20. Sabit etanol konsantrasyonu ve sıcaklıkta, süre ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Etanol konsantrasyonu %40, Süre 2-6 dk, Genlik %10-70).....90
Şekil 4.21. Sabit etanol konsantrasyonu ve genlikte, süre ve sıcaklık değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Genlik %40, Etanol konsantrasyonu %40, Süre 2-6 dk, Sıcaklık 0-40 °C).....91
Şekil 4.22. Sabit süre ve sıcaklıkta, etanol konsantrasyonu ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Sıcaklık 20 °C, Genlik %10-70, Etanol konsantrasyonu %0-80) 92
Şekil 4.23. Sabit süre ve genlikte, etanol konsantrasyonu ve sıcaklık değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Genlik %40, Sıcaklık 0-40 °C, Etanol konsantrasyonu %0-80) 93
Şekil 4.24. Sabit sıcaklık ve genlikte, etanol konsantrasyonu ve süre değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Genlik %40, Sıcaklık 20 °C, Etanol konsantrasyonu %0-80, Süre 2-6 dk).....94
Şekil 4.25. Ispanak köklerinden UAE yöntemiyle ekstrakte edilen toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde içerikleri ve antioksan aktivitenin ekstraksiyon sürecinin optimizasyonunda optimum koşulları (A:Genlik (%), B:Sıcaklık (), C:Süre

(dk), D:Etanol konsantrasyonu (%)) ve toplam fenolik madde (mg GAE/kg LF), toplam flavonoid madde (mg KE/kg LF) içerikleri ve antioksan aktivite değeri (mmol TE/kg LF) için elde edilen rampa grafikleri 97
Şekil 4.26. Optimum koşullarda sıcaklık ve genlik faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri.....98
Şekil 4.27. Optimum koşullarda süre ve genlik faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri.....99
Şekil 4.28. Optimum koşullarda etanol konsantrasyonu ve genlik faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri100
Şekil 4.29. Optimum koşullarda süre ve sıcaklık faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri.....101
Şekil 4.30. Optimum koşullarda etanol konsantrasyonu ve sıcaklık faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri102
Şekil 4.31. Optimum koşullarda etanol konsantrasyonu ve süre faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde mikarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Dünya'da 2017 ve 2020 yılları arasında gerçekleştirilen ıspanak üretim miktarı (ton) 6
Çizelge 2.2. Türkiye'de 2019 yılında bölgelere göre ıspanak üretim miktarı (ton) 7
Çizelge 2.3. Türkiye'de 2017 ve 2020 yılları arasında ıspanak üretimi, tüketimi ve kişi başına düşen tüketim miktarı (TÜİK, 2022) 7
Çizelge 2.4. 100 g çiğ ıspanak için besin değerleri 8
Çizelge 2.5. Ispanak (*Spinaciaoleracea*) bitkisinde tespit edilen biyoaktif bileşen miktarları 11
Çizelge 2.6. Bazı gıda işleme uygulamalarında ultrasonun kullanımı 25
Çizelge 2.7. Bazı ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) ve geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması 27
Çizelge 2.8. Deney tasarımında kullanılan faktörler ve değişken seviyeleri 33
Çizelge 2.9. 3 faktörlü deneme için CCD deney tasarımı 34
Çizelge 2.10. İstenebilirlik katsayısına göre standart tahminleme değerlendirme skalası 38
Çizelge 3.1. Fenolik bileşenlerin analiz parametreleri 45
Çizelge 3.2. Merkezi kompozit tasarımda kullanılan bağımsız değişler ve seviyeleri 50
Çizelge 3.3. Dört faktörlü ve beş seviyeli merkezi kompozit deney tasarımı 50
Çizelge 4.1. Ispanak kökünün temel kimyasal karakterizasyonu (n=3) 53
Çizelge 4.2. Ispanak kökünün mineral bileşen kompozisyonu 54
Çizelge 4.3. Ispanak kökünde tespit edilen fenolik bileşenler, tutulma süreleri (Rt), kütle spektral verileri ve fenolik konsantrasyonları (mg/kg LF) 56
Çizelge 4.4. Ispanak kökünün toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ve antioksidan aktivitesi (n=3) 57
Çizelge 4.5. RSM için kullanılan dört faktörlü, beş seviyeli merkezi kompozit tasarım ve ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarının farklı kombinasyonları için deneysel sonuçlar 58
Çizelge 4.6. Ekstraktların toplam fenolik madde yanıt değişkeni için elde edilen modellerin uyum istatistiği verileri 61

Çizelge 4.7. Toplam fenolik madde miktarı yanıtı için varyans analizi sonuçları 62
Çizelge 4.8. Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı yanıt değişkeni için elde edilen modellerin uyum istatistiği verileri 73
Çizelge 4.9. Toplam flavonoid madde miktarı yanıtı için varyans analizi sonuçları 73
Çizelge 4.10. Ekstraktların antioksidan aktivite yanıt değişkeni için elde edilen modellerin uyum istatistiği verileri 83
Çizelge 4.11. Antioksidan aktivite yanıtı için varyans analizi sonuçları 84
Çizelge 4.12. Ispanak köklerinden UDE yöntemiyle ekstrakte edilen yanıtların optimizasyonunda kullanılan alt-üst limitleri, önem ve hedefler.....95
Çizelge 4.13. Süreç için Design Expert programında belirlenen optimum değerlerin sonuç listesi (25 adet).....96

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dünyada artan nüfusla birlikte hem üretimin hem de tüketimin hızla artması sürdürülebilirlik kavramını ortaya çıkarmıştır. Gıdalar, ilk tarımsal üretimden nihai hane tüketimine kadar gıda tedarik zinciri boyunca israf edilmektedir. Gıda Tarım Örgütü'ne göre dünyada insan tüketimi için üretilen tüm gıdaların üçte biri (1,3 milyar ton/yıl) israf olmaktadır. Gıda israfını azaltmak, 2030 yılına kadar daha sürdürülebilir bir dünya elde etmek için Birleşmiş Milletler tarafından belirlenen hedeflerden biridir.

Dünya çapındaki gıda israfının %40 ile %50'si meyve ve sebzelerden kaynaklanmaktadır. Bu meyve ve sebze kayıplarının %54'ü üretim, hasat sonrası, sevkiyat ve depolama aşamalarında meydana gelirken, %46'sı işleme, dağıtım ve tüketimde meydana gelmektedir. Ekonomik olarak yıllık toplam kaybın 750 milyar dolar olduğu düşünülmektedir. Çeşitli aşamalarda çürük, olgunlaşmamış veya fazla olgunlaşmış meyve ve sebzeler ile proses aşamasında ayıklama, yıkama, doğrama gibi işlemlerden elde edilen çekirdek, kök, yaprak ve posa gibi meyve ve sebze atıkları bu kayıplardandır. Ancak elde edilen bu atıklarda meyve ve sebzenin bir parçasıdır ve biyoaktif bileşenler açısından zengin kaynaklardır.

Son yıllarda gerçekleştirilen "sürdürülebilir tarım ve gıda" anlayışı üzerine yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, direkt meyve ve sebzelerden yapılan ekstraksiyon çalışmaları kadar meyve ve sebzelerin sap, kök vb. atıklarından yapılan çalışmaların çok daha fazla önem kazandığı dikkat çekmektedir. Gıda atıklarının geri

kazanımı veya değerlendirilmesi sürdürülebilirliğin sağlanması amacıyla atılacak en önemli adımlardandır. Son yıllarda yapılan çalışmalar yüksek biyoaktif bileşen içeren meyve ve sebzelerden elde edilen biyoaktif ekstraktların özellikle fonksiyonel gıdalarda gıda katkısı, hasta beslenmesinde takviye edici bileşen, bebek maması ve devam formüllerinde zenginleştirici, sporcu ve enerji içeceklerinde doğal renklendirici, kapsül formda günlük besin takviyesi ve farklı ilaçların içeriklerinde aktif madde olarak kullanım potansiyelleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Ek olarak araştırmalar bu ekstraktlardan doğal kaynaklı gıda katkı maddelerinin elde edilmesi, ekstraktların saflaştırılması ve gıda ve/veya farklı sistemlerde kullanılması ve katma değeri yüksek endüstriyel ürünlere dönüştürülmesi konuları üzerinde durmaktadır.

Ispanak, ülkemizde hemen hemen her bölgede yetiştirilebilmesi, yetiştirme kolaylığı ve çabuk olgunlaşmasından dolayı üretimi tercih edilen bir sebze çeşididir. Ispanak üretiminde dünyada 4. sırada yer alan ülkemizde Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre 2020 yılında 231 bin 515 ton ıspanak üretilmiştir. Ispanak, yapısında bulunan kemik destekleyici mineraller, serbest radikal temizleyici vitaminler ve biyoaktif bileşenlerden dolayı birçok yeşil yapraklı sebzeden daha fazla besin içeriğine sahiptir. Yapısında bulunan fenolik bileşikler; kroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu, yaşlanma karşıtı ve iltihap önleyici (antienflamatuar) özellik göstermekte ve antikarsinojenik ve antimutajenik etki sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, ıspanağın özellikle yüksek fitokimyasal içeriğinden dolayı biyoaktif bileşenlerin geri kazanımı için oldukça uygun bir sebze olduğu görülmektedir.

Ispanağın, yıkanmış hazır ıspanak, dondurulmuş ve kurtulmuş ıspanak biçiminde endüstriyel süreçten geçirilmiş minimal işlenmiş şekilde tercih edilmesi veya mutfaklarda yemek halinde tüketilmesi durumunda açığa çıkan atıkların çoğunu ıspanak kökleri oluşturmaktadır. Literatürde ıspanağın yaprak ve sapları üzerine ekstraksiyon çalışmaları bulunurken ıspanak köklerinde biyoaktif bileşenlerin miktarının tespit edilmesine dair bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu durum, ıspanağın temel atığı olan kök kısımlarının biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu için kaynak olarak kullanılabileceği düşüncesini oluşturmuştur.

Uygulanan ekstraksiyon işlemlerinde biyoaktif bileşenlerin yapıları yüksek sıcaklık uygulamalarında bozunduklarından dolayı geleneksel yöntemlere alternatif olarak yeşil ve yenilikçi yöntemler değerlendirilmektedir. Ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) farklı bitkisel kaynaklardan yapılan ekstraksiyon işleminde geleneksel ve yenilikçi yöntemlere alternatif olarak öne çıkmaktadır. Kısa sürede yüksek verim sağlayan UDE ucuz, tekrarlanabilir, düşük maliyetli, uygulaması basit, düşük enerji kullanımı sağlayan, hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçek seçeneği bulunması gibi avantajlara sahip olan bir yöntemdir. UDE, ultrasonun meydana getirdiği mekanik ses dalgalarının oluşturduğu akustik kavitasyon kabarcıklarının mikrojetlere dönüşmesiyle sıcaklık ve basıncın desteğiyle birlikte bitki hücre duvarının bozunması ve kütle transferinin arttırılması prensibine dayanmaktadır. Oluşan akustik kavitasyon sıcaklık, uygulanan ultrasonik güç, çözücü-katı oranı gibi faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca ekstraksiyon verimi de kullanılan ultrason jeneratörü performansına, ekstraksiyon süreci parametrelerine, reaktör tasarımına, matriks parametrelerine ve ortam ile ilgili değişkenlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu sebeple ıspanak köklerinde UDE yöntemiyle biyoaktif bileşenlerin geri kazanılmasında, süreç üzerinde etkili olan işleme koşullarının belirlenmesi ve yüksek kazanım verimi elde edilmesi amacıyla bu koşulların optimize edilmesi gerekmektedir.

Bu amaçla, bu çalışmada ıspanak köklerinden fonksiyonel bileşenlerin zarar görmeden ekstraksiyonlarını gerçekleştirmek için UDE yönteminin kullanılması öngörülmüştür. UDE ekstraksiyonunu etkileyen en önemli değişkenlerden olan ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksyon süresi, ultrason genliği ve çözücü konsantrasyonun, ıspanak köklerinin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi hedeflenmektedir. Bu hedef doğrultusunda ekstraksiyon süreci, yanıt yüzey yöntemi ve merkezi kompozit deney tasarımıyla oluşturulan deneme basamakları kullanılarak optimize edilecektir. Optimizasyon sonunda elde edilen optimum ekstraksiyon koşulları ile elde edilen ekstrakta modelden elde edilen tahmin verileri ile deneysel veriler karşılaştırılarak, geliştiren modelin uygunluğunun ve kullanılabilirliğinin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır. Bu amaçla, ıspanak kökünün UDE yöntemi ile katma değeri yüksek

çeşitli ürünlerin üretimi için kullanılabilecek zengin bir biyoaktif bileşen ekstraktı elde etmek için kullanım potansiyelinin araştırılması hedeflenmektedir.

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Ispanak

Ispanak *Chenopodiaceae* familyasına ait olan tek yıllık bir sebzedir. Ispanak koyu yeşil renkte, kazık kök yapısına sahip ve rozet gövde yapısında otsu bir bitki çeşididir. Ispanak gövdesi 40-80 cm kadar uzamakta ve yaprak büyüklükleri yetiştirildiği bölgenin ekolojik koşulları, ıspanak çeşidi ve bakım şekline göre değişiklik göstermektedir (Dal ve Türkmen, 2016). Asya kökenli olduğu düşünülen ıspanağın anavatanın Kafkasya, Nepal, güney Türkistan, batı Asya, Çin ve İran olduğu tespit edilmiştir (Şimşek, 2019). Ispanak üretiminin M.S. 7. Yüzyılda Çin'de, 16. Yüzyıldan itibaren ise Avrupa ülkelerinde yaygınlaştığı bildirilmiştir (Köse, 2018). Ispanak soğuk ve ılık iklim kuşağına sahip bölgelerde yetiştirilen bir kış bitkisidir (Köse, 2018). Ispanak, ılıman iklim bölgelerinde yaz sonu ve kış aylarında, soğuk iklim bölgelerinde ise kış ve ilkbahar aylarında yetiştirilmektedir. Ispanak, yetiştirme kolaylığı ve hasat olgunluğuna hızlı erişmesinden dolayı yaygın olarak üretilen bir sebzedir. Yapılan araştırmalar ıspanağın ekimden sonra 30 ile 70 gün arasında olgunlaştığını göstermektedir, ancak çoğu zaman 40 ile 50 gün arasında hasat edilmektedir. Ülkemizde de hemen hemen tüm bölgelerde ıspanak yetiştirildiği görülmektedir (Şimşek, 2019). Ülkemizde ıspanak ilkbahar ekimi ve hasadı, sonbahar ekimi ve hasadı, ilkbahar ekimi ve sonbahar hasadı olmak üzere üç dönemde yetiştirilmektedir (Köse, 2018).

Dünya'da 2017 ve 2020 yılları arasında gerçekleştirilen ıspanak üretim miktarı (ton) Çizelge 2.1'de gösterilmektedir. Dünya'da 2020 yılında yapılan ıspanak üretimi verilerine göre en yüksek üretimi 28.520.698 ton ile Çin Halk Cumhuriyeti

gerçekleştirmiştir. Ispanak üretiminin %95,2'si Asya kıtasında gerçekleştirilmiştir. Türkiye ıspanak üretiminde dünya sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır. Türkiye, 2020 yılında 231.515 ton ıspanak üretimi gerçekleştirmiştir. Dünya'da ve Türkiye'de 2017 ve 2020 yılları arasında gerçekleştirilen ıspanak üretim verileri incelendiğinde üretim miktarının her yıl artış gösterdiği gözlenmiştir (FAOSTAT, 2022).

Çizelge 2.1. Dünya'da 2017 ve 2020 yılları arasında gerçekleştirilen ıspanak üretim miktarı (ton) (FAOSTAT, 2022).

	2017	**2018**	**2019**	**2020**
Çin Halk Cumhuriyeti	25.404.738	26.472.445	27.540.167	28.520.698
Amerika Birleşik Devletleri	366.984	384.669	435.721	367.433
Kenya	130.808	169.356	180.343	243.336
Türkiye	222.177	225.174	229.793	231.515
Japonya	228.100	228.300	226.865	217.283
Endonezya	148.303	162.263	160.306	157.024
Fransa	120.626	126.510	122.670	97.110
İran	114.771	115.764	118.641	98.349
İtalya	91.977	91.980	99.520	99.870

Türkiye'de 2019 yılında bölgelere göre ıspanak üretim miktarı (ton) Çizelge 2.2'de gösterilmektedir. Türkiye'de 2019 TÜİK verilerine göre en çok ıspanak üretimi yapılan bölgeler sırasıyla Ege, Marmara, Karadeniz, İç Anadolu, Akdeniz, Doğu Anadolu ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi'dir. Ispanak yetiştiriciliğinde öne çıkan illerimiz sırasıyla İzmir, Ankara, Bursa ve Samsun'dur (TÜİK, 2022).

Çizelge 2.2. Türkiye'de 2019 yılında bölgelere göre ıspanak üretim miktarı (ton) (TÜİK, 2022).

Bölgeler	Üretim Miktarı (ton)	Bölgeler	Üretim Miktarı (ton)
Marmara	35.983	**İç Anadolu**	48.790
Karadeniz	33.829	**Doğu Anadolu**	1.682
Ege	81.751	**Güney Doğu Anadolu**	1.198
Akdeniz	26.560		

Türkiye'de 2017 ve 2020 yılları arasında ıspanak üretimi (ton), tüketimi (ton) ve kişi başına düşen tüketim miktarı (kg/yıl) Çizelge 2.3'te gösterilmektedir. Türkiye'de 2020-2021 TÜİK bitkisel ürün denge tabloları raporuna göre ıspanak bitkisinin yurt içi üretiminin yurt içi talebi karşılama derecesi (yeterlilik derecesi) %106,1 olarak belirtilmiştir. Türkiye'de 2017 ve 2020 yılları arasında ıspanağın kişi başına tüketim miktarı 2,3 kg/yıl olarak tespit edilmiştir (TÜİK, 2022).

Çizelge 2.3. Türkiye'de 2017 ve 2020 yılları arasında ıspanak üretimi, tüketimi ve kişi başına düşen tüketim miktarı (TÜİK, 2022)

	2017	**2018**	**2019**	**2020**
Üretim (ton)	222.177	225.174	229.793	231.515
Arz/Kullanım (ton)	217.117	220.167	224.509	226.371
Kişi Başına Tüketim (kg/yıl)	2.3	2.3	2.3	2.3

Ispanak, vitamin ve mineral açısından zengin bir bitki türüdür. İçeriğinde serbest radikal temizleyicisi olan A, K, B, C ve E vitaminleri bulunmaktadır. Ayrıca kemik destekleyici mineral olan kalsiyum açısından da zengin bir bitkidir. İçeriğinde ayrıca potasyum, folat, protein, manganez, çinko, niasin, selenyum ve omega-3 yağ asitleri bulunmaktadır (Avşar, 2011). Çiğ ıspanak (100 g) için besin içeriği Çizelge 2.4'te gösterilmektedir.

Ispanağın zengin besin içeriği insan sağlığı açısından önemini arttırmaktadır. Anemik hastaların diyetlerinde, göğüs hastalıkları, ağız boğaz ağrıları, şeker hastalığı,

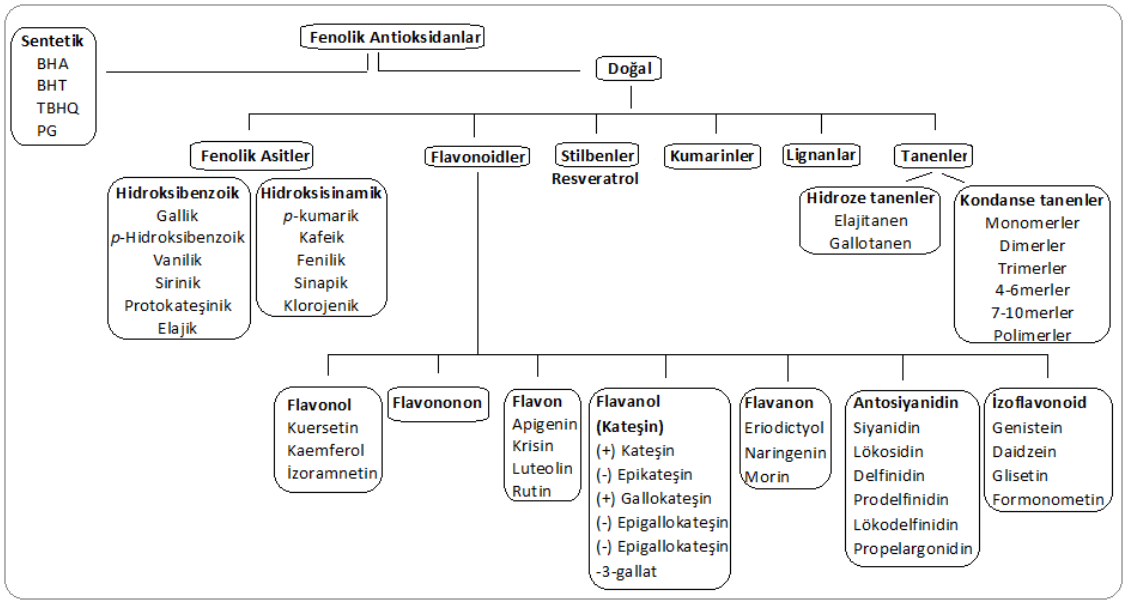
şişmanlık ve kabızlık sorunlarının tedavisinde halk arasında sık sık kullanılan bir sebzedir (Şimşek, 2019).

Çizelge 2.4. 100 g çiğ ıspanak için besin değerleri (Türkomp, 2022)

Bileşen	Birim	Ortalama	En Düşük	En Yüksek
Enerji	kcal	24	21	34
Enerji	kJ	102	86	143
Su	g	91,38	88,96	92,29
Kül	g	2,00	1,79	2,26
Protein	g	2,49	2,08	3,34
Azot	g	0,40	0,33	0,53
Yağ, toplam	g	0,49	0,26	1,03
Karbonhidrat	g	1,37	0,97	1,65
Lif, toplam diyet	g	2,27	1,60	2,99
Lif, suda çözünür	g	0,67	0,38	0,96
Lif, suda çözünmeyen	g	1,60	0,85	2,61
Sakaroz	g	0,08	0,02	0,15
Glukoz	g	0,12	0,09	0,16
Fruktoz	g	0,36	0,02	1,01
Laktoz	g	0,00	0,00	0,00
Maltoz	g	0,00	0,00	0,00
Tuz	mg	193	62	542
Demir, Fe	mg	9,71	6,88	13,32
Fosfor, P	mg	29	19	37
Kalsiyum, Ca	mg	143	40	239
Magnezyum, Mg	mg	116	56	236
Potasyum, K	mg	529	280	839
Sodyum, Na	mg	77	25	217
Çinko, Zn	mg	0,42	0,31	0,49
Selenyum, Se	µg	0,8	0,0	2,3
C vitamini	mg	35,7	27,5	54,0
L-askorbik asit	mg	27,2	8,8	38,0
Tiamin	mg	0,088	0,052	0,127
Riboflavin	mg	0,198	0,137	0,287
Niasin	mg	0,960	0,802	1,575
B-6 vitamini, toplam	mg	0,249	0,177	0,302
Folat, gıda	µg	264	200	316
A vitamini	RE	666	594	750
Beta-karoten	µg	7987	7132	8997
Likopen	µg	0	0	0
Lutein	µg	10012	9089	10837
K-1 vitamini	µg	336,4	183,0	546,2

2.2. Ispanakta Bulunan Fonksiyonel Bileşenler

Sebzelerin meyvelere oranla daha az antioksidan madde miktarına sahip oldukları belirtilmesine rağmen yapılarında tokoferoller, karotenoidler, flavonoller ve fenolik asitler gibi fenolik bileşikler şeklinde antioksidanlar bulunmaktadır. Doğal antioksidanlar, özellikle flavonoidler, asit türevleri, tokoferoller ve organik asitler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşan fenolik bileşiklerdir. Bu fenolik bileşenler meyve ve sebzelerin renk, tat ve aromasından sorumludur (Deveci ve Uzun, 2011). Fenolik antioksidanların sınıflandırılması Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Bitkilerdeki en büyük fenolik grubu, doğal olarak oluşan sekiz bin fenolik bileşiğin yarısından fazlasını oluşturan flavonoidlerdir. Flavonoidler yapılarında C haklasına yönelik ikame modellerine göre flavanon, flavon, antosiyanidin, izoflavanon, kalkon, aurone olmak üzere altı adet alt gruptan meydana gelmektedir (Martins vd., 2011).



Şekil 2.1. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Daşdemir, 2019)

Ispanak, C vitamini, flavonoidler ve fenolik asitler gibi biyoaktif bileşenler bakımından zengindir. İçeriğindeki en önemli fitokimyasal karotenoidlerdir (β-karoten, lutein ve zeaksantin) (Nemzer vd., 2011). İçeriğindeki fenolik bileşiklerin insan vücudundaki serbest radikal oluşumuna bağlı oksidatif stresi etkileyerek azalttığı düşünülmektedir. Ispanakta β-karoten, β-kriptoksantin, lutein ve kemanantinin varlığı,

lipoproteinlerde karotenoid seviyelerini artırmaktadır. Serbest radikallerin, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonuna etkileri karotenoidler varlığında etkisizleşmektedir. Bu sayede antioksidanların oksidatif strese bağlı insan koroner kalp hastalıklarına karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (Murcia vd., 2020). Diğer yeşil yapraklı sebzelere kıyasla içerdiği benzersiz flavonoid bileşenleri (glukonoridler) sayesinde memelilerde yaşlanma karşıtı etki ve yaşlanmaya bağlı alzheimer gibi hastalıklarda azalmaya neden olduğu iddia edilmektedir. Yapısındaki klorofil de antioksidan etkiye sahiptir. Ispanak fenolikleri antiinflamatuar, antiproliferatif, antikarsinojenik ve antimutajenik olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteler sergilemektedir (Howard ve Pandjaitan, 2008).

Ispanak ekstraktının içerdiği K vitamini, folik asit, lutein ve β-karotenler nedeniyle diyet takviyesi olarak tüketiminin (75 g/gün) yaşlanmanın oluşturduğu oksidatif stres riskini azaltabileceği, motor ve bilişsel becerileri geliştirebileceği, zihinsel kapasite ve kısa süreli hafızayı arttırabileceği raporlanmıştır (Murcia vd., 2020). Karaca (2010) ıspanak yapraklarının toplam fenolik madde miktarını 14804 mg GAE/kg kuru madde, askorbik asit miktarını 4098 mg/kg kuru madde, antioksidan aktivitesini de 52 μmol/g kuru madde olarak tespit etmiştir. Deveci vd. (2011) yaptıkları çalışmada farklı ortam şartlarında yetiştirilen ıspanakların büyüme evrelerindeki toplam klorofil içeriklerini tespit etmişlerdir. Ispanak yaprakları 0,5 g $CaCO_3$ ve %80 aseton ile ekstrakte edilmiştir. Hasat edilme olgunluğuna gelen açık alanda yetiştirilmiş ıspanakların toplam klorofil miktarını 985,48 mg/g olarak tespit edilmiştir. Altemimi vd. (2015) yaptıkları çalışmada ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle ıspanak bitkisinde lutein ve β-karoten miktarını tespit etmiştir. Ekstraksiyon verimi için en iyi koşullar altında, toplam lutein ve β-karoten içeriklerinin deneysel sonuçları sırasıyla 2,01±0,04 μg/g ve 3,07±0,04 μg/g olarak bulunmuştur. Choudhary vd., (2014) yaptıkları çalışmada ıspanakta ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde ettikleri özütte fenolik bileşiklerin verimlerini analiz etmiştir. Ekstraksiyon verimi için en iyi koşullarda toplam fenol içeriği 33,96 mg gallik asit/g kuru ağırlık, flavonoidler 27,37 mg/g kuru ağırlık, DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi %64,18 ve ferrik indirgeyici antioksidan gücü %70,25 değerinde tespit edilmiştir. Sultana vd. (2008) meyve ve sebzelerin flavonol (kamferol, kuarsetin, mirisetin) içeriklerini incelemişlerdir. Sebze kategorisinde en yüksek değer ıspanakta (1720,5 mg/kg) elde

edilmiştir. Ispanak bitkisinin, biyoaktif bileşen miktarı tespitine yönelik yapılan araştırmaların yöntemleri ve sonuçları Çizelge 2.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Ispanak (*Spinaciaoleracea*) bitkisinde tespit edilen biyoaktif bileşen miktarları

Bileşen	**Yöntem**	**Miktar**	**Kaynak**
Toplam Fenolik Bileşenler	%80 Metanol çözeltisi ile ekstraksiyon	14,80 mg GAE/g KM	Karaca, 2010
Askorbik Asit	%3'lük sitrik asit çözeltisi ile ekstraksiyon	4,09 mg/g KM	Karaca, 2010
Antioksidan Aktivitesi	Metanol çözeltisi ile ekstraksiyon	52 µM trolox/g KM	Karaca, 2010
Toplam Klorofil	0,5 g $CaCO_3$ ve %80 aseton ile ekstraksiyon	985,48 mg/g	Deveci ve Uzun, 2011
Toplam Lutein	UDE; %40 ultrasonik güç, 40 °C, 16 dk	2,01 µg/g	Altemimi vd., 2015
Toplam β-karoten	Ultrason destekli ekstraksiyon; 40 °C; %40 ultrasonik güç, 16 dk	3,07 µg/g	Altemimi vd., 2015
Toplam Fenolik Bileşen	UDE; %50 ultrasonik güç, 40˚C, 30 dk	33,96 mg gallik asit/g KM	Choudhary vd., 2015
Toplam Flavonoid	UDE; %50 ultrasonik güç, 40˚C, 30 dk	27,37 mg/g KM	Choudhary vd., 2015
Flavon (kaempeferol, kersetin, mirisetin)	Asitleştirilmiş metanol (metanol/HCl, 100:1, v/v) ile ekstraksiyon	1,72 mg/g	Sultana ve Anwar, 2008

UDE: Ultrason destekli ekstraksiyon, KM: kuru madde

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, ıspanağın özellikle yüksek fitokimyasal içeriğinden dolayı biyoaktif bileşenlerin geri kazanımı için oldukça uygun bir sebze

olduğu görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde gıdanın sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla meyve ve sebzenin kendisi dışında atık olarak değerlendirilen sap, kök, yaprak, çekirdek ve kabuk kısımlarının da yapılan ekstraksiyon çalışmalarında kullanıldığı ve önem kazandığı dikkat çekmektedir.

Yapılan 3 farklı çalışmada ıspanak sebzesinin tüketilemez olarak değerlendirilen atık miktarının satın alınan ıspanak miktarına oranı %17 (Carnovale ve Marletta, 2000), %30 (Rimestad ve diğerleri, 2017) ve %19 (Public Health England, 2015) olarak raporlanmıştır (Laurentiis vd., 2018). Ispanak üretimi ve pazarlama süreçlerindeki atık potansiyelinin incelendiği bir çalışmada, Kanada'da ıspanak yetiştiriciliğinin her yıl 1500 ton yan ürüne yol açtığı ve bu yan ürünlerin özellikle lutein ve klorofilin geri kazanımı için verimli olduğu aktarılmıştır. Tarlada ticarileştirmeye ve pazarlamaya uygun olmayan ıspanak atıklarının değerlendirilmesine yönelik yapılan başka bir araştırmada, süperkritik CO_2 yöntemi ile atıklardan %72 verimle lutein ve %50 verimle klorofil elde edilmiştir (Derrien vd., 2018).

Ispanağın yemek halinde, yıkanmış hazır ıspanak ve dondurulmuş ıspanak olarak değerlendirilmesinde ortaya çıkan en önemli atık ıspanak kökleridir. Literatürde ıspanak sapında ve yaprağında biyoaktif bileşenlerin tespitine yöneklik çalışmalar mevcut olmasına rağmen, ıspanak kökünde böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır. Şat ve Öz (2015), taze ıspanağın yaprak ve sap kısımlarında C vitamini miktarını, toplam antioksidan aktivitesini ve toplam fenolik madde miktarını tespit etmişlerdir. Sap kısımlarının (9,96 mg GAE/100 g) yaprak kısımlarına (51,83 mg GAE/100 g) göre toplam fenolik madde miktarının yaklaşık 5 kat daha az olduğu rapor edilmiştir. Bu sonuç ıspanağın temel atığı olan kök kısımlarının biyoaktif bileşenleri belirli oranda içerdiğini ve bileşenlerin ekstraksiyonu için kaynak olarak kullanılabileceği düşüncesini arttırmıştır.

2.3. Ekstraksiyon Yöntemleri

Seçici çözücüler kullanılarak bitki dokularındaki biyoaktif bileşenlerin bitkinin inaktif kısımlarından ayrılması için uygulanan işlemler bütününe 'ekstraksiyon' adı verilmektedir (Şengül ve Topdaş, 2019). Genel olarak bir bitki ekstraktı (özütü), taze veya kurutulmuş bitkilerden veya bitkilerin bir kısmından (yapraklar, çiçekler,

tohumlar, kökler ve ağaç kabuğu) herhangi bir ekstraksiyon prosedürüyle elde edilen bileşikler ve/veya bileşiklerin karışımı olarak tanımlanmaktadır. Uygulanan ekstraksiyonun verimi çözücü çeşidi, pH, numune-çözücü oranı, partikül boyutu, sıcaklık, süre gibi faktörlerden etkilenerek değişkenlik göstermektedir (Vinatoru vd., 2017). Ek olarak, ektrakte edilen biyoaktif bileşenlerin türü, miktarı ve kimyasal yapıları, uygulanan ekstraksiyon yöntemlerine, numune parçacık boyutlarına, saklama süresi ve koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Ek olarak biyoaktif bileşenler, karbonhidratlar, proteinler ve bazı çözünmeyen yüksek moleküler ağırlıklı fenolikler ile bileşik yapıda bulunabilirler. Bu nedenle, biyoaktif bileşenlerin kompleks ortamlardan izolasyonunda en önemli aşama ekstraksiyon aşamasıdır (Aires, 2017). Ek olarak, ekstraksiyonla elde edilecek biyoaktif bileşenlerin kayba ve bozunmaya uğramadan elde edilmesi son derece önemlidir (Şengül ve Topdaş, 2019).

2.3.1. Geleneksel Ekstraksiyon Yöntemleri

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri genel olarak distilasyon, solvent ekstraksiyonu, soğuk pres ve sokselet ekstraksiyonu olmak üzere 4 sınıfta incelenmektedir (Vinatoru vd., 2017).

Distilasyon (damıtma) ekstraksiyonu, yüz yılı aşkın süredir sıvı-sıvı homojen karışımlarında uçucu bileşenlerin ayrımında kullanılan bir yöntemdir. Ayırma işlemi karışım içerisindeki sıvıların sahip olduğu farklı kaynama derecelerinden faydalanılarak yapılmaktadır. Distilasyon yöntemi, damıtma kabında ısıtılan karışımda kaynama noktası düşük olan bileşenin buharlaşarak bir soğutucu yardımıyla sıvılaştırılması ve tekrar kazanılması prensibine dayanmaktadır. Distilasyon yönteminin su distilasyonu, buhar distilasyonu, mikrodalga destekli distilasyon, hidrodifüzyon, vakum distilasyonu gibi farklı çeşitleri bulunmaktadır. Uygulanan yüksek sıcaklık ekstrakte edilmek istenen bileşiklerin bozulmalarına neden olmaktadır (Kaya ve Ergönül, 2015).

Solvent ekstraksiyonu, hidrokarbon çözücülerle yapılan ayırma prensibine dayanmaktadır. Numunenin katı veya sıvı fazda olmasına göre katı-sıvı veya sıvı-sıvı ekstraksiyon olarak adlandırılmaktadır (Kaya ve Ergönül, 2015). Solvent ekstraksiyonu teknik farklılıklar sonucunda perkolasyon, maserasyon, infüzyon ve infloraj olmak

üzere 4 farklı alt grupta değerlendirilmektedir (Vinatoru vd., 2017). Maserasyon, toz haline getirilmiş numunenin oda sıcaklığında kapalı bir kapta uygun çözücü ile çalkalanması prensibine dayanmaktadır. Perkolasyon, toz halindeki numunenin çözücünün yukarıdan aşağıya doğru yavaş damlacıklar şeklinde boşaltıldığı kapalı bir silindirik kaba yerleştirilmesidir. Bu yöntemde süzme cihazının kendisi altta bulunan bir filtreye sahip olduğu için filtrasyon gerekli değildir (Aires, 2017). İnfüzyon, çözücü ile numunenin kaynatılarak ayırmak istenen bileşiğin çözücüye geçmesi prensibine dayanmaktadır (Vinatoru vd., 2017). İnfloraj yöntemi, örneklerin soğuk hayvansal yağ ile cam plakalar arasında sıkıştırılmasıyla ayrımı yapılmak istenen maddenin yağa geçmesi esasına dayanmaktadır (Kaya ve Ergönül, 2015).

Soğuk presleme yöntemi özellikle narenciye meyvelerinin kabuklarındaki uçucu bileşikleri içeren yağların elde edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem örneklerin bez bir torbada soğuk hidrolik preslerle sıkılması esasına dayanmaktadır. Soğuk pres yönteminde sıcaklık etkisinin olmaması ve uçucu olmayan bileşenlerin (doğal antioksidan olan tokoferoller) ortamda muhafaza edilmesi yöntemi tercih edilebilir kılmaktadır (Kaya ve Ergönül, 2015).

Sokselet ekstraksiyonu, toz numunelerin bir geri akış kondansatörü altında bir toplama şişesinin üstüne yerleştirilmiş selüloz numune haznelerine kapatılarak, kaynatılmak suretiyle buharlaşan solventin soğutulup yoğunlaştırılmasıyla numune haznesinden geçirilmesi esasına dayanmaktadır (Aires, 2017). Sürekli bir proses olan sokselet ekstraksiyonu, diğer solvent ekstraksiyonu yöntemlerine göre daha az zaman ve daha az solvent gerektirdiğinden dolayı avantajlıdır. Ancak uygulanan aşırı ısının termolabil polifenoller üzerinde olumsuz etkisi olduğu raporlanmıştır (Alara vd., 2021).

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri genellikle daha yüksek hacimde çözücü gerektiren, uzun saatler süren, araştırmacıya bağlı yoğun iş gücü ve emek gerektiren, otomasyona uygun olmayan manuel prosedürlerdir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar tutarlılık göstermemektedir (Alara vd., 2021). Ek olarak geleneksel yöntemlerde büyük miktarda çözücülerin buharlaştırılması zorluğu, buna bağlı olarak uygulanan yüksek sıcaklık uygulamasından dolayı hassas bileşenlerin bozunumu ve düşük ekstraksiyon seçiciliği yöntemin diğer dezavantajlarındandır (Aires, 2017). Bu yöntemlerin eksik

yönlerini kapatmak ve zor aşamalarını kolaylaştırmak için geleneksel olmayan (yenilikçi) ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir (Alara vd., 2021).

2.3.2. Yenilikçi Ekstraksiyon Yöntemleri

Özellikle bitkisel materyallerden biyoaktif maddelerin ekstrakte edilmesinde, çevre dostu olarak bilinen, yüksek kalite ve verimde ekstrakt eldesi sağlayan yeşil ekstraksiyon yöntemleri son yıllarda önem kazanmıştır (Kutlu vd., 2017). Ultrason destekli ekstraksiyon, vurgulu elektrik alan destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik akış ekstraksiyonu, enzim destekli ekstraksiyon gibi yeşil ve yenilikçi ekstraksiyon yöntemleri geleneksel yöntemlere alternatif olarak geliştirilmiştir (Chemat ve Khan, 2011; Ivanovic vd., 2014).

Vurgulu elektrik alan yardımlı ekstraksiyon, bir seri elektrot arasına yerleştirilen ürüne 1-100 μs arasında değişen sürelerde elektrik vurguları uygulanarak hücre zarı üzerinde por oluşumu sağlaması ve hücreyi parçalaması ile hücre doku ve bileşenlerinin salınması prensibine dayanmaktadır. Uygulanan elektrik enerjisi Joule etkisinden dolayı termal enerjiye dönüşmekte ve ortaya çıkan termal enerji bitkisel materyali etkilemektedir (Gavahian vd., 2018). Uygulama veriminin; vurgu sayısı, uygulama sıcaklığı ve süresi, ekstrakte edilecek hammaddenin özellikleri gibi etkilerle değiştiği bildirilmektedir (Şengül ve Topdaş, 2019).

Bitkilerin dokularındaki bazı biyoaktif bileşenler bir çözücü ile ayırma işleminin gerçekleştirilemeyeceği hidrojen bağları veya hidrofobik bağlar ile polisakkarit-lignin ağında yer almaktadır. Bu durumlarda polisakkaritler ve lipit bileşenlerinin hidrolizine sebebiyet verecek ve hücre duvarının parçalanmasını sağlayacak olan enzimler (selülaz, α-amilaz, pektinaz vb.) ekstraksiyon uygulamasına ilave edilebilmektedir (Şengül ve Topdaş, 2019). Enzim destekli ekstraksiyon olarak adlandırılan bu yöntem, çözücü olarak organik çözücüler yerine su kullanılması nedeniyle çevre dostu bir yöntem olarak tanımlanır (Alara vd., 2021).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, uygulanan elektromanyetik enerjinin iyonik iletim ve dipol dönüş mekanizmalarını takip ederek ısıya dönüşmesi ile ortamdaki ısının mikrodalga ile ısıtılmasını sağlamaktadır (Şengül ve Topdaş, 2019). Artan ısı, hedef

fitokimyasalların numuneden difüzyonunu arttırarak çözücülerin numuneye yayılmasını sağlar ve numuneyi tutan hidrojen bağlarının bozulmasını arttırır (Alara vd., 2021). Bu yöntem, klasik yaklaşıma göre daha az zaman ve çözücü harcama avantajına sahiptir. Fakat bu yöntem, polifenollerin ekstraksiyonlarında yüksek sıcaklık uygulaması nedeniyle bozunmalara yol açabilmektedir (Aires, 2017).

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, seçilen çözgenin basınç ve sıcaklığı arttırılıp süperkritik akışkan haline getirilmesi ve örnekle muamele edilerek ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesi prensibine dayanmaktadır. En büyük avantajı sistemde çözgen geri kazanımı sağlanabilmektedir. Genellikle çözgen olarak diğer çözücülere göre kritik sıcaklık ve basıncının düşük olması, ucuz, kolay bulunabilir ve atmosfere salınabilir olmasından dolayı CO_2 kullanılmaktadır (Şengül ve Topdaş, 2019).

Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi, 20 ile 2000 kHz arasında değişen frekanslara sahip ultrason dalgalarının hücre duvarına mekanik tahribat oluşturarak kavitasyon meydana getirmesi ve hücre duvarlarının geçirgenliğinin arttırılmasıyla kütle transferinin hızlandırılması prensibine dayanmaktadır. Ultrason destekli ekstraksiyon kullanımı, son yıllarda polifenollerin yapraklar, gövdeler, saplar, meyveler ve tohumlar gibi farklı bitki kısımlarından ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Aires, 2017).

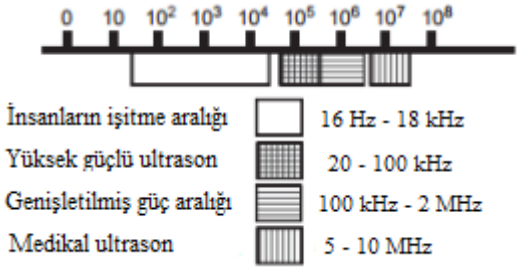
Ultrason destekli ekstraksiyonun diğer yeşil tekniklere göre daha hızlı, ekonomik ve verimli bir ekstraksiyon yöntemi olduğu farklı çalışmalarca bildirilmiştir. Herrera vd. (2005), çileklerden aynı miktardaki fenolik bileşenlerin eldesinin geleneksel yöntemle 20 saat, mikrodalga destekli ekstraksiyon ile 3 saat sürdüğünü, ultrason destekli ekstraksiyon için ise sadece 2 dakikanın yeterli olduğunu ortaya koymuşlardır. Bir diğer yeşil teknoloji olan enzim destekli ekstraksiyon çevre dostu olmasına rağmen, ultrason destekli ekstraksiyona göre yüksek maliyetlidir ve enzim denatürasyonu nedeniyle sürecin sürdürülebilirliği kısadır (Chen vd., 2015; Ma vd., 2009). Nguyen vd. (2014) dut meyvesinde toplam fenoliklerin ve antosiyaninlerin miktarlarını belirlemiş ve ultrason destekli ekstraksiyonun (UDE) enzim destekli ekstraksiyon (EDE) yöntemine kıyasla sonuçları sırasıyla 16,9 ve 21,5 kat arttırdığını belirtmiştir. Ek olarak, süperkritik akış ekstraksiyonu gibi karıştırma ünitesi ilave edilemeyen ekstraksiyon yöntemlerinde karıştırma yardımcısı olarak ultrason kullanıldığında ürün verimliliğinin

%20 oranında arttığı tespit edilmiştir (Riera vd., 2004). Ayrıca, ultrason destekli ekstraksiyon, nispeten düşük maliyetli çok basit bir yöntemdir ve hem küçük laboratuvar hem de büyük endüstriyel ölçekte kullanılabilmektedir (Aires, 2017). Gıda kalitesinin arttırılması, besleyici öğelerin ve vitaminlerin bozunmadan korunabilmesi gıdalarda ultrason yönteminin sağladığı diğer avantajlar olarak değerlendirilmektedir (Yaman ve Kuleaşan, 2016).

2.4. Ultrason Destekli Ekstraksiyon

2.4.1. Ultrasonun Etki Mekanizması

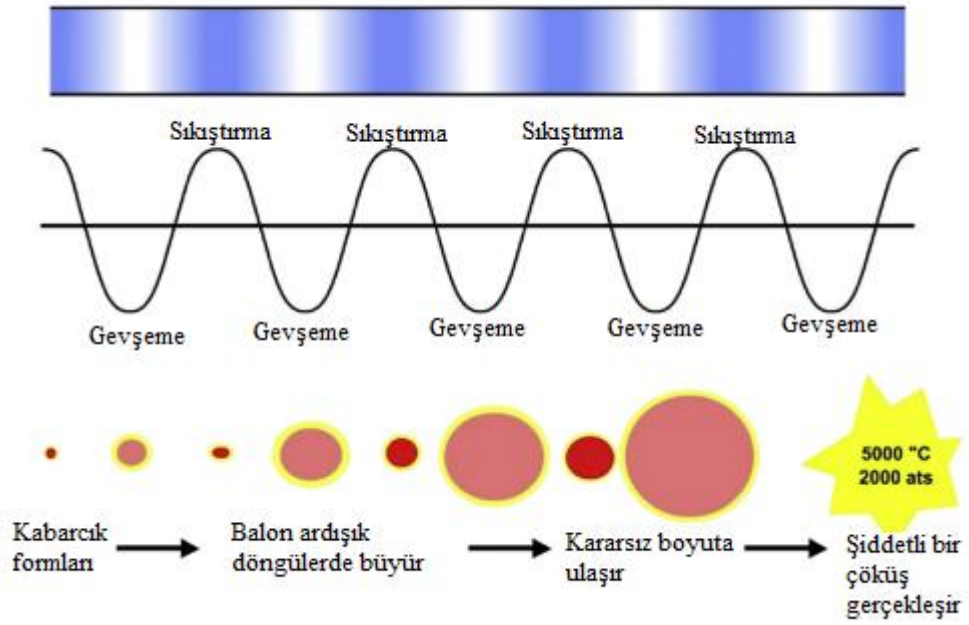
Ultrason yayılması için elastik bir ortam gerektiren, insan kulağının işitebileceğinin üzerinde (>20kHz) frekanslardaki mekanik ses dalgalarıdır (Vinatoru vd., 2017). Gıda endüstrisinde ultrason uygulamaları 20 kHz – 1MHz arasında gerçekleştirilmektedir. 5 MHz üzeri ultrason uygulamaları genellikle medikal işlemlerde uygulanmaktadır (Şekil 2.2) (Yağcıoğlu, 2015). Ultrason uygulamalarının sınıflandırılması için üretilen ses alanının enerji miktarı en önemli kriterdir (Knorr vd., 2004). Gıda teknolojisinde ultrason, genelde düşük enerjili uygulama ve yüksek enerjili uygulama olarak ikiye ayrılmaktadır (Ergün vd., 2013). Düşük enerjili ultrason uygulamaları sıklıkla 1 W/cm^2'den düşük yoğunluklarda ve 100 kHz'den yüksek frekanslarda değişmektedir (Knorr vd., 2004). Düşük yoğunlukta enerji kullanımı maddenin fiziksel, kimyasal ve mekanik özelliklerini değiştirmediği için genellikle gıdalarda fizikokimyasal özelliklerin tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Ergün vd., 2013). Yüksek enerjili ultrason uygulamaları genellikle 1 W/cm^2'den daha yüksek yoğunluklarda ve 20 ile 100 kHz arasındaki frekanslarda değişmektedir. Yüksek enerjili ultrason sıvı gıdaların gazının alınması, oksidasyon/indirgeme reaksiyonlarının indüklenmesi, enzimlerin ve proteinlerin ekstraksiyonu gibi işlemlerde uygulanmaktadır. Ayrıca ısı ve basınçla kombine edilerek ısıya dirençli enzimleri etkisizleştirdiği rapor edilmiştir (Knorr vd., 2004).



Şekil 2.2. Ses dalgası tipleri (Yağcıoğlu, 2015).

Ultrason, uygulanan ortama mekanik titreşim, akustik dalga ve akustik kavitasyon oluşturarak 3 farklı şekilde etki etmektedir. Mekanik titreşim, örnek içerisindeki katı parçacıkların parçalanmasını sağlamaktadır. Akustik dalga ise sıvı örnek içerisinde kütle geçişine katkı sağlamaktadır. Bu nedenle iki etki de kavitasyonel olmayan fiziksel etkiler olarak değerlendirilmektedir (Türkmen, 2012). Sıvı sistemler üzerindeki ultrason etkileri esas olarak kavitasyon olayı ile ilgilidir (Soria ve Villamiel, 2010). Bir ses dalgası elastik bir ortamdan geçerken parçacıkların uzunlamasına yer değiştirmesine neden olmaktadır (Chemat vd., 2011). Ultrason, içinden geçtiği ortamın moleküllerinde indüklenen bir dizi sıkıştırma ve gevşeme dalgası yoluyla yayılmakta ve ortamın yüzeyinde piston görevi yürütmektedir (Vinatoru vd., 2017). Piston açık konumdayken sıkıştırma evresi ve piston çekme konumundayken gevşeme evresi meydana getirmektedir. Her ortamın kendine has kritik moleküler mesafesi bulunmaktadır (Chemat vd., 2011). Yeterince yüksek güçte, gevşeme döngüsü negatif basınç ile moleküllerin çekici kuvvetlerini aşabilmekte ve moleküler arası mesafeyi arttırabilmektedir (Vinatoru vd., 2017). Bu moleküler kritik mesafenin üzerinde bozulmakta ve içerisinde boşluklar oluşmaya başlamaktadır (Chemat vd., 2011). Oluşan boşlukların içi sıvının doymuş buharıyla dolmaktadır (Ildırar, 2014). Ortamda oluşan bu boşluklar "kavitasyon kabarcığı" olarak adlandırılmaktadır. Kavitasyon kabarcıkları gevşeme evrelerinde büyüyebilmekte ve sıkıştırma evrelerinde küçülebilmektedir (Chemat vd., 2011). Bu boyut değişkenliği gevşeme evresinde kabarcıkların gaz difüzyonu gerçekleştirmesiyle açıklanmaktadır. Ancak gaz difüzyonu gerçekleştiren bu kabarcıklar, gevşeme evresinde aldıkları tüm gazı sıkıştırma evresinde dışarı verememekte ve çökmektedirler (Vinatoru vd., 2017). Sıvı boyunca dağılmış olan bu kabarcıklar, kararsız hale gelene ve şiddetli bir şekilde çökene kadar birkaç döngü

periyodu boyunca kritik bir boyuta ulaşıncaya kadar büyümektedirler. Kavitasyon kabarcıklarının patlaması, sıcak noktalarda enerji birikimlerine yol açarak aşırı sıcaklıklar (5000 ˚K) ve basınçlar (1000 atm) üretmektedir (Şekil 2.3) (Soria ve Villamiel, 2010).



Şekil 2.3. Kativasyon kabarcıklarının oluşumu ve çökmesi (Vinatoru vd., 2017)

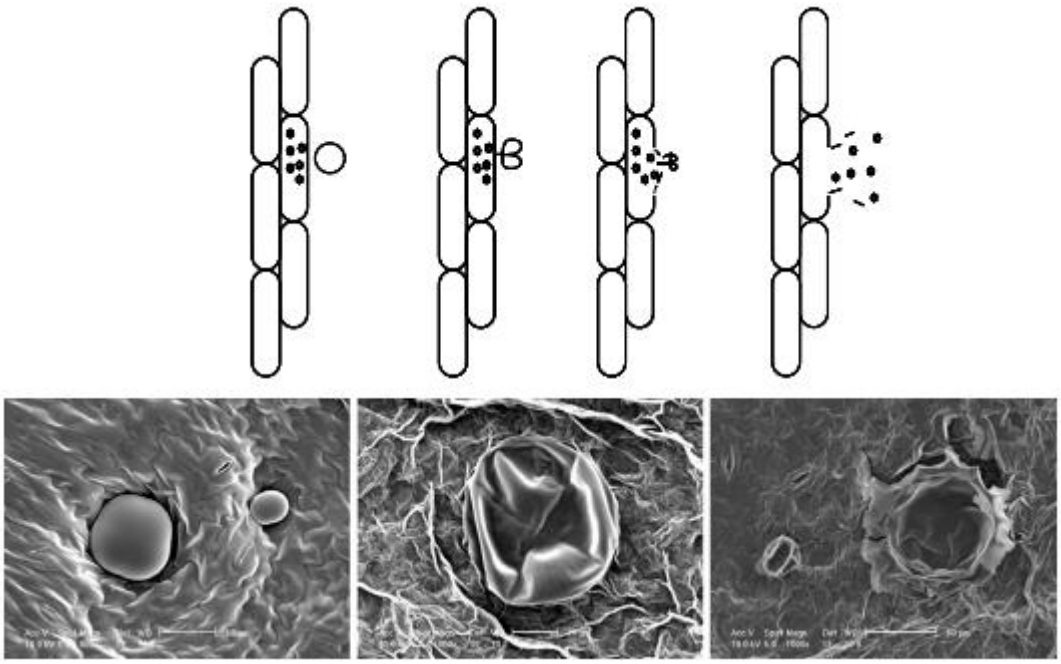
Akustik kavitasyon kabarcıklarının çökmesi yoluyla gerçekleştirilen etki mekanizması geleneksel yöntemlere göre iyileştirilmiş kütle transferi, hücre bozulması ve gelişmiş penetrasyon sağlamaktadır (Vinatoru vd., 2017).

Salınan yüksek basınç ve sıcaklık, kavitasyon kabarcıklarının yüzeylerine etki ederek katı yüzeye doğru yönlendirilmiş mikro jetler üretmektedir. Mikrojetler, gıda endüstrisinde bitkisel bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır (Chemat vd., 2011). Çok yüksek hızda parçacıklara çarpan jetlerin mekanik etkileri Şekil 2.4'te gösterilmektedir (Vinatoru vd., 2017). Oluşan mikrojetler ve bu sürece dahil olan yüksek basınç ve sıcaklık, bitki matrisinin hücre duvarlarını tahrip etmektedir. Gerçekleşen bu hasar, çözücünün bitki hücresine nüfus etmesine ve içeriğin ortama salınmasına yardımcı olmaktadır (Şekil 2.5) (Chemat vd., 2011). Bir diğer önemli etki

ise su moleküllerinin parçalanarak diğer moleküllerle reaksiyona girebilen ve bunları değiştirebilen yüksek oranda reaktif serbest radikaller ($H_2O \rightarrow H + {}^{\cdot}OH$) oluşturabilmesidir (Soria ve Villamiel, 2010). Ashokkumar vd. (2008) yaptıkları çalışmada ultrason kaynaklı oluşan radikallerin gıda materyallerinde hidroksilasyon derecesini artırarak flavonoidler gibi diğer bileşenlerin antioksidan aktivitesini artırabileceğini tespit etmiştir. Ek olarak ekstraksiyon işlemlerinde oluşan ${}^{\cdot}OH$ radikallerinin, askorbik asit ve etanol gibi seçici katkı maddelerinin eklenmesiyle söndürülebileceği belirtilmiştir.



Şekil 2.4. Parçacıklara çarpan jetlerin mekanik etkileri, çöken baloncukların (a) simetrik ve (b) asimetrik gösterimi ve (c) halka şeklinin çizimi (Vinatoru vd., 2017)



Şekil 2.5. Kavitasyon kabarcığı çökmesi ve bitki materyalinin serbest bırakılması (Chemat vd., 2011)

Kavitasyon derecesi başta uygulanan ultrason enerjisi (kWh/L cinsinden) ve yoğunluğu (W/cm^2 cinsinden) olmak üzere ortam viskozitesi, yüzey gerilimi, buhar basıncı, çözünmüş gazın doğası ve konsantrasyonu, katı parçacıkların varlığı, işlemin sıcaklığı ve basıncı gibi faktörlerden etkilenmektedir (Soria ve Villamiel, 2010).

Kullanılan çözücü düşük yüzey gerilimine sahip ise kavitasyon eşiğinde azalma meydana getirmektedir. Çözücü düşük buhar basıncına sahip ise kavitasyon oluşması zorlaşmaktadır (Ildırar, 2014).

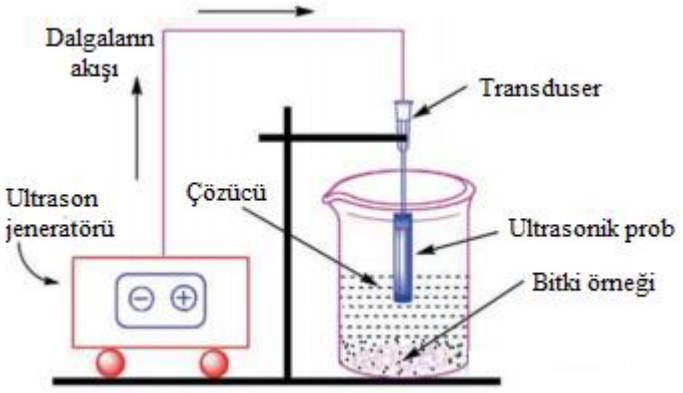
İşlem sırasında ortam sıcaklığının arttırılması buhar basıncının artması ve yüzey gerilim kuvvetinin düşmesiyle birlikte kolay kavitasyon oluşumu sağlamaktadır (Yıldız ve İzli, 2020). Fakat bu yöntemle arttırılan kavitasyonlar içerisine daha fazla çözücü buharı girmesi sebebiyle düşük şiddetli çökme sağlandığı belirtilmiştir. Arttırılan sıcaklık, çözücünün kaynama noktasına yaklaştığında ortamda kavitasyon kabarcığı sayısı hızla artmaktadır. Ancak bu yoğun artış ses iletimini engellemekte ve sıvı ortama etki eden ultrasonik enerjiyi azaltmaktadır (Ildırar, 2014).

Uygulanan ultrasonik frekans arttığında sıkıştırma fazı kısalmaktadır (Ildırar, 2014). Frekansın artmasıyla ultrasonun kavitasyon etkisi azalmakta ve reaktif madde oluşumu artmaktadır (Türkmen, 2012). Buna bağlı olarak kavitasyon miktarını sabit tutmak için sisteme daha fazla güçte ultrason dalgası gönderilmesi gerekmektedir (Ildırar, 2014). Uygulanan frekans düşük olduğunda kabarcıklar daha büyük boyutta oluşmakta ve çöktükleri zaman daha yüksek şiddette enerji oluşturmaktadır (Yıldız ve İzli, 2020).

Kavitasyon, tiksotropik sıvılarda viskozitede geçici bir azalmaya neden olan kaymaya neden olmaktadır. Ultrason yoğunluğuna bağlı olarak gıda vizkozitesi üzerindeki etki geçici veya kalıcı olmaktadır. Yeterli enerji uygulandığı takdirde moleküler ağırlık, kalıcı bir viskozite azalmasına neden olacak şekilde azaltılabilmektedir (Soria ve Villamiel, 2010). Ancak Bates vd. (2006) yaptıkları bir çalışmada ultrason işleminin, domates püresinde lif ağının daha yüksek nem almasına bağlı olarak viskozitenin arttığını tespit etmiştir. Ayrıca kavitasyon, birbiriyle karışmayan iki sıvının ara yüzeyine yakın bölgelerde çökebilmekte ve iki sıvının

birbiriyle karışmasını sağlamaktadır. Bu yöntemle çok ince ve kararlı emülsiyonlar elde edilebilmektedir (Soria ve Villamiel, 2010).

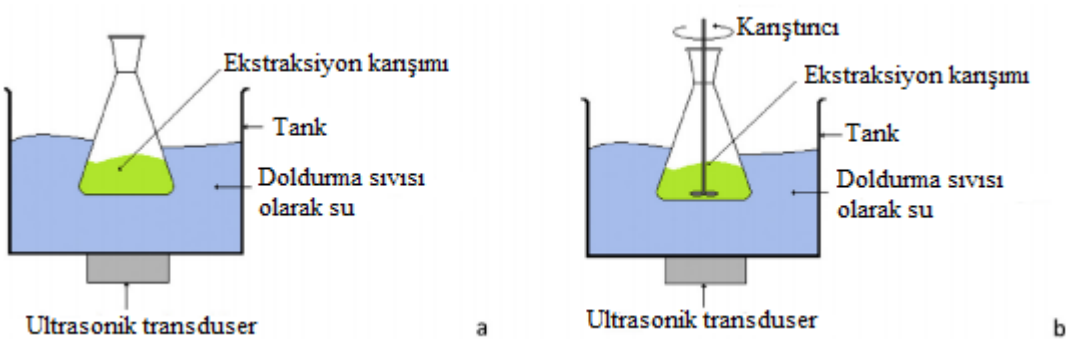
Ultrason sistemini oluşturan ana sistem bileşenleri jeneratör, transduser (dönüştürücü) ve ileticidir (Türkmen, 2012). Jeneratör, alternatif akımı transduserın kullanabileceği yüksek frekanslı alternatif akıma dönüştürmekte ve sistemde güç sağlayıcı olarak görev almaktadır. Transdusera aktarılan yüksek frekanslı elektirik akımı mekanik titreşimlere dönüştürülmektedir. İletici (prob), mekanik dalgaların ultrason dalgalarına dönüştürüldüğü ve tersinin yapıldığı sistem bileşenidir. Ekstrakte edilecek ortama ultrason dalgaları prob aracılığıyla yayılmaktadır (Ildırar, 2014) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Ultrason tekniğinin resimli temsili (Alara vd., 2021)

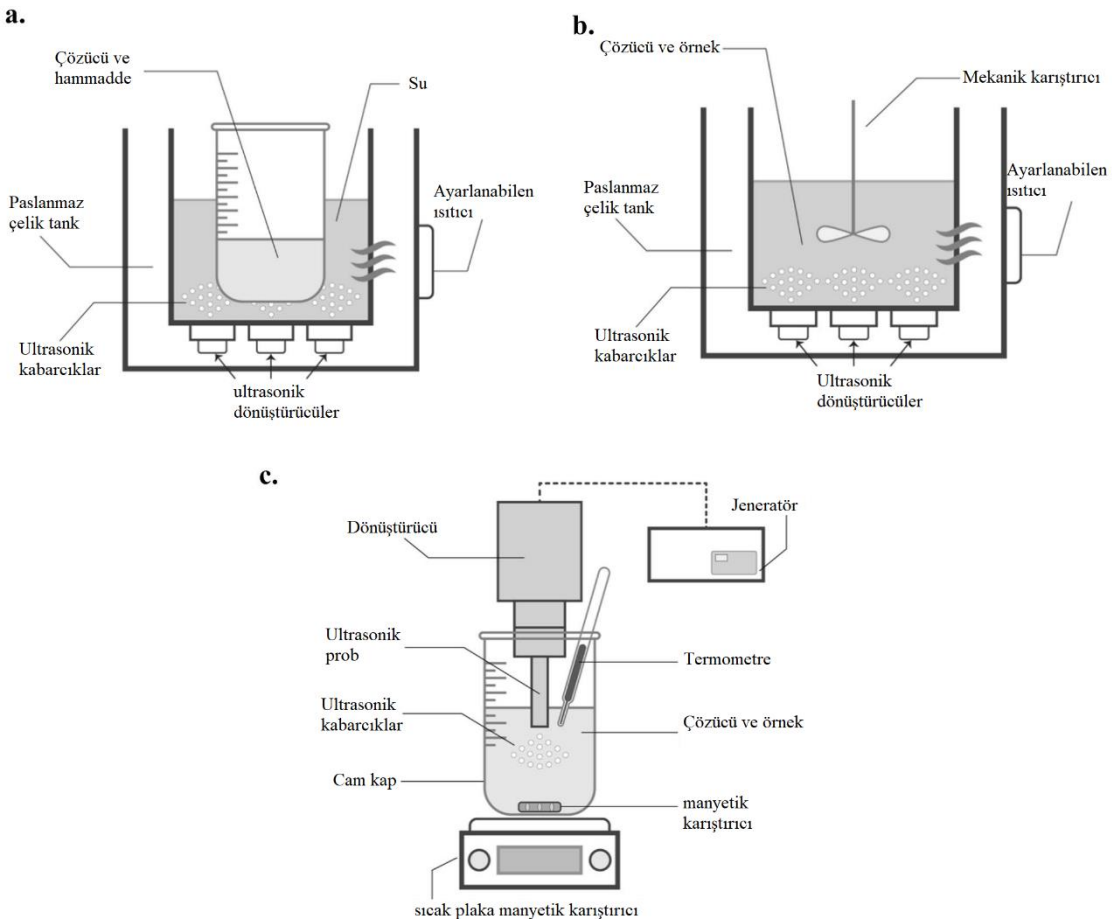
Laboratuvarda yaygın olarak ultrasonik banyolar ve ultrasonik prob olmak üzere iki farklı tip ultrason cihazı kullanılmaktadır (Alara vd., 2021). Ultrasonik banyolar, genellikle çözeltilerin gazlardan arındırılması ve küçük cam malzemelerin banyo içerisine daldırılarak yüzeylerinin temizlenmesi amacıyla kullanılmaktadır (Yıldız ve İzli, 2020). Bu cihazda transduser banyonun alt kısımında yer almaktadır. Bu nedenle ultrasonik banyolar "dolaylı sonikasyon" olarak adlandırılmaktadır. Alt kısımda tek transduser içeren banyolar tekrarlanabilir deneysel çalışmalar için ekstraksiyon kabının, banyonun merkezinde ve belirli bir derinlikte konumlandırılması açısından çok daha kullanışlıdır. Bitkisel materyalin şişe içerisinde her noktada ultrasonik kavitasyona maruz kalmasını arttırmak için karıştırıcı eklenebilmektedir (Şekil 2.7) (Vinatoru vd., 2017). Ancak bu banyoların kullanım şekline bağlı olarak iletilen ultrasonik dalga

yoğunluğu, banyoda bulunan su ve kap olarak kullanılan cam malzeme tarafından zayıflatılmaktadır. Bu nedenle kolay ve ekonomik olmasına rağmen kimyasal reaksiyonlar için nadiren kullanılmaktadır (Alara vd., 2021; Yıldız ve İzli, 2020).



Şekil 2.7. Dolaylı sonikasyon için tankta ekstraksiyon kabı konumlandırma. a: karıştırılmamış ekstraksiyon; b: karıştırılmış ekstraksiyon (Vinatoru vd., 2017)

Ultrasonik problar, ekstraksiyon karışımına daldırılarak ultrason dalgalarını doğrudan iletmektedir. Bu cihazda ultrason yoğunluğu daha küçük bir yüzeye aktarıldığından dolayı prob ucunda ultrasonik dalganın basınç genliği 10 atm'ye kadar yükselebilmektedir. Prob şeklindeki cihazın ultrasonik basınç genliği banyo şeklindeki cihazdan çok daha büyüktür. Ancak hacim arttıkça probun yaratacağı akustik genlik azalmaktadır. Bu nedenle ultrasonik problar, küçük hacimli uygulamalarda tercih edilmekte ve daha etkili sonuç vermektedir. Ancak maliyet olarak değerlendirildiğinde prob sistemler banyo tipi sistemlere göre daha pahalıdır (Ildırar, 2014; Yıldız ve İzli, 2020). Prob ve banyo tipi ultrason reaktörlerinde görülen ultrasonik dalganın akustik genliği ve kabarcık hareketleri Şekil 2.8'de gösterilmektedir.



Şekil 2.8. a) Dolaylı ekstraksiyon için ultrasonik temizleme banyosu b) Doğrudan ekstraksiyon için temizleme banyosu c) Doğrudan ekstraksiyon için ultrasonik prob (Martinez-Solano vd., 2021)

2.4.2. Ultrasonun Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları

Ultrason gıda endüstrisinde ekstraksiyon, pişirme, dondurma ve kristalizasyon, kurutma, asitlendirme ve marine işleminde kütle geçişini arttırma, gaz giderme, filtrasyon, kalıptan çıkarma işlemleri, köpük giderme, homojenizasyon ve emülsifikasyon, mikroorganizmaların inaktivasyonu, enzimlerin inaktivasyonu, nişasta depolimerizasyonu, oksidasyon, pastörizasyon ve kesme uygulamalarında kullanılmaktadır (Chemat vd., 2011).

Bazı gıda işleme uygulamalarında ultrason kullanımı sonuçları Çizelge 2.6'da gösterilmektedir.

Çizelge 2.6. Bazı gıda işleme uygulamalarında ultrasonun kullanımı

İşlem	Ürün	Ultrasonik Parametreler	Sonuç	Kaynak
Ultrason kurutma +infrared kurutma	Armut	24 kHz, 5 dk, %25, %50, %75 ve %100 genlik	Daha kısa sürede kurutma sağlanmıştır. Tekstür özellikleri gelişmiştir.	Jambrak vd., 2010
Pastörizasyon	portakal, limon, havuç, ıspanak suları	20 kHz, 15 dk.	Raf ömrü klasik pastörizasyona göre 18 gün artmıştır.	Khandpur ve Gogate, 2016
Dondurma	Dondurma	20 kHz, 20dk.	Dondurma süresi %35 azalmıştır.	Mortazavi vd., 2008
Peroksidaz İnaktivasyonu	Domates	23 kHz, 150s %50 güç ve 90s %75 güç	%100 peroksidaz inaktivasyonu sağlanmıştır.	Ercan vd., 2010
Emülsifikasyon	Su ve Yağ	20 kHz, 400 W, genlik 30µm, 21°C	40 nm'ye partikül boyutlarına sahip nanoemülsiyonların üretimi	Leong vd., 2009
E. coli K12 hücreleri inaktivasyonu	Elma Şarabı	20 kHz, 100 kPa, 59°C, 4 dk	5 log azalma sağlanmıştır.	Lee vd., 2013

2.4.3. Gıdalarda Bulunan Biyoaktif Bileşenlerin Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi İle Geri Kazanımı

Ultrason destekli ekstraksiyon, ısı ve kütle transferini hızlandırabilen ve ekstraksiyon alanında sıklıkla kullanılan, gelişmekte olan potansiyel bir teknolojidir. Ultrason dalgaları, örnek bitki materyalinin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmekte ve kavitasyon etkisi ile hücre duvarında bozunmalara yol açmaktadır (Chemat vd., 2011). Hücrenin parçalanması sonucu kullanılan solvent, ultrasonik

dalgaların mekanik etkisi sonucu hücre içerisine daha hızlı hareket etmekte ve sıvı ekstraktın hücre dışına daha kolay bir şekilde çıkmasını sağlamaktadır (Yıldız ve İzli, 2020). Tüm bu etkiler sayesinde artan kütle transferi, ekstraksiyon işlemini hızlandırmaktadır (Chemat vd., 2011).

Ultrason destekli ekstraksiyonda kullanılan hafif çalışma koşulları çoğu biyoaktif maddenin yapısal, moleküler özelliklerinde ve işlevselliğinde önemli bir değişiklik göstermemektedir. Bu özellik, ısıya duyarlı biyoaktif bileşenler söz konusu olduğunda çok büyük önem taşımaktadır (Soria ve Villamiel, 2010).

Yapılan araştırmalarda yeşil ve yenilikçi ekstraksiyon yöntemi olan ultrason destekli ekstraksiyon ve geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ekstraksiyon süresi ve verimi ele alınarak karşılaştırılmaktadır. Altemimi vd. (2015) yaptıkları çalışmada ıspanak yapraklarından geleneksel ekstraksiyon yöntemi ve ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle polifenolleri ekstrakte etmiş ve yöntemleri karşılaştırmıştır. En iyi ekstraksiyon çalışma koşullarında (37 kHz ultrason frekansı, ultrasonik güç %50, 30 dakikalık işlem süresi ve 40˚C işlem sıcaklığı) ortalama verim 64,88±21,84 mg/100 g, toplam fenolik madde 33,96±11,30 mg gallik asit/g kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyonun geleneksel ekstraksiyon yöntemine kıyasla daha uzun ekstraksiyon süresi ihtiyacını ortadan kaldırdığı ve az miktarda solvent kullanıldığı rapor edilmiştir. Yapılan çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında, araştırmacılar çeşitli bitki materyallerinden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için potansiyel bir yöntem olarak ultrason ekstraksiyonu tavsiye etmiştir.

Ultrason destekli ekstraksiyon ve geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırıldığı bazı çalışmalar Çizelge 2.7'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.7. Bazı ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) ve geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Ürün	Biyoaktif Bileşen	Ultrason Destekli Ekstraksiyon	Sonuç	Kaynak
Şeftali Posası	Fenolik madde	24 kHz, %100 genlikte, 10 dk Çözücü: %1 HCl içeren %80 metanol	Ultrason yöntemi kısa sürede daha fazla fenolik madde ayrımı gerçekleştirmiştir.	Baltacıoğlu vd., 2019
Melocan (*Smilax excelsa L.*) Bitkisi	Fenolik madde	38 kHz, %40 etanol, 30 dk	Ultrason yöntemi kısa sürede daha fazla fenolik madde ekstraksiyonu sağlamıştır.	Şahin, 2019
Folium eucommieae	Flavonoid	42% Etanol, 59 kHz, 55 °C, 70 dk	UDE, ısıtma, mikrodalga destekli ve enzim destekli ekstraksiyonlardan daha yüksek verimlilik sağlamıştır.	Huang vd., 2009
Portakal Kabuğu	Toplam Fenolik Bileşen	%45 etanol/su (h/h), 35 dk, genlik %90 (110 W) ve puls %100	UDE, kısa sürede ve düşük sıcaklıkta geleneksel ekstraksiyondan %60'a kadar daha yüksek bir artış sağlamıştır.	Rozola-Diaz vd., 2021
Empetrum nigrum	Toplam Polifenol	1,38 dk, 42,32 ◦C, %61,93 etanol	UDE, ekstraksiyon verimini geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre 1,29 kat arttırmıştır.	Gao vd., 2021

2.5. Optimizasyon

Ultrason destekli ekstraksiyonda uygulamanın etkinliği, kullanılan ultrason jeneratörü performansına (frekans, dalga boyu ve genlik), reaktör tasarımına (banyo ve prob), matriks parametrelerine (viskozite, konsantrasyon, katı/sıvı oranı ve parçacık boyutu), ekstraksiyon süreci parametrelerine (süre, basınç ve sıcaklık) ve ortam ile ilgili değişkenlere (çözünmüş gazın varlığı, dış basınç ve sıcaklık) bağlıdır (Şengül ve Topdaş, 2019). Süreci etkileyen bu tür değişkenlere bağımsız değişkenler denmektedir. Bağımsız değişkenlerin, belirlenen yanıtlar üzerindeki etkilerinin ortaya çıkarılması için optimizasyon uygulamaları önem taşımaktadır. Geleneksel optimizasyon uygulamalarında değişkenler tek tek ele alınır. Bu nedenle optimizasyon yanıtı sadece tek değişken üzerinden elde edilir. Ek olarak, değişkenlerin yanıtlar üzerindeki etkileri laboratuvar ortamında ayrı ayrı denenerek tespit edilmeye çalışılır, bu durum zaman alıcıdır ve hammadde, iş gücü, ekonomik kayıplara neden olur. Ayrıca, değişkenlerin bir başka değişken üzerinde uygulayacağı etkiler göz ardı edildiği için değişkenler arasındaki etkileşimler yok saymaktadır (Shekarchizadeh vd., 2009; Tunç vd., 2014). Bu nedenle günümüzde ele alınan süreçlerde bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, değişkenler arasındaki etkileşimlerin ortaya konulması ve sürecin modellenmesi ve optimizasyonu için istatistik temelli matematiksel modeller kullanılmaktadır. Bu modeller laboratuvar ölçekli çalışmalardan endüstriyel sistemlere geçişlerde kilit rol oynamaktadır.

2.5.1. Yanıt Yüzey Yöntemi

Çoklu bağımsız değişkenlerden etkilenen süreçlerin optimizasyonu ve modellenmesi için 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilen yanıt yüzey yöntemi (Response Surface Methodology, RSM) yaygın olarak kullanılan matematiksel ve istatistiksel bir araçtır (Shekarchizadeh vd., 2009). Bitkisel kaynaklardan ve bu kaynakların atıklarından biyoaktif ve antioksidan bileşenlerin ekstraksiyonu için ultrason destekli ekstraksiyon yönteminin uygulandığı çalışmalarda işlem parametrelerinin yaygın olarak RSM yöntemi ile optimize edildiği görülmektedir.

Atalay ve İnanç (2019) yaptıkları çalışmada, kırmızı biber (*Capsicum annuum L.)* çekirdeklerinden ultrason destekli ve geleneksel çözücü ekstraksiyon yöntemleri ile

fenolik bileşikleri ekstrakte etmişlerdir. Ultrason destekli ekstraksiyon, ultrasonik su banyosunda 330 W ultrasonik güçte ve 40 kHz frekansta gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı (40, 50, 60 °C), ekstraksiyon süresi (20, 40, 60 dk) ve çözücü hacmi (50, 75, 100 mL) aralığını içeren ultrason destekli ekstraksiyon koşullarını yanıt yüzey yönteminde Box-Behnken Dizayn kullanarak optimize etmişlerdir. Ultrason destekli ekstraksiyon için optimum koşullar 51˚C sıcaklık, 60 dk ekstraksiyon süresi ve 20 mL çözücü hacmi olarak tespit edilmiştir (336,30±3,15 mg GAE/100 g). Fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda ultrasonik destekli ekstraksiyonun geleneksel ekstraksiyon yöntemine göre daha etkili olduğu belirtilmiştir.

Milella vd. (2019) yaptıkları çalışmada üzüm (*Vitis vinifera L.*) kabuğundan ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle fenolik antioksidanları ekstrakte etmiş ve süreci yanıt yüzey yöntemine göre merkezi kompozit tasarım kullanarak optimize etmişlerdir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon, 40 kHz sabit frekans ve 200 W ultrasonik güce sahip dijital olarak kontrol edilen banyo tipi bir ultrasonik cihazda gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon parametreleri, etanol konsantrasyonu (%0, 20, 40, 60, 80, 100), sıcaklık (30, 40, 50, 60, 70, 80 ˚C) ve ekstraksiyon süresi (20, 40, 60, 80, 100, 120 dk) olarak belirlenmiştir. Optimum çalışma koşulları toplam fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu için %59,5 etanol, 113,6 dakika ve 66,8 °C, 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü aktivite için %57,1 etanol, 99,5 dakika ve 66,8 °C olarak tespit edilmiştir.

Espada-Bellido vd. (2017) yaptıkları çalışmada dut (*Morus nigra*) pulpundaki antosiyaninlerin ve toplam fenolik bileşenlerin ultrason destekli ekstraksiyonunu yanıt yüzey yöntemi ile optimize etmişlerdir. Dut pulpundan toplam antosiyaninler ve toplam fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, bir prob tipi ultrasonik sistem (200 W, 24 kHz) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminde Box-Behnken Dizayn tasarımına göre metanol bileşimi (%50–100), sıcaklık (10–70 ˚C), ultrason genliği (% 30–70), döngü (0,2–0,7 s), solvent pH'sı (3–7) ve solvent-katı oranı (10:1,5–20:1,5) için deneme deseni oluşturulmuştur. Optimum ekstraksiyon koşulları toplam monomerik antosiyanin miktarı için pH 3'te, %76 metanol, 48 ˚C ekstraksiyon sıcaklığı, %70 ultrason genliği, 0,7 s döngü ve 12:1,5 çözücü-katı oranı olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik bileşen miktarı için optimum UDE koşulları pH 7'de, %61 metanol, 64 ˚C

ekstraksiyon sıcaklığı, %70 ultrason genliği, 0.7 s döngü ve 11:1,5 çözücü-katı oranı olarak belirlenmiştir.

He vd. (2016) yaptıkları çalışmada yaban mersini şarap posasından (BWP) toplam antosiyaninlerin (TA) ve fenoliklerin (TP) ultrason destekli ekstraksiyonunu yanıt yüzey yöntemi kullanarak optimize etmişlerdir. UDE, prob tipi 400 W ultrasonik güce sahip ultrason cihazında farklı konsantrasyonlarda etanol (%70, v/v) ve hidroklorik asit (%0,01, v/v) çözücüleri ile gerçekleştirilmiştir. Box-Behnken Dizayn tasarımı için kullanılan bağımsız değişkenler sıcaklık (50, 60, 70 ˚C), ekstraksiyon süresi (15, 25, 35 dk) ve çözücü/katı oranı (15, 20, 25 mL/g) olarak belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları 61 ˚C ekstraksiyon sıcaklığı, 22:1 sıvı-katı oranı ve 30 dk ekstraksiyon süresi olarak belirtilmiştir. Optimum koşullarda 4,27 mg C3G/g BWP TA ve 16,41 mg GAE/g BWP TP bulunmuştur. UDE yöntemiyle elde edilen TA ve TP verimlerin, konvansiyonel çözücü ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen değerlerden (1,72 mg C3G/g BWP ve 5,08 mg GAE/g BWP) daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Zivkovic vd. (2019) yaptıkları çalışmada yanıt yüzeyi yöntemini kullanarak büyük kantaron olarak bilinen *Gentiana lutea* kökünden toplam polifenollerin UDE için en uygun koşullarını merkezi kompozit tasarıma göre optimize etmişlerdir. UDE, banyo tipi ultrason cihazında 35 W banyo gücünde ve 40 kHz frekansta yapılmıştır. Ekstraksiyon değişkenleri olarak ekstraksiyon süresinin (5-65 dk), etanol konsantrasyonunun (%10–90), katının solvente oranının (1:10–1:50) ve ekstraksiyon sıcaklığının (20–80 °C) etkisi araştırılmıştır. UDE sürecinin optimum koşulları 31 dk ekstraksiyon süresi, %49 etanol konsantrasyonu, 1:42 katı/sıvı oranı ve 80 °C ekstraksiyon sıcaklığı olarak tespit edilmiştir. Merkezi kompozit tasarıma göre optimum koşullar altında elde edilen toplam polifenollerin değeri 37,94 mg/g kuru ağırlıktır. Tespit edilen değer aynı koşullarda elde edilen analiz değerleri (36,55±0,31 mg/g kuru ağırlık) ile uygun olarak raporlanmıştır.

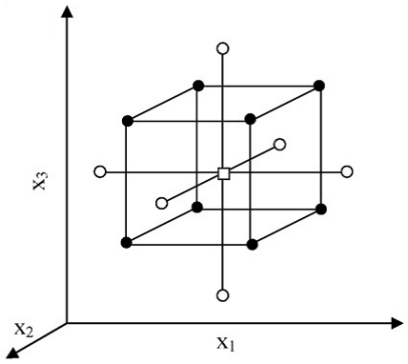
2.5.1.1. Merkezi Kompozit Tasarım

RSM uygulamasındaki işlem basamakları (1) araştırmanın amacına ve araştırmacının deneyimine göre tarama çalışmaları yapılması ve deney bölgesinin sınırlandırılması yoluyla sistem üzerindeki ana etkilerin belirlenmesi ve bağımsız

değişkenlerinin seçilmesi, (2) deneme desenlerinin oluşturulması ve deneylerin bu tasarımlara göre gerçekleştirilmesi, (3) elde edilen deneysel verilerin bir polinom fonksiyonu üzerinden matematiksel olarak hesaplanması, (4) modelin uygunluğunun değerlendirilmesi, (5) istenebilirliğin doğrulanması, (6) çalışılan her değişken için en uygun değerlerin elde edilmesi şeklinde sıralanabilir (Bezerra vd., 2008).

RSM uygulamasında süreci etkileyen bağımsız değişkenlerin optimizasyonu ve yüksek doğrulukta sonuçların elde edilmesi için en önemli işlem basamağı deneme desenlerinin oluşturulmasıdır. Deneme desenlerinin tasarımında Box-Behnken dizayn (BBD), merkezi kompozit tasarım (CCD) ve fraksiyonel faktöriyel tasarım (FFD) gibi farklı RSM tasarım yöntemlerinin yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tasarımlar arasında CCD tasarımı ile elde edilen deney setinin daha verimli olduğu ve daha kısa sürede tamamlandığı savunulmaktadır (Chen vd., 2015). Ek olarak CCD tasarımının verilen veri kümesindeki yanıtların doğrusal olmama durumunu tahmin etmesi, elde edilen sürekli yanıtlardaki eğriliği tahmin etmeye yardımcı olması ve minimum deneysel denemede maksimum bilgi vermesi nedeniyle sıklıkla tercih edildiği bildirilmektedir (Bhattacharya 2021).

Merkezi kompozit tasarım, faktör sayısına göre farklı noktalarda çalışma imkanı sunan ve deneme tasarımını buna göre oluşturan bir tasarımdır. Örnek olarak, üç faktörlü bir deneme için küpün merkezinde bir merkez nokta etrafında 2^3=8 adet faktöriyel noktası ve işlem aralığını belirleyen 2*3=6 adet yıldız noktası ile çalışma imkânı sunan bir tasarım ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.9) (Bezerra vd., 2008).



Şekil 2.9. Merkez nokta (□), faktöriyel noktaları (●) ve yıldız noktalarını (○) içeren 3 faktörlü bir deneme için oluşturulan merkezi kompozit tasarım (Bezerra vd., 2008)

Merkezi kompozit tasarımda yapılacak deney sayısı Eşitlik 2.1'de verilen denklem kullanılarak hesaplanmaktadır (Yıldız, 2019).

$$N=2^k+2k+n_0 \quad (2.1)$$

Denklemde k faktör sayısını, n_0 merkezde tekrarlanacak deney sayısını belirtmektedir. Bu şekilde, 3 faktörlü bir deneme için, $N=2^3+2*3+6 =20$ adet deney yapılması gerekecektir.

CCD'de faktörler minimum, orta ve maksimum olmak üzere en az üç düzeyde test edilirler ve (-1), (0) ve (1) olarak kodlanırlar. Merkez noktası, (+1) ve (-1) seviyelerinin ortalamaları alınarak bulunan ve 0 seviyesinde gösterilen noktadır. Deneysel tasarımda merkez noktalar hataları tespit etmek kullanılır (Özçelik, 2013; Yıldız, 2019). Faktöriyel noktalar (+1 ve -1), bir faktörün + (maksimum) ya da – (minimum) seviyelerinden oluşmaktadır. Faktöriyel noktalar tasarımdaki doğrusal terimlerin ve iki yönlü etkileşimlerin katsayılarını tahmin etmek için kullanılmaktadır (Dutka vd. 2015). Yıldız noktalar, belirlenen iki seviye noktalarının daha ötesinde olan +α ve -α değerleridir. α değeri, merkezi komposit tasarımı diğer tasarım yöntemlerinden ayıran en önemli özelliktir ve merkezi kompozit tasarımda her bir yıldız noktasının merkezden olan uzaklığının bir göstergesidir. α'nın 1'den küçük değer alması yıldız noktaların küpün içinde, 1'den büyük değer alması ise yıldız noktaların küpün dışında olduğunu belirtmektedir. Yıldız noktaları ikinci dereceden terimlerin katsayılarını

tahmin etmek için kullanılmaktadır (Dutka vd. 2015). Yıldız noktaları belirlenen faktör sayısına göre farklı sayıda uygulanmakta ve Eşitlik 2.2'de belirtilen denklem aracılığıyla hesaplanmaktadır. Eşitlik 2.2'de k faktör sayısını belirtmektedir ve 3 değişkenli bir deneme için α=1,682 olarak hesaplanmaktadır.

$$\pm \alpha = \sqrt[4]{2^k} \tag{2.2}$$

Yıldız noktalar, belirlenen seviyelerden daha düşük ve daha yüksek olmak üzere fazladan iki seviyeyi daha deney sürecine ekleyerek optimizasyonun 5 seviyede değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bunlar sırasıyla; aşırı yüksek yıldız noktası, yüksek faktöriyel nokta, merkez nokta, düşük faktöriyel nokta ve aşırı düşük yıldız noktasıdır. Bu durum optimizasyonun doğruluğunu arttırmaktadır (Yıldırım, 2019, Bhattacharya 2021). Üç faktörlü ve beş seviyeli deney tasarımı için faktörleri ve faktör seviyeleri Çizelge 2.8'de verilmektedir. Aynı deney tasarımı için gerçekleştirilmesi gereken deneme deseni Çizelge 2.9'da sunulmuştur (Bhattacharya 2021).

Çizelge 2.8. Deney tasarımında kullanılan faktörler ve değişken seviyeleri

Faktörler	**Seviyeler**				
Faktör 1 (X_1)	-α	-1	0	+1	+α
Faktör 2 (X_2)	-α	-1	0	+1	+α
Faktör 3 (X_3)	-α	-1	0	+1	+α

Çizelge 2.9. 3 faktörlü deneme için CCD deney tasarımı

Sıra		Faktör 1 (X_1)	Faktör 2 (X_2)	Faktör 3 (X_3)
1	Faktöriyel noktalara ait denemeler 2^3=8	-1	-1	-1
2		1	-1	-1
3		-1	1	-1
4		1	1	-1
5		-1	-1	1
6		1	-1	1
7		-1	1	1
8		1	1	1
9	Yıldız noktalara ait denemeler 2*3=6	-1,682	0	0
10		1,682	0	0
11		0	-1,682	0
12		0	1,682	0
13		0	0	-1,682
14		0	0	1,682
15	Merkez noktasına ait denemeler 6	0	0	0
16		0	0	0
17		0	0	0
18		0	0	0
19		0	0	0
20		0	0	0

2.5.2. Model Oluşturma ve Modelin Değerlendirilmesi

Optimizasyon tasarımında belirlenen her bir faktörün optimizasyon sonucuna etkisi matematiksel modelleme ile ifade edilebilmektedir. Böylece matematiksel modelde değerler hesaplanarak tahmini sonuç elde edilebilmekte ve deney sonuçlarıyla karşılaştırılabilmektedir (Özçelik, 2013).

İstatiksel deneysel tasarımdan elde edilen veriler çoklu lineer regresyon analizinde ampirik ikinci dereceden bir polinom denklemine yerleştirilerek hesaplanmaktadır (Eşitlik 2.3).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \cdots + \beta_k X_k + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \cdots + \beta_{k-1,k} X_{k-1} X_k + \beta_{11} X_1^2 + \cdots + \beta_{kk} X_k^2 + \varepsilon \quad (2.3)$$

Bu denklemde, Y = bağımlı değişkenler veya sonuç değişkenleri ya da tahmin edilen cevapları, X_1 = bağımsız değişkenleri, β_0 = genel ortalama yanıtları veya kesişim sabitini, β_1 = regresyon modeli katsayılarını, k = bağımsız değişken sayısını, ε = deneysel hatayı ifade etmektedir. X_1 …. X_k doğrusal etkileri, X_1X_2, X_1X_3 …. X_{k-1}, X_k doğrusal etkiler arasındaki etkileşimi ve X_1^2….X_k^2 ise ikinci dereceden etkileri ifade etmektedir (Bhattacharya 2021). Ancak RSM yönteminde gıda süreçlerini optimize etmek için kullanılan model her zaman ikinci dereceden olmayabilir. Tepki üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olan regresyon katsayıları denklemde dikkate alınmalıdır. Bu nedenle, ikinci dereceden terimler istatistiksel olarak anlamlı değilse, bu katsayılar kaldırılır ve denklem lineer hale getirilir (Yolmeh vd., 2017).

Deneysel sonuçların, özellikle ikinci dereceden regresyon polinom denklemine uydurulmuş, türetilmiş model denkleminin önemi, regresyon modelinin uyum iyiliğini ve modeli etkileyen her parametrenin önemi ve anlamı varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirilmektedir. ANOVA, faktörlerin belirli bir güven aralığında (%95 ya da %99) istatiksel olarak anlamlı veya anlamsız olduğunu belirlemek için kullanılmaktadır (Said vd., 2015). Tespit edilen model katsayılarının anlamlılıklarının %95 güven aralığında yani %5'ten düşük olması ($P<0.05$) istenmektedir. Merkez noktaların tekrarlanarak hesaplanması ile belirlenen uyum eksikliğinin (lack of fit) %5'ten büyük olması ($P>0.05$) değerin istatistiksel olarak anlamsız olduğunu ve hatanın önemsiz olduğunu belirtmektedir.

Modelin uygunluğunun değerlendirilmesinde 0 ile 1 arasında değer alan determinasyon katsayısına (R^2) dikkat edilmektedir. R^2'nin 1'e yakın olması modelin gerçek verilerle uyum sağlayabileceğini belirtmektedir (Sin vd., 2006). İyi bir model uyumu için R^2'nin en az 0,80 olması gerektiği öne sürülmüştür (Joglekar ve May, 1987). Modele yeni bir bağımlı değişken eklendiğinde R^2'de sapmalar meydana gelmesi ve zayıf tahmin elde edilmesine neden olacağından dolayı düzeltilmiş R^2 değerinin dikkate alınması tavsiye edilmektedir. Modelin anlamlı kabul edilebilmesi için tahminlenen R^2 ve düzeltilmiş R^2 arasındaki farkın 0,2'den daha az olması istenmektedir (Myers vd., 2009).

Modeli değerlendirmek için kullanılan başka bir faktör ise F-değeridir. F-değerinin model uygunsuzluğu için önemsiz ve regresyon modeli için önemli olması

yeterli görülmektedir. Ancak daha iyi bir tahminleme açısından "yeterli hassasiyet (Adequate Precision)" istatistiği yapılmaktadır. Yeterli hassasiyet katsayısı modelin sinyal/gürültü oranının ölçülmesiyle hesaplanır ve 4'ten daha büyük bir değer olması beklenir (Eren, 2004).

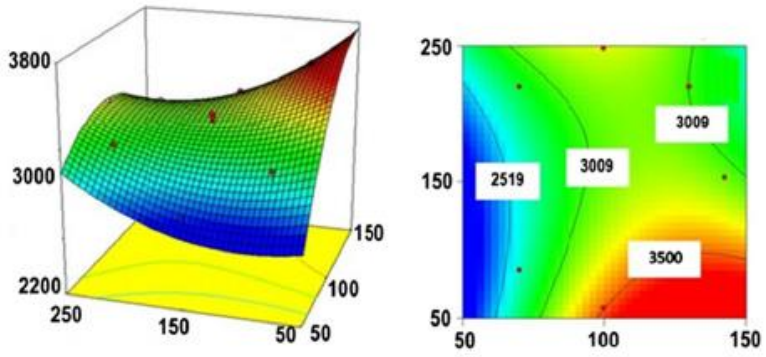
Varyasyon katsayısı (CV, %), standart sapmanın ortalamaya göre yüzdesi olarak tanımlanır. Modelin yeterli olması için genel olarak %10'dan daha düşük olması istenirken, CV değerlerinin %5'ten küçük olması modelin deneysel değerleri yüksek oranda tahmin ettiğini ve incelenen sistemlerin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir (Espada-Bellido vd., 2017).

Modelin değerlendirilmesinde model üzerinden hesaplanan değerler ve belirlenen değerler arasındaki fark (artıklar) oldukça önemlidir. Deneysel verilere uygun iyi bir matematiksel model için bu indeksin düşük bir değer alması gereklidir (Yolmeh vd., 2017). Artık grafiklerinin görsel incelemesi de model uygunluğu hakkında değerli bilgiler vermektedir. Tahminlenen, uyumu yapılmış verilere karşı artık grafiklerinin ve gerçek verilere karşı artık grafiklerinin %95 güven aralığında dağınık şekilde konumlanması beklenmektedir. Bu nedenle, eğer matematiksel model iyi uyarlanmışsa, artık grafiği normal bir dağılım öneren bir davranış sunacaktır. Model daha büyük artıklar üretiyorsa, çalışılan deney alanındaki veri davranışı hakkında kesin çıkarımlar yapmak doğru değildir. Ayrıca, modelin başka bir terime ihtiyacı varsa, artık grafiği modele eklenmesi gereken terimin türünü gösteren bir davranış sunacaktır (Bezerra vd., 2015).

Hataları ölçeklendirmek için kullanılan bir diğer yöntem, tahminlenmiş artık hata karelerinin toplamının (PRESS istatistiği) hesaplanmasıdır. PRESS istatistiği, bir tahmin veri seti olarak n-1 gözlemlerinin olası her alt kümesini kullanır ve her gözlem sırayla bir tahmin veri seti oluşturmak için kullanılır. PRESS'i hesaplamak için ilk olarak bir gözlem seçilir, daha sonra regresyon modeli kalan n-1 gözlemlere uygun hale getirilir ve saklanan gözlem y_i'yi tahmin etmek için bu denklem kullanılır. Bu tahmin edilen değer $\hat{y}_{(i)}$ ile ifade edilirse, i noktası için tahmin hatası $e_{(i)}= y_i - \hat{y}_{(i)}$ olarak bulunabilir. Bulunan tahmin hatasına genel olarak PRESS kalıntısı olarak tanımlanır (Myers vd., 2009).

Kısacası, bir model anlamlı olarak tanımlanıyorsa ve anlamlı olmayan bir uyum eksikliği gösteriyorsa, deneysel verilere iyi bir şekilde uyacaktır. Başka bir deyişle, varyasyon gözleminin büyük kısmı regresyon denklemi ile tanımlanacak ve varyasyonun geri kalan kısmı kesinlikle artıklardan kaynaklanacaktır. Artıklarla ilgili varyasyonların çoğu, model kalitesiyle doğrudan ilgili olan uyum eksikliğinden değil, saf hatadan (ölçümlerin rastgele dalgalanması) kaynaklanmaktadır (Bezerra vd., 2015; Cornell, 1990).

Optimizasyon sürecinde bağımsız değişkenlerin sonuçlar üzerindeki etkileriyle elde edilen yanıt yüzey grafikleri (izohips ve maksimum noktada üç boyutlu yüzey yanıt grafiği) optimum koşulların görselleştirilerek yorumlanmasını sağlamaktadır (Myers vd., 2009). Yanıt konturu ve yüzey çizimleri, bağımsız değişkenlerin değişimi ile yanıtta elde edilen değişiklikleri tanımlamak için kullanılmaktadır. Kontur grafiği, sabit bağımlı değişken aralıklarının bağımsız değişkenler düzleminde çizildiği yüzey grafiğinin iki boyutlu gösterimidir. Hedef nokta (minimum, maksimum veya eyer nokta) sistemin merkezinde (deneysel bölge) bulunduğundan, kontur grafikleri bir daire veya elips şeklinde olmaktadır. Hedef nokta ne maksimum ne de minimum nokta olduğunda, kontur grafikleri parabolik veya hiperbolik sistem konturlarını göstermektedir. Bu grafiklerin, gerçek yanıtları değil tahmini yanıtların görselleştirmesini sağladığına dikkat edilmelidir (Yolmeh vd., 2017). Örnek model denklemi için tahmin edilen yanıt yüzeyi (sol) ve kontur (sağ) çizimleri Şekil 2.10'daki gibidir.



Şekil 2.10. Tahmin edilen örnek model denkleminin yanıt yüzeyi (sol) ve kontur (sağ) çizimleri (Yolmeh vd., 2017)

2.5.3. Optimizasyonun Yapılması ve Değerlendirilmesi

Optimizasyonun yapılabilmesi ve en yüksek yanıt değerlerini veren optimum değişken koşulları elde edebilmek için, istatistiksel yazılım programında (Desing Expert) ilk olarak her bir faktör için faktörlerin değer aralıkları seçilmelidir. Çalışılan faktör seviyeleri hedeflenen aralıkta işaretlendikten sonra, her bir yanıt için önem düzeyi (1-5) seçilir. Bu seçimler temel alınarak her bir yanıt için bağımsız değişkenlerin optimum değerleri program tarafından verilir.

Program tarafından verilen optimum değişken verilerinin değerlendirilmesinde istenebilirlik (desirability) fonksiyonu yaklaşımı kullanılmaktadır. İstenebilirlik katsayı 1-0 arasında değişken bir değer almaktadır. İstenebilirlik katsayısı yanıtlar hedeflenen değere yaklaştıkça 1'e, uzaklaştıkça 0'a yaklaşır. İstenebilirlik katsayısı her yanıt için hesaplanır ve geometrik ortalamaları alınarak tüm süreç için ortak bir değer elde edilir. Lazić, (2004) için istenebilirlik katsayısına göre standart tahminleme Çizelge 2.10'da verildiği gibi değerlendirilmektedir.

Çizelge 2.10. İstenebilirlik katsayısına göre standart tahminleme değerlendirme skalası

İstenebilirlik Katsayısı	Değerlendirme
1,00	Mükemmel
1-0,80	Çok İyi
0,8-0,63	İyi
0,63-0,37	Yeterli
0,37-0,20	Kötü
0,20-0,00	Çok Kötü

İstenebilirlik katsayısı en yüksek olan değişken değerler yanıtların tahminlenmesi için optimum değerler olarak kullanılır. Son olarak, belirlenen optimum

değerlerde analizler tekrar edilerek, tahminlenen ve deneysel yanıtlar arasındaki uyum incelenir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

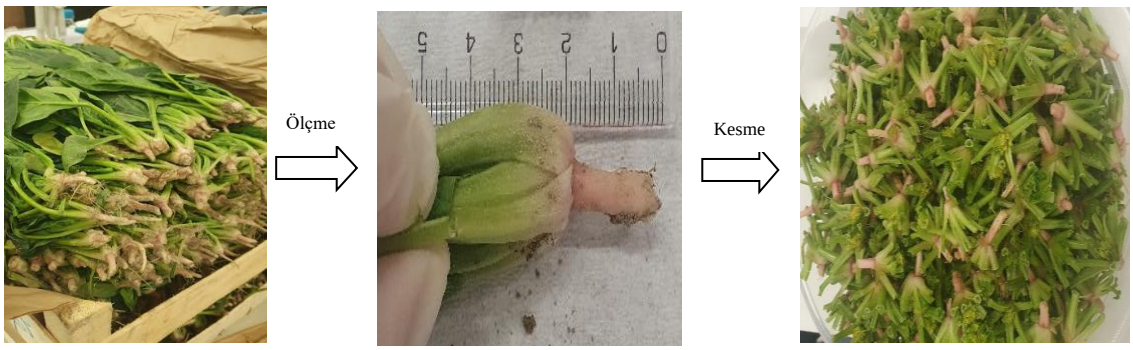
3.1. MATERYAL

3.1.1. Ispanak

Ispanak örnekleri 2021 yılı Kasım ayında Edirne ilinde yerel bir marketten toplamda 20 kg ıspanak olmak üzere temin edilmiştir.

3.1.2. Ispanak Kökü

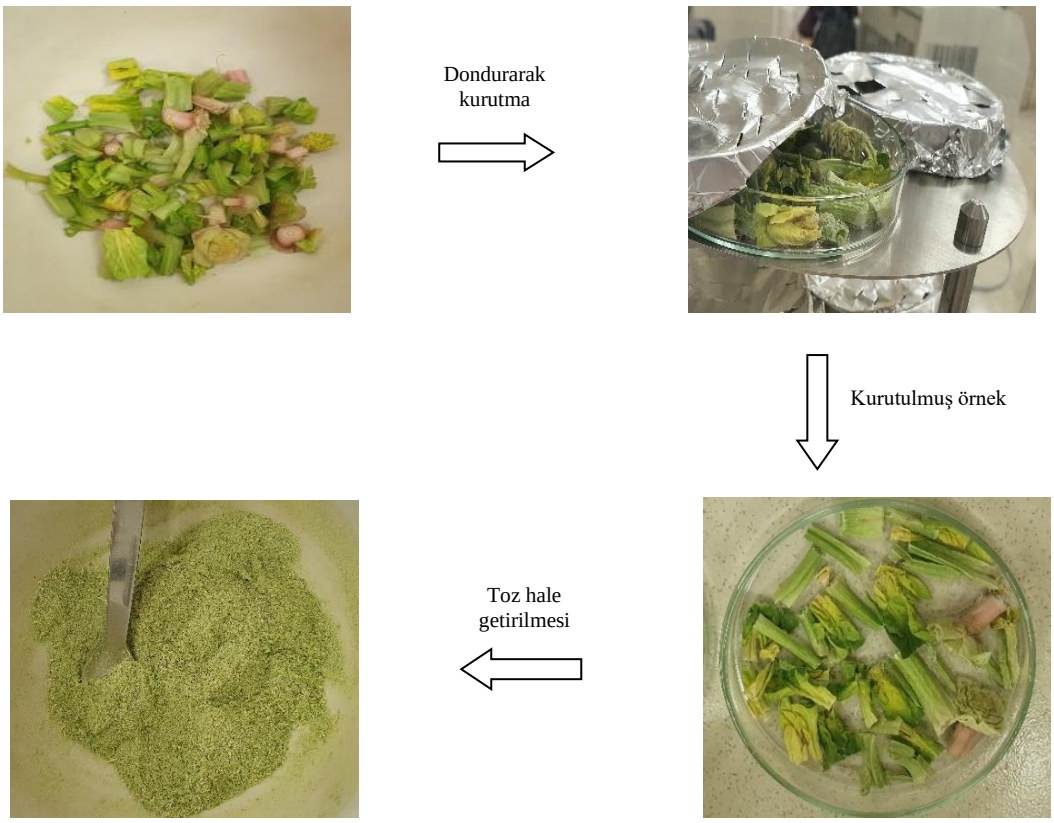
Ispanak kökleri başlangıç noktası kök ucu olmak üzere 4 cm kesilerek ıspanak bitkisinden ayrılmıştır. Hazırlanan ıspanak kökleri yıkanmış ve fazla suları alınmıştır. Temin edilen 20 kg ıspanaktan toplamda 3,80 kg kök elde edilmiştir. Elde edilen kökler daha küçük parçalara ayrılmış ve polietilen torbalara doldurularak -18 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Ispanak köklerinin elde edilmesi

3.1.3. Örneğin Hazırlanması

Ispanak kökleri -18 °C'de en az 24 saat muhafaza edilerek ön dondurma işlemi uygulanmıştır. Dondurarak kurutma işlemi laboratuvar ölçekli liyofilizatör (Alpha 1-2 LDplus, Petershütte, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle liyofilizatörde -40 °C ve 0,12 mbar basınçta 24 saat ana kurutma işlemi (main drying) yapılmış daha sonra aynı değerlerde en az 12 saat son kurutma işlemi (final drying) gerçekleştirilmiştir. Ispanak kökleri %6±0,28 neme kadar kurutulmuştur. İşlem bitiminde cihazdan alınan kurutulmuş örnekler havanda ezilmiş ve 1 mm gözenek aralığına sahip elekten geçirilerek toz haline getirilmiştir. İşleme tabi tutulan taze ıspanak köklerinden toplamda %12,08 dondurularak kurutulmuş ıspanak kökü tozu elde edilmiştir. Toz numuneler yüksek yoğunluklu polietilen kaplarda +4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Ispanak köklerinin dondurularak kurutulması ve toz haline getirilmesi

3.1.4. Kullanılan Kimyasallar

2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonik asit) (ABTS), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2 karboik asit (Trolox), fenolik madde standartları (gallik asit, (+)- kateşin), Folin-Ciocalteau reaktifi, sodyum karbonat, potasyum persülfat, sodyum nitrit, alüminyum klorür, sodyum hidroksit Sigma (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Etanol (%96 Etil alkol+2-Propanol karışımı Teksoll) Tekkim (İstanbul, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Tüm analizlerde PURELAB Option-Q (ELGA LabWater, Lane End, İngiltere) cihazından alınan ultra saf su (iletkenliği < 0,5 µS/cm) kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Karakterizasyon Analizleri

3.2.1.1. pH Analizi

Taze ıspanak kökleri havanda ezilerek beher içerisine aktarılmış ve analiz pH metre (Mettler-Toledo SG-2 SevenGo, Greifensee, İsviçre) ile yapılmıştır.

3.2.1.2. Suda Çözünür Kuru Madde Analizi

Taze ıspanak kökleri havanda ezilerek örnekler homojen hale getirilmiş ve örneklerin suda çözünür kuru madde miktarı 20±1 °C'de dijital el refraktometresi (Isolab, İstanbul, Türkiye) kullanılarak belirlenmiş ve ºBriks olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.3. Toplam Kuru Madde Analizi

Taze ıspanak kökü örneklerinin toplam kuru madde miktarı etüvde kurutma yöntemine göre gravimetrik yolla belirlenmiştir. Sabit tartıma getirilmiş kuru madde kaplarına alınan 3 g taze ıspanak kökleri etüvde (Memmert, Schwabach, Almanya) 103±2 ºC'de sabit tartıma gelinceye kadar kurutulmuştur. İlk ve son tartımlar arası farktan örneğe ait toplam kuru madde miktarı yüzde olarak hesaplanmıştır (AOAC, 1990, metot 926.08).

3.2.1.4. Toplam Kül Analizi

Taze ıspanak kökü örneklerinin toplam kül miktarı fırında yakma yöntemine göre gravimetrik yolla belirlenmiştir. Sabit tartıma getirilmiş porselen krozelere 0,5 g dondurularak kurutulmuş ve toz haline getirilmiş ıspanak kökü örneği tartılmıştır. Örnekler 550 °C'de kül fırınında (Protherm PLF 120/7, Labomar, Maltepe, Türkiye) bütün içerik karbon içermeyen beyaz bir kül oluşacak şekilde yakılmıştır. İlk ve son tartımlar arası farktan örneğe ait toplam kül miktarı yüzde olarak hesaplanmıştır (AOAC,1990 metot 920.100).

3.2.1.5. ICP-MS ile Mineral Kompozisyonu Analizi

Mineral madde anelizleri Bayram vd. (1990) tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ispanak kökünün mineral bileşimi, indüktif olarak eşleştirilmiş plazma kütle spektrometrisi (ICP-MS) Agilent 7800 sistemi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) ile ölçülmüştür. Yaklaşık 0,5 g'lık ıspanak numunesi Teflon yakma kabına alınarak 9 ml HNO_3 ve 1 ml H_2O_2 ilave edilmiştir. Karışım, mikrodalga destekli bir yakma sisteminde (Ethos, Milestone, İtalya) yakılmıştır. Enstrümantal parametreler 200 °C'ye ulaşmak için 15 dakikalık bir arttırımla uygulanmıştır ve daha sonra sistem 15 dakika boyunca 1000 W'da tutulmuştur. Özütler bir Whatman No 1 filtre kâğıdı ile filtrelenmiş ve 50 ml'de deiyonize su ile seyreltilmiştir. Daha sonra ICP-MS cihazı ile analiz edilmiştir. Sonuçlar mg/kg LF olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.6. Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS ile Belirlenmesi

Fenolik bileşiklerin belirlenmesi için uygulanan analiz Bayram vd. (1990) tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ispanak kökünün fenolik bileşimi, elektrosprey iyonizasyon (ESI) arayüzü (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ABD) ile donatılmış üçlü dörtlü kütle spektrometreli sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) Agilent 6460 sistemi ile belirlenmiştir.

Analiz işleminde öncelikle sertifikalı standart bileşikler 5-100 mg/ml konsantrasyonları arasında 5 noktada hazırlanmış ve kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu yöntemde bileşiklerin kromotogramda belirli zaman aralığında çıkması, ana iyon ve doğrulama iyonlarının oranları, matriks spikedan elde edilen parçalanmış iyonların oranları ile karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen piklerin alanı eklenen standardın numunedeki konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek yüksek hassasiyette ve doğrulukta madde tayini yapılmıştır. Analiz öncesi numuneden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için hem şeker içeren hem de bazik fenolik bileşiklerin analizinde hidroliz ve hidroliz olmayan ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Hidroliz olmayan ekstraksiyon yönteminde 100 mg numune üzerine 1 ml ekstraksiyon solüsyonu (%79 ultra saf su + %20 metanol + %1 formik asit) ilave edilmiş ve 30 sn. vorteks uygulanmıştır. 45 °C'de ultrasonik banyoda 10 dk bekletilmiştir. Numuneler 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve enjeksiyon için berrak süzüntü cam viallere alınmıştır.

Asidik hidroliz ekstraksiyon yönteminde ise 100 mg numune üzerine 2 M HCl çözeltisinden 500 µl ilave edilmiştir ve 30 sn. vorteks uygulanmıştır. 90 °C'de ultrasonik banyoda 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra 500 µl ekstraksiyon solüsyonu (%79 ultra saf su + %20 metanol + %1 formik asit) ilave edilmiştir. Numuneler 9000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve enjeksiyon için berrak süzüntü cam viallere alınmıştır.

Kullanılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kütle spektrometresi (MS) parametreleri Çizelge 3.1'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Sonuçlar mg/kg LF olarak ifade edilmiştir.

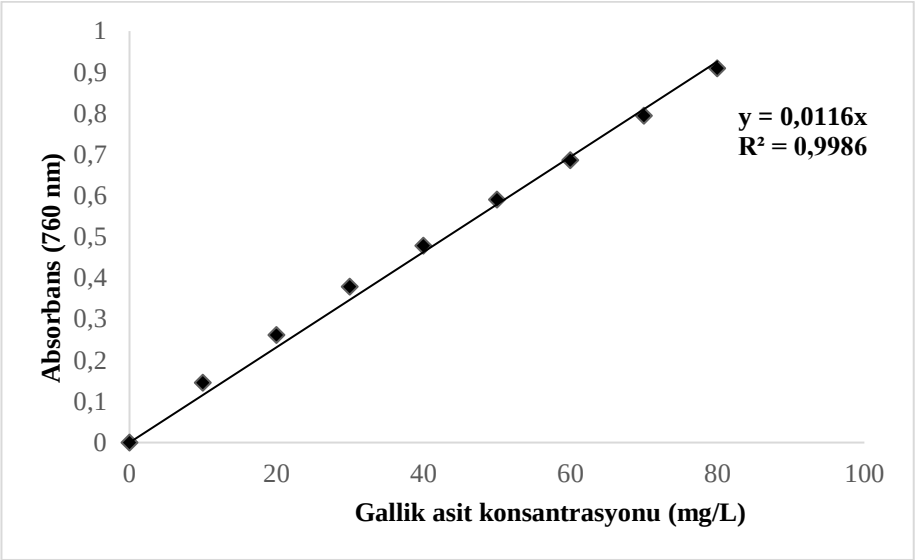
Çizelge 3.1. Fenolik bileşenlerin analiz parametreleri

HPLC Parametreleri		MS Parametreleri	
Kolon	Agilent Zorbax SB-C8 150 mm × 3,0 mm, 3,5 µm	**İyonizasyon modu**	Elektrosprey iyonizasyonu (Negatif)
Mobil faz A	0,005 mol/L amonyum asetat	**Gaz sıcaklığı**	300 °C
Mobil faz B	Asetonitril-metanol (1:1 v/v) içinde %0,1 Asetik asit	**Gaz akışı**	10 L/dak
Otomatik örnekleyici sıcaklığı	4 °C	**Nebülizör**	275790,29 Pa
Akış hızı	0,7 ml/dk	**Kılıf gazı sıcaklığı**	400 °C
Kolon sıcaklığı	35 °C	**Kılıf gaz akışı**	10 L/dak
Enjeksiyon hacmi	10 µl	**Kılcal gerilim**	3500 V
Toplam çalışma süresi	12 dk	**Uç gerilimi**	0 V
		Tarama Türü	Dinamik çoklu reaksiyon izleme

3.2.1.7. Toplam Fenolik Madde Analizi

Toplam fenolik madde analizleri Spanos vd. (1990) tarafından önerilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem, örnekteki fenolik maddelerin Folin-Ciocalteu çözeltisinin fosfomolibik-fosfotungustik çözeltisini indirgeyerek mavi renkli bir kompleks oluşturması ve oluşan mavi rengin kolorimetrik olarak ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Dondurularak kurutulmuş ıspanak kökleri, toplam fenolik madde miktarına göre uygun oranda seyreltilerek analize hazırlanmıştır. Seyreltilmiş örneklerden 1 ml deney tüpüne alınarak üzerine sırasıyla 5 ml 0,2 N Folin-Ciocalteau reaktifi ve 4 ml doymuş sodyum karbonat (75 g/L) ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. 50±0,5 °C'ye ayarlanmış su banyosunda (Isolab, İstanbul, Türkiye) 5 dakika tutulmuş ve akan su altında hemen soğutulmuştur. Hazırlanan karışımların absorbansı spektrofotometrede (Shimazdu, Kyoto, Japonya) 760 nm'de okunmuştur. Absorbansı ölçülen örneklerde bulunan toplam fenolik madde miktarı, daha önce farklı konsantrasyonlarda (0-80 mg/L) hazırlanan gallik asit çözeltilerinin absorbans değerlerinden elde edilen standart eğri yardımıyla belirlenmiştir. Sonuçlar standart

eğriden elde edilen denklem aracılığıyla hesaplanmış ve mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/kg liyofilize örnek (LF) olarak ifade edilmiştir. Gallik asit kalibrasyon eğrisi ve elde edilen denklem Şekil 3.3'te verilmiştir.

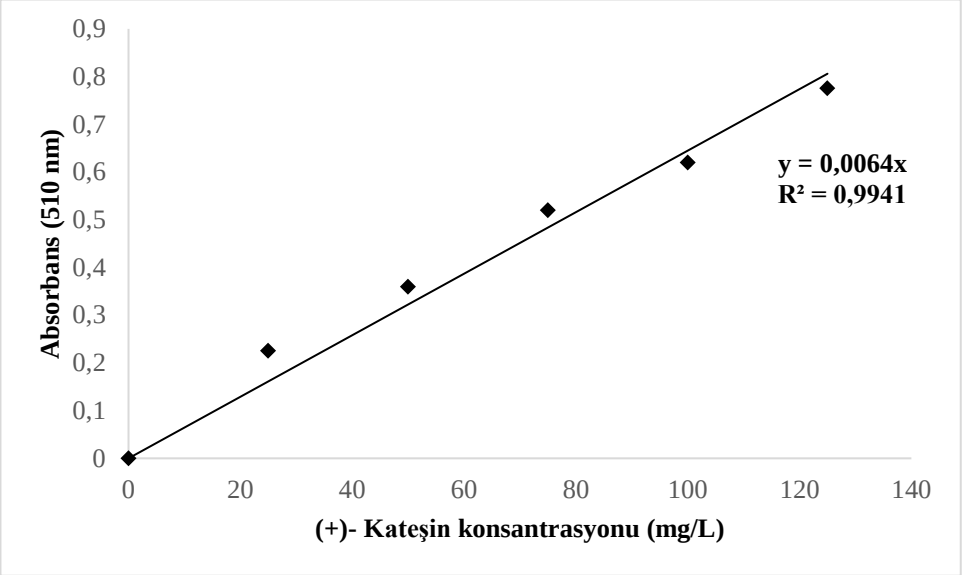


Şekil 3.3. Gallik asit kalibrasyon eğrisi

3.2.1.8. Toplam Flavonoid Madde Analizi

Dondurularak kurutulmuş ıspanak köklerinin toplam flavonoid madde miktarı Wannes vd. (2010)'in metodu kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem alüminyum klorürün flavonlar ve flavonollerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil grupları ile asidik ortamda kararlı renkli kompleksler oluşturması ve oluşan rengin kolorimetrik yöntemlerle ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Uygun oranda seyreltilmiş dondurularak kurutulmuş ıspanak kökü örneklerinden 1 ml alınarak üzerine 5 ml su ilave edilmiştir. Karışımın üzerine 0,3 ml %5'lik sodyum nitrit ($NaNO_2$) eklenerek vortekslenmiş ve 6 dk bekletilmiştir. Süre sonunda üzerine %10'luk 0,6 ml alüminyum klorür ($AlCl_3.6H_2O$) eklenerek vortekslenmiş ve 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra karışıma 2 mL 1 M'lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi eklenmiş ve tüp hacmi 10 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin absorbansları spektrofotometrede 510 nm'de okunarak toplam flavonoid miktarları (+)- kateşinle farklı konsantrasyonlarda (0-125 mg/L) hazırlanan kalibrasyon eğrisinden, mg kateşine eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır. Sonuçlar mg

kateşin eşdeğeri (KE)/kg LF olarak ifade edilmiştir. Elde edilen (+)- kateşin kalibrasyon eğrisi Şekil 3.4'te verilmiştir.

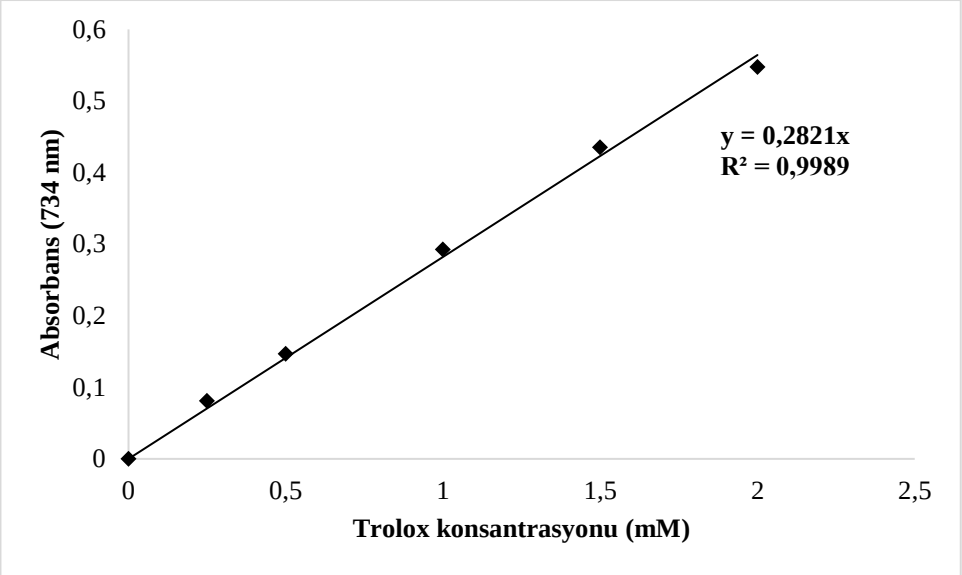


Şekil 3.4. (+)- Kateşin kalibrasyon eğrisi

3.2.1.9. Antioksidan Aktivite Analizi

Dondurularak kurutulmuş ıspanak kökü örneklerinde antioksidan aktivite analizi Miller vd. (1995) tarafından tanımlanan TEAC dekolorizasyonu yöntemine göre yapılmıştır. Yöntemin prensibi suda çözünür E vitaminin ve yapay bir bileşiğin türevi olan Trolox'un (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2 karboik asit) antioksidatif kapasitesi ile örneğin antioksidatif kapasitesinin karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Potasyum sülfatın ($K_2S_2O_8$), ABTS'den (2,2-azinobis-(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)) hazırlanan çözeltiye eklenmesiyle maksimum absorbansını 734 nm'de gösterecek $ABTS^{*+}$ radikal katyonu oluşmaktadır. Oluşan katyon antioksidan etkisine bağlı olarak parçalanmakta ve çözeltinin koyu yeşil rengi açılmaktadır. Antioksidatif kapasitenin ölçümü için çözeltideki renk açılması referans alınmakta ve Trolox eşdeğeri (TE) olarak ifade edilmektedir. $ABTS^{*+}$ radikali, 2,45 mM potasyum persülfatın ($K_2S_2O_8$) ve 7 mM ABTS'nin karıştırılıp en az 16 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmesiyle elde edilmiştir. Absorbans ölçümleri havaya karşı sıfırlanmış spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. $ABTS^{*+}$ radikal çözeltisi 734 nm'de absorbansı 0,70-0,80 aralığında

olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. Buna göre önce 3 ml radikal çözeltisinin absorbansı belirlenmiş daha sonra radikal çözeltisi ile uygun miktarda dondurularak kurutulmuş ıspanak kökü örneği karıştırılmış ve 734 nm dalga boyunda 6 dk sonundaki absorbans değerindeki azalma ölçülmüştür. Antioksidatif kapasitenin hesaplanması için örnek ve şahit arasındaki absorbans farkı bulunmuş ve daha önce farklı konsantrasyonlarda (0-2 mM) hazırlanan Trolox kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem yardımıyla tespit edilmiştir. Trolox kalibrasyon eğrisi ve elde edilen denklem Şekil 3.5'te verilmiştir. Örneklerin antioksidan aktivite değerleri mmol TE/kg LF cinsinden ifade edilmiştir.

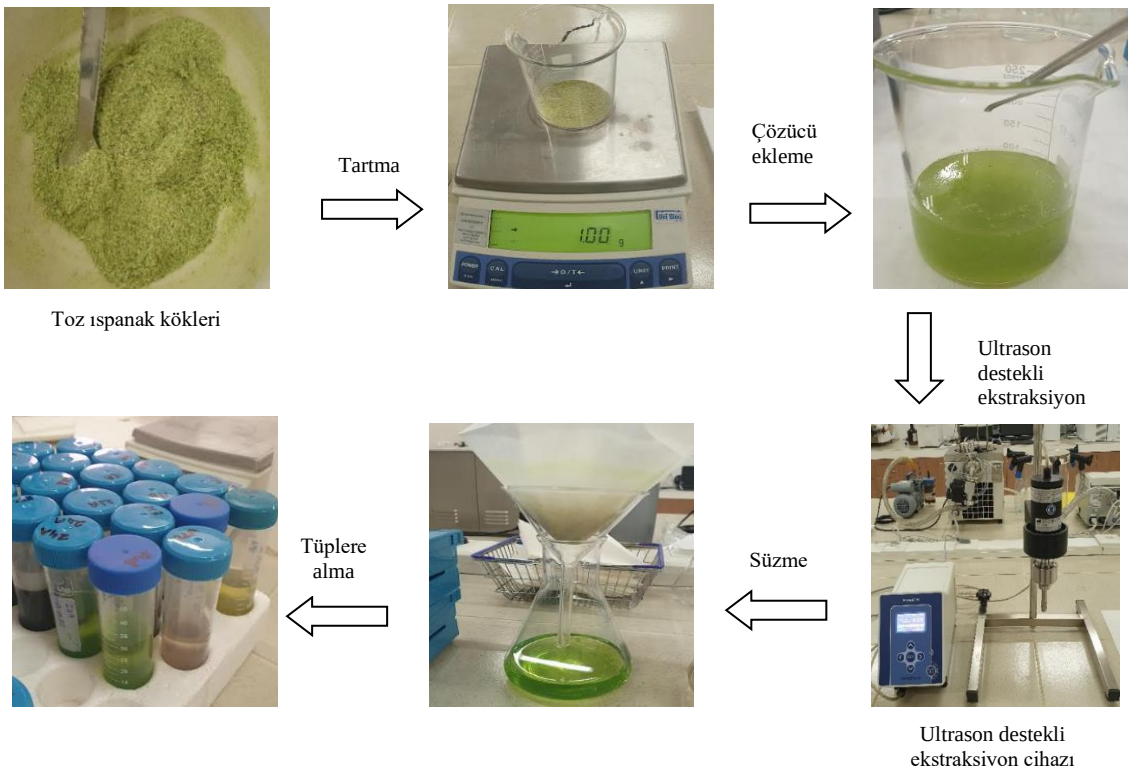


Şekil 3.5. Trolox kalibrasyon eğrisi

3.2.2. Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ultrason destekli ekstraksiyon (UDE), GM 4200 jeneratörü, ultrasonik dönüştürücü UW 200, SH 200 G booster horn ve TS 109 (çap 9 mm) titanyum probu ile donatılmış bir ultrasonik homojenizatörde (Bandelin, Sonopuls HD 4200, Berlin, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Dondurularak kurutulmuş ıspanak kökü tozu örneği çift cidarlı ekstraksiyon tüpüne 1 g tartılmış, üzerine tasarlanan bağımsız değişken oranına göre distile su ve etanol ilave edilmiştir. Ultrason probu, ekstrasiyon verimi göz önüne alınarak numunenin derinliğinin yarısına kadar daldırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi

boyunca örnek sıcaklığı çift cidarlı ekstraksiyon tüpünün dışına konulan soğuk su ile sabit tutulmuş ve kalibre edilmiş bir termometre ile süreç boyunca sıcaklıklar kontrol edilmiştir. Örnekler hedeflenen ekstraksiyon sıcaklıklarında ±2,0 °C'de alınmıştır. Cihaz ve işlem basamakları Şekil 3.6'da gösterilmektedir.



Şekil 3.6. Prob tipi ultrason destekli ekstraksiyon cihazı ve işlem basamakları

3.2.3. Optimizasyon Analizi

Ultrason uygulamasının ıspanak kökündeki toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerindeki etkilerinin ve uygulamanın optimum koşullarının belirlenmesi için Yanıt yüzey yöntemi (Response surface methodology; RSM) kullanılmıştır. Endüstriyel uygulamalar göz önüne alınarak, ultrason uygulamasında genlik (amplitude), sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Seçilen faktör seviyeleri -1, 0, +1 olarak kodlanmış, literatür bilgileri ve ön denemeler göz önüne alınarak belirlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Merkezi kompozit tasarımda kullanılan bağımsız değişler ve seviyeleri

Bağımsız değişkenler	Kodlar	Seviyeler				
		-α	-1	0	+1	+α
Genlik (%)	A	10	25	40	55	70
Sıcaklık (˚C)	B	0	10	20	30	40
Süre (dk)	C	2	3	4	5	6
Etanol Kons. (%)	D	0	20	40	60	80

Deney tasarımı Design Expert programı (Statease In., Minneapolis, ABD) kullanılarak, merkezi kompozit tasarım (Central composite design; CCD) yöntemine göre oluşturulmuştur (Bezerra vd., 2008). CCD modelinde 4 bağımsız değişkene sahip deney tasarımı için Denklem 2'ye göre α değeri 2 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 3.3'te verilen deney tasarımı için yapılacak deney sayısı Eşitlik 2.1'e göre 30 nokta olarak belirlemiştir. Bu deney tasarımında 1-16 standart sıralı deneyler faktöriyel noktaları, 17-24 standart sıralı deneyler yıldız noktaları, 25-30 standart sıralı deneyler ise merkez noktada gerçekleştirilen deneyleri temsil etmektedir. Deneyler tekrarlama olmaksızın rastgele bir sıra ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. Dört faktörlü ve beş seviyeli merkezi kompozit deney tasarımı

Standart sıra	Genlik (%) (A)	Sıcaklık (°C) (B)	Süre (dk) (C)	Etanol Konsantrasyonu (%) (D)
1	25(-1)	10(-1)	3(-1)	20(-1)
2	55(1)	10(-1)	3(-1)	20(-1)
3	25(-1)	30(1)	3(-1)	20(-1)
4	55(1)	30(1)	3(-1)	20(-1)
5	25(-1)	10(-1)	5(1)	20(-1)
6	55(1)	10(-1)	5(1)	20(-1)

Çizelge 3.3. Dört faktörlü ve beş seviyeli merkezi kompozit deney tasarımı (devamı)

Standart sıra	Genlik (%) (A)	Sıcaklık (°C) (B)	Süre (dk) (C)	Etanol Konsantrasyonu (%) (D)
7	25(-1)	30(1)	5(1)	20(-1)
8	55(1)	30(1)	5(1)	20(-1)
9	25(-1)	10(-1)	3(-1)	60(1)
10	55(1)	10(-1)	3(-1)	60(1)
11	25(-1)	30(1)	3(-1)	60(1)
12	55(1)	30(1)	3(-1)	60(1)
13	25(-1)	10(-1)	5(1)	60(1)
14	55(1)	10(-1)	5(1)	60(1)
15	25(-1)	30(1)	5(1)	60(1)
16	55(1)	30(1)	5(1)	60(1)
17	10(-2)	20(0)	4(0)	40(0)
18	70(+2)	20(0)	4(0)	40(0)
19	40(0)	0(-2)	4(0)	40(0)
20	40(0)	40(+2)	4(0)	40(0)
21	40(0)	20(0)	2(-2)	40(0)
22	40(0)	20(0)	6(2)	40(0)
23	40(0)	20(0)	4(0)	0(-2)
24	40(0)	20(0)	4(0)	80(2)
25	40(0)	20(0)	4(0)	40(0)
26	40(0)	20(0)	4(0)	40(0)
27	40(0)	20(0)	4(0)	40(0)
28	40(0)	20(0)	4(0)	40(0)
29	40(0)	20(0)	4(0)	40(0)
30	40(0)	20(0)	4(0)	40(0)

Bu çalışmada yanıt değişkenleri olarak toplam fenolik madde (Y_1, mg GAE/kg LF), toplam flavonoid madde (Y_2, mg CE/kg LF) ve toplam antioksidan aktivite (Y_3, mmol TE/kg LF) seçilmiştir. Yanıtlar ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi

belirlemek için ikinci dereceden polinom denklem (Eşitlik 3.1) kullanılmıştır. Deneysel tasarımdan elde edilen sonuçlar, ikinci polinom denkleminin katsayılarının belirlenmesi amacıyla istatiksel yazılım ile işlenmiş ve çoklu doğrusal olmayan regrasyona tabi tutulmuştur. Polinom model denkleminin uyum kalitesi R^2 belirleme katsayısı ile ifade edilmiş ve istatiksel önemi F-testi ile kontrol edilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + +\beta_4 X_4 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + +\beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + \varepsilon \quad (3.1)$$

Burada Y yanıt değeri, Çizelge 3.2'ye göre A, B, C ve D'nin Eşitlik 3.1'de sırasıyla X_1, X_2, X_3 ve X_4'e eşit olması durumunda faktörlerin düzeyini, polinomun katsayıları ise β_0 sabit terimi, β_1, β_2, β_3 ve β_4 doğrusal etkileri, β_{11}, β_{22}, β_{33} ve β_{44} karesel etkileri ve β_{12}, β_{13}, β_{14}, β_{23}, β_{24} ve β_{34} ikili etkileri ve ε artık hatayı ifade etmektedir.

İstatiksel Analizi

Tüm istatiksel hesaplamalar Design Expert Software® 13 Trial Version kullanılarak yapılmıştır. UDE sürecinin optimizasyonunu, model anlamlılığını ve uygunluğunu test etmek için her yanıt değişkenine %95 güven düzeyine sahip varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır.

BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Karakterizasyon Analizleri

Ispanak kökünün temel kimyasal karakterizasyonuna ait sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. Ispanak kökünün temel kimyasal karakterizasyonu (n=3)

Karakterizasyon Analizleri	
pH	5,98±0,06
Suda çözünür kuru madde (°Briks) (%)	7,20 ± 0,00
Toplam Kuru madde (%w/w)	13,03±0,56
Kül (%w/w)	0,95±0,02

Şat vd. (2015) yaptıkları çalışmada ıspanağın yaprak ve saplarının pH'sını sırasıyla 7,30 ve 6,28 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada ıspanağın yaprak ve sap kısımlarının toplam kuru madde miktarı sırasıyla %10,73 ve %6,71 olarak tespit edilmiştir. Ispanak kökünün pH değeri sap ve yapraklarından daha düşük bulunurken, kuru madde miktarının yaprak ve saplardan daha yüksek miktarda olduğu görülmektedir. Alan ve Padem (1989) ise yaptıkları çalışmada ıspanağın pH değerini 5,72, toplam kuru madde miktarını %9,2 olarak raporlamışlardır.

Alibaş ve Okursoy (2012) yaptıkları çalışmada ıspanağın toplam kül miktarını %0,72±0,3 olarak tespit ederken, Alan ve Padem (1989) ise ıspanağın toplam kül miktarını %1,04 olarak bildirmiştir. Seven Erdemir (2013) yaptığı çalışmada 3 farklı pazardan ıspanak satın almış ve her bir örnek için toplam kül içeriklerini %2,31 ± 0,09,

%1,37 ± 0,10 ve %1,89 ± 0,13 olarak bildirmiştir. Ispanak kökünde tespit edilen toplam kül miktarı (%0,95±0,02) ıspanak yapraklarında tespit edilen miktarlara benzer olarak değerlendirilmiştir.

Ispanak kökünün mineral bileşen kompozisyonu Çizelge 4.2'de verilmiştir. Ispanak kökünün K, P, Mg, Na ve Ca minerallerini fazla miktarda içerdiği tespit edilmiştir. Diğer minerallerin varlığı ise daha az miktarlarda tespit edilmiştir. Türkomp'un (2022) yayınlamış olduğu ıspanak bitkisindeki mineral bileşen değerleri incelendiğinde ıspanak kökünün daha düşük miktarda Fe, Ca ve Se içerdiği, daha yüksek miktarda P, Mg, K, Na ve Zn içerdiği tespit edilmiştir. Ispanakta tespit edilen mineral çalışmalarında Cu 2,45-6,76 mg/kg, Zn 2,99-241,1 mg/kg, Cd 0,043-0,34 mg/kg ve Pb 0,134-9,44 mg/kg aralığında tespit edilmiştir (Alexander vd., 2006; Mohamed vd., 2003; Stalikas vd., 1997) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Ispanak kökünün mineral bileşen kompozisyonu

Mineral Bileşen	Miktar (mg/kg LF)	Mineral Bileşen	Miktar (mg/kg LF)
Al	20,84	Mg	4948,60
As	0,49	Mn	17,12
B	8,56	Na	1288,64
Ba	2,26	Ni	1,07
Ca	465,67	P	5443,38
Cd	0,29	Pb	0,78
Co	0,06	Se	0,43
Cr	0,06	Sr	51,87
Cu	4,77	V	0,11
Fe	47,12	Zn	31,78
K	41517,25		

Ispanak kökünde LC-MS/MS yöntemiyle belirlenen fenolik bileşenler, MRM geçişleri (*m/z*), Rt (dk) ve fenolik bileşiklerin konsantrasyonu (mg/kg LF) Çizelge 4.3'te verilmiştir. Ispanak kökünde 3 tanesi flavonoid madde olmak üzere toplamda 9 adet fenolik bileşen tespit edilmiştir. Ispanak kökünde hem hidrolize edilmemiş numunede

(2657,60 mg/kg LF) hem de hidrolize edilmiş numunede (16864,10 mg/kg LF) ana fenolik bileşen trans ferulik asit olarak tespit edilmiştir. Trans ferulik asit kütle spektrumunda m/z 178'de bir moleküler iyon [M-H] sunmuştur ve MS/MS spektrumu m/z 134, m/z 178 ve m/z 193'te karakteristik fragman iyonları göstermiştir. Trans ferulik asit başta olmak üzere belirlenen fenolik asitlerin asidik hidrolize edilen numunelerde hidrolize edilmemiş numunelere kıyasla daha yüksek miktarlarda tespit edildiği Çizelge 4.3'te görülmektedir. Bu durum asidik hidroliz işleminde şeker gruplarının yüksek polarlıkları nedeniyle glikozidik bağlarla bağlandıkları fenolik bileşikten ayrılması ve fenolik asit çekirdeklerinin ortaya çıkmasıyla açıklanabilmektedir (Akyüz, 2011). Bunea vd. (2008) yaptıkları çalışmada taze ıspanaktaki fenolik madde içeriğini tespit etmek için LC-MS analizi gerçekleştirmiş ve orto-kumarik asit (27,8±2,7 mg/kg TA), ferulik asit (9,9±0,4 mg/kg TA) ve para-kumarik asit (1,3±0,1 mg/kg TA) olmak üzere üç fenolik asit tanımlamıştır. Ispanak kökünde de benzer olarak p-kumarik asit tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Dehkharghanian vd. (2010) yaptıkları çalışmada ıspanak yapraklarındaki fenolik bileşenleri C18 ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile tanımlanmış ve HPLC-ESI-MS/MS metoduyla ESI-MS'ye bağlanan HPLC ile doğrulamıştır. Çalışma sonunda ıspanak yapraklarında kuersetin (403 mg/kg KM), kamferol 242 (mg/kg KM) ve apijenin (1370 mg/kg KM) olmak üzere 3 adet flavonoid tespit etmişlerdir.

Çizelge 4.3. Ispanak kökünde tespit edilen fenolik bileşenler, tutulma süreleri (Rt), kütle spektral verileri ve fenolik konsantrasyonları (mg/kg LF)

		Hidrolize edilmemiş			Hidrolize Edilmiş	
	Fenolik Bileşenler	**MRM geçişleri (*m/z*)**	**Rt (dk)**	**Konsantrasyon (mg/kg LF)**	**Rt (dk)**	**Konsantrasyon (mg/kg LF)**
Fenolik asitler	Gallik asit	79→170	1,643	<log	1,685	1,75
	Silisilik asit	65→134	3,403	145,45	3,429	191,58
	Kafeik asit	117→179	3,511	8,11	3,519	17,33
	p-Kumarik asit	93→163	3,950	7,71	3,958	112,98
	Trans ferulik asit	134→193	4,000	2657,60	4,017	16864,10
	Sinapik asit	121→223	4,016	<log	4,058	204,96
Flavonoidler	Kuersetin	151→301	4,241	6,80	4,241	22,06
	İzorhamnetin	151→315	4,265	36,35	4,274	17,65
	Jasmonik asit	59→209	4,354	105,31	4,362	35,59

log: miktar sınırı

Ispanak köklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve antioksidan aktivite miktarları Çizelge 4.4'te verilmiştir. Ispanak köklerinin toplam fenolik madde miktarı liyofilize örnekte 4241,4±24,4 mg GAE/kg olarak tespit edilmiştir. Şat vd. (2015) kurutma fırınında kurutulan ıspanak yaprak ve sapları için toplam fenolik madde miktarları 845,5 ve 343 mg GAE/kg KM olarak tespit etmişlerdir. Zhou ve Yu (2006) kurutulmuş ıspanakları 15 saat aseton-su (1:1, v/v) çözeltisinde ekstrakte etmiş ve örneklerin toplam fenolik madde miktarını 9300–13000 mg GAE/kg KM olarak belirtmiştir. Jaime vd. (2015) yaptıkları çalışmada ıspanak yapraklarını 50 °C suda ekstrakte etmiş ve toplam fenolik madde miktarını 25256±1354 mg GAE/ kg KM olarak tespit etmiştir.

Ispanak köklerinin toplam flavonoid madde miktarı liyofilize örnekte 1093,75±11,0 mg KE/kg olarak tespit edilmiştir. Hong ve Ahn (2005) yaptıkları çalışmada ıspanak yapraklarının yıkanmadan önce ve yıkandıktan sonra toplam flavonoid madde miktarlarını sırasıyla 21010±60,0 ve 19830±40,0 mg KE/kg KM

olarak bildirmiştir. Ispanak kökünde tespit edilen toplam flavonoid madde miktarının ıspanak yapraklarına kıyasla oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir.

Ispanak köklerinin antioksidan aktivitesi 23,4±0,25 mg TE/kg LF olarak tespit edilmiştir. Jaime vd. (2015) ıspanak yapraklarını 50 °C suda ekstrakte etmiş ve antioksidan aktivitesini 198±12 mmol TE/kg KM olarak tespit etmiştir. Yosefi vd. (2010) yaptıkları çalışmada smooth, semi-savoy ve savoy olmak üzere 3 farklı çeşitteki ıspanakların sap ve yaprak kısımlarında antioksidan aktivitesini incelemiş ve sonuçları ortalama olarak yaprak kısmı için 40,87±11,19 TE/kg KM ve sap kısmı için 16,11±1,92 mmol TE/kg KM olarak bildirmişlerdir. Ispanak köklerinin antioksidan aktivitesi ıspanak yapraklarından daha az, sap kısmından ise daha çok olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.4. Ispanak kökünün toplam fenolik ve flavonoid madde miktarları ve antioksidan aktivitesi (n=3)

Karakterizasyon Analizleri	Konsantrasyon
Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/kg LF)	4241,40±24,40
Toplam flavonoid madde miktarı (mg KE/kg LF)	1093,75±11,00
Antioksidan aktivite (mmol TE/kg LF)	23,40±0,25

LF: Liyofilize örnek

Yapılan araştırmalar sonucunda, elde edilen sonuçlarda farklılıklar gözlemlenmiştir. Yetiştirme şartları, iklim, hasat zamanı ve depolama gibi faktörler sonuçlarda değişiklik oluşturabilmektedir (Deveci vd., 2011). Seçilen ıspanak materyalinin farklı çeşit ve genotipe sahip olması (Yosefi vd., 2010) ve analiz yöntemlerinde farklı metotlar uygulanması analiz sonuçlarını etkileyebilmektedir (Jaime vd., 2015). Ek olarak, ekstraksiyon aşamasında uygulanan çözücü çeşidi, örneğin pH değeri, sıcaklık ve süre gibi değişkenler elde edilen sonuçlarda farklılık oluşturabilmektedir (Vinatoru vd., 2017).

4.2. Merkezi Kompozit Tasarım ile Ekstraksiyon Sürecinin Analizi

Ekstraksiyon sürecinde genlik (%), sıcaklık (°C), süre (dakika) ve etanol konsantrasyonu (%) bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstraktların

toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/kg LF), toplam flavonoid madde miktarı (mg KE/kg LF) ve antioksidan aktiviteleri (mmol TE/kg LF) sürecin yanıtı olarak değerlendirilmiştir. Merkezi kompozit tasarıma göre belirlenen 30 deney basamağı için yanıtlardan elde edilen deneysel veriler Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. RSM için kullanılan dört faktörlü, beş seviyeli merkezi kompozit tasarım ve ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarının farklı kombinasyonları için deneysel sonuçlar

Standart sıra	A Genlik (%)	B Sıcaklık (°C)	C Süre (dk)	D Etanol Kons. (%)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/kg LF)	Toplam Flavonoid Madde (mg KE/kg LF)	Antioksidan Aktivite (mmol TE/kg LF)
1	25	10	3	20	5418,10	1914,06	19,20
2	55	10	3	20	5719,83	1972,66	20,91
3	25	30	3	20	5620,69	1738,28	18,73
4	55	30	3	20	5745,69	1636,72	19,14
5	25	10	5	20	5426,72	1632,81	17,90
6	55	10	5	20	5978,45	1820,31	20,68
7	25	30	5	20	5612,07	1703,13	19,08
8	55	30	5	20	5521,55	1789,06	18,37
9	25	10	3	60	3672,41	476,56	16,25
10	55	10	3	60	3801,72	507,81	16,13
11	25	30	3	60	3732,76	625,00	17,90
12	55	30	3	60	3948,28	765,63	15,89
13	25	10	5	60	3719,83	453,13	14,06
14	55	10	5	60	3646,55	441,41	14,48
15	25	30	5	60	3646,55	585,94	16,01
16	55	30	5	60	3590,52	585,94	15,01
17	10	20	4	40	4400,86	761,72	18,43
18	70	20	4	40	4659,48	1296,88	15,77
19	40	0	4	40	4163,79	703,13	19,14
20	40	40	4	40	4913,79	1378,91	21,27

Çizelge 4.5. RSM için kullanılan dört faktörlü, beş seviyeli merkezi kompozit tasarım ve ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarının farklı kombinasyonları için deneysel sonuçlar (devamı)

Standart sıra	A Genlik (%)	B Sıcaklık (°C)	C Süre (dk)	D Etanol Kons. (%)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/kg LF)	Toplam Flavonoid Madde (mg KE/kg LF)	Antioksidan Aktivite (mmol TE/kg LF)
21	40	20	2	40	4439,66	984,38	18,67
22	40	20	6	40	4418,10	882,81	14,52
23	40	20	4	0	6272,55	2290,00	19,85
24	40	20	4	80	3426,72	730,47	12,11
25	40	20	4	40	4163,79	847,66	17,49
26	40	20	4	40	4198,28	687,50	18,67
27	40	20	4	40	4297,41	796,88	18,79
28	40	20	4	40	4000,12	695,31	17,07
29	40	20	4	40	4081,90	699,12	18,55
30	40	20	4	40	4814,66	1398,26	18,49

En yüksek toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarı (6272,55 mg GAE/kg LF; 2070,65 mg KE/kg LF) %40 genlikte, 20 °C sıcaklıkta, 4 dk ekstraksiyon süresinde ve %0 etanol konsantrasyonunda (çözücü olarak saf su kullanılmış) yapılan ekstraksiyon işleminde (23. standart sıra) tespit edilmiştir. En yüksek antioksidan aktivite değeri ise (21,27 mmol TE/kg LF) %40 genlikte, 40 °C sıcaklıkta, 4 dk ekstraksiyon süresinde ve %40 etanol konsantrasyonunda uygulanan ekstraksiyon işleminde (20. standart sıra) tespit edilmiştir. Yapılan tüm deneylerde toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivite değeri arasında doğrusal bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir (Dorman vd., 2003)

4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Yanıtının Optimizasyon Süreci

4.3.1. Model seçimi

Model uygunluğunu belirlemek amacıyla uyum eksikliği testleri uygulanmıştır (Çizelge 4.6). İstatistiksel yazılım programı toplam fenolik madde yanıtı için hem doğrusal hem de karesel modelin kullanılabilir olduğunu göstermiştir. %95 güven aralığında gerçekleştirilen model seçiminde $P<0,05$ olması modelin anlamlı olduğunu ifade etmektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda doğrusal ve karesel modelin P-değerinin anlamlı olduğu görülmektedir. Ek olarak model seçiminde, merkez noktaların tekrarlanmasıyla belirlenen uyum eksikliği değerinin 0,05'ten büyük olması hatanın önemsiz olduğunu ve modelin anlamlı olduğunu belirtmektedir. Doğrusal ve karesel modelin uyum eksikliği değerleri anlamlıdır. Ayrıca en uygun modelin belirlenmesinde düzeltilmiş R^2 ve R^2 değerleri dikkate alınır. Düzeltilmiş R^2 ve R^2'nin 1'e yakın olması modelin deneysel verilerle uyum sağladığını belirtmektedir. İyi bir model uyumu için R^2'nin en az 0,80 olması gerektiği öne sürülmüştür (Joglekar ve May, 1987). Doğrusal ve karesel modelin R^2 değerleri sırasıyla 0,8975 ve 0,9484 olarak bulunmuştur. Optimizasyon süreci için R^2 değerinin daha yüksek olması nedeniyle karesel modelin kullanılması tercih edilmiştir. Ek olarak, tahminlenen R^2 değeri ile düzeltilmiş R^2 değeri arasındaki farkın 0,2'den küçük olması modelin yeterli ve uyum içinde olduğunun diğer bir ölçütüdür. Tahminlenen R^2 değeri (0,7911) ve düzeltilmiş R^2 değeri (0,9003) arasındaki fark 0,2'den küçük olduğu için, karesel modelin optimizasyonda kullanılması uygun görülmüştür. Model seçiminde tahmin edilen artık hata karelerinin toplamının (PRESS) değerinin en küçük olduğu modelin seçilmesi önerilmektedir. Karesel modelin PRESS değeri iki faktör etkileşimli (2FI) ve kübik modelden daha düşüktür. Ek olarak, model seçiminde sinyal ve gürültü oranının ölçüldüğü yeterli hassasiyet katsayısının 4'ten büyük olması önemlidir. Karesel modelde yeterli hassasiyet katsayısı 18,548 bulunmuş ve uygun olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca varyasyon katsayısı (%CV) toplam fenolik madde miktarı yanıtı için %5,83 olarak bulunmuştur. CV değerlerinin %10'dan küçük olması modelin deneysel değerleri tahmin etme yeteğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu nedenle toplam fenolik madde miktarı yanıtının optimizasyon sürecinde karesel model kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. Ekstraktların toplam fenolik madde yanıt değişkeni için elde edilen modellerin uyum istatistiği verileri

Model	P-değeri	R^2	Düzeltilmiş R^2	Tahminlenen R^2	Uyum Eksikliği	Standart Sapma	PRESS
Doğrusal	**< 0.0001**	**0,8975**	**0,8811**	**0,8635**	**0,5528**	**291,19**	**2,82E+06**
2FI	0,9651	0,9042	0,8537	0,7877	0,4045	322,93	4,39E+06
Karesel	**0,0427**	**0,9484**	**0,9003**	**0,7911**	**0,6651**	**266,56**	**4,32E+06**
Kübik	0,4575	0,9771	0,9053	0,613	0,7501	259,87	8,00E+06

4.3.2. Modelin ANOVA ile İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Karesel modelin uygulandığı toplam fenolik madde miktarı yanıtı için varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.7'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.7. Toplam fenolik madde miktarı yanıtı için varyans analizi sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Karelerin Ortalaması	F-değeri	*p*-değeri	
Model	1,96E+07	14	1,40E+06	19,71	< 0.0001	Önemli
Doğrusal etkiler						
A-Genlik	1,09E+05	1	1,09E+05	1,54	0,2336	
B-Sıcaklık	98110,07	1	98110,07	1,38	0,2583	
C-Süre	13082,41	1	13082,41	0,1841	0,674	
D-Etanol Kons.	1,83E+07	1	1,83E+07	258,01	< 0.0001	
İkili etkileşim						
AB	31997,75	1	31997,75	0,4503	0,5124	
AC	12081	1	12081	0,17	0,6859	
AD	28259,41	1	28259,41	0,3977	0,5378	
BC	43703,42	1	43703,42	0,6151	0,4451	
BD	910,38	1	910,38	0,0128	0,9114	
CD	21477,36	1	21477,36	0,3023	0,5906	
Karesel etki						
A^2	1,86E+05	1	1,86E+05	2,62	0,1263	
B^2	1,96E+05	1	1,96E+05	2,76	0,1174	
C^2	89384,58	1	89384,58	1,26	0,2797	
D^2	7,22E+05	1	7,22E+05	10,16	0,0061	
Artık	1,07E+06	15	71056,52			
Uyum Eksikliği	6,45E+05	10	64447,86	0,7647	0,6651	Önemsiz
Saf Hata	4,21E+05	5	84273,85			
Toplam	2,07E+07	29				

SD: Serbestlik derecesi

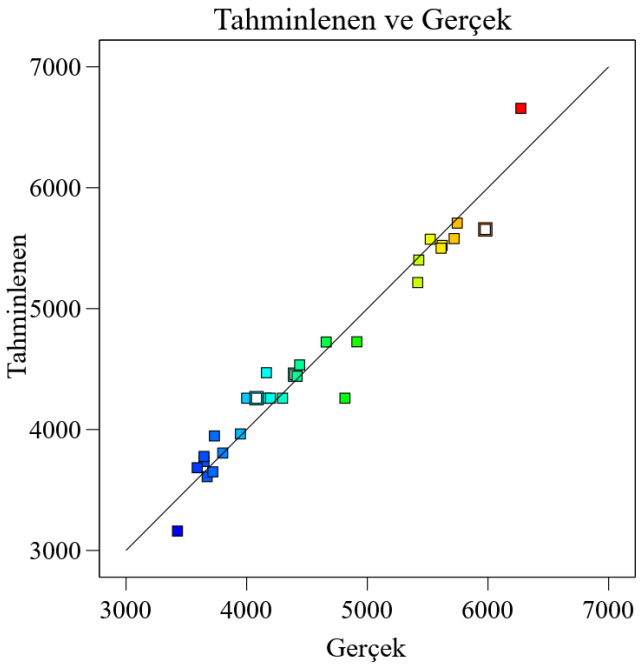
Modelin F-değerinin 19,71 ve P-değeri'nin 0,05'ten küçük olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.7'de A: Genlik (%), B: Sıcaklık (°C), C: Süre (dk) D: Etanol Konsantrasyonu (%) olarak tanımlanan bağımsız değişkenleri temsil etmektedir. A, B, C ve D doğrusal etkileri, AB, AC, AD, BC, BD ve CD ikili etkileşimleri, A^2, B^2, C^2 ve D^2 karesel etkileri ifade etmektedir. Model terimlerinin P-değerleri incelendiğinde etanol konsantrasyonun doğrusal etkisi (D) ($P<0,01$) ve etanol konsantrasyonun karesel etkisinin (D^2) ($P<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer terimler anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$). Modelin analizi, doğrusal etkiler arasında etanol konsantrasyonunun en önemli faktör olduğunu göstermiştir.

Değişkenlerin toplam fenolik madde miktarına etkisini ifade eden matematiksel model Eşitlik 4.1'de verilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir. Terimlerin önündeki pozitif işaret yanıt üzerindeki olumlu etkiyi gösterirken, negatif işaret olumsuz etkiyi ifade etmektedir.

$$
\begin{aligned}
\textit{Toplam fenolik madde} = {} & +4259{,}36 \\
& +67{,}53 \; \textit{Genlik} \\
& +63{,}94 \; \textit{Sıcaklık} \\
& -23{,}35 \; \textit{Süre} \\
& -874{,}01 \; \textit{Etanol konsantrasyonu} \\
& -44{,}72 \; \textit{Genlik*Sıcaklık} \\
& -27{,}48 \; \textit{Genlik*Süre} \\
& -42{,}03 \; \textit{Genlik*Etanol konsantrasyonu} \\
& -52{,}26 \; \textit{Sıcaklık*Süre} \\
& +7{,}54 \; \textit{Sıcaklık*Etanol konsantrasyonu} \\
& -36{,}64 \; \textit{Süre*Etanol konsantrasyonu} \\
& +82{,}41 \; \textit{Genlik}^2 \\
& +84{,}56 \; \textit{Sıcaklık}^2 \\
& +57{,}09 \; \textit{Süre}^2 \\
& +162{,}28 \; \textit{Etanol konsantrasyonu}^2
\end{aligned}
\qquad (4.1)
$$

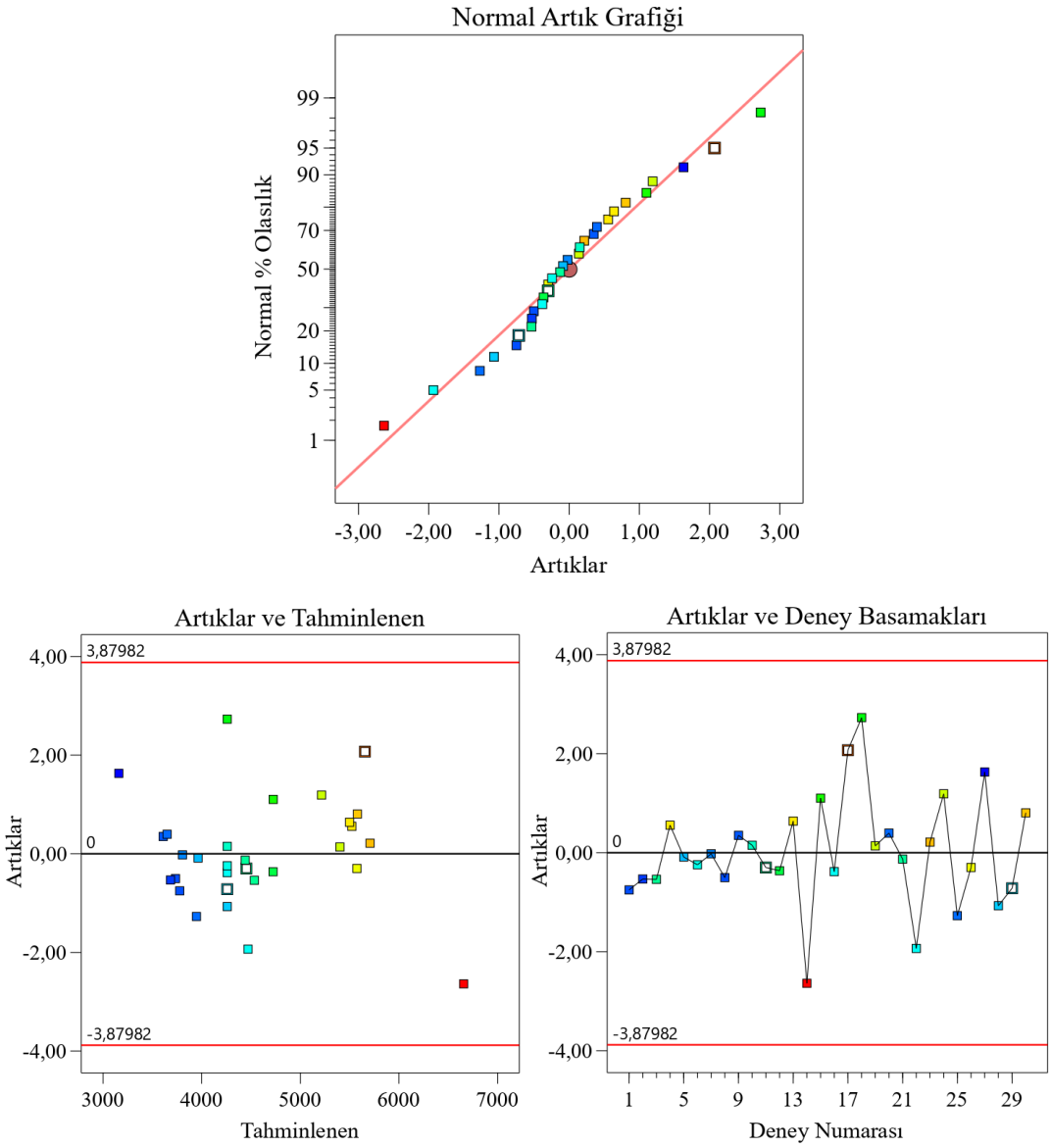
Etanol konsantrasyonunun ekstraksiyon süreci üzerinde negatif etkisi olduğu ($\beta_{4=}$ - 874,01), konsantrasyon miktarı arttıkça daha düşük miktarda fenolik bileşik elde edildiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Gelmez (2008) kavrulmuş buğdaydan elde ettiği ultrasonik ekstrakttaki toplam fenolik madde miktarı için etanol konsantrasyonun artmasının fenolik içeriğinin azalmasına sebep olduğunu bildirmiştir.

Deney basamaklarına karesel modelin uygulanmasıyla hesaplanan tahmin edilen (predicited) veriler ile gerçek (actual) veriler Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Gerçek ve tahminlenen değerler arasında doğrusal bir ilişki ve uyum olduğu gözlemlenmektedir. Bu nedenle karesel model bağımsız değişkenler için uygun olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.1. Ekstraktların karesel model üzerinde toplam fenolik madde yanıtı için tahminlenen ve gerçek verileri

Karesel model üzerinde tahminlenen değerler ile gerçek değerler arasındaki farkı gösteren artık grafikleri Şekil 4.2'de gösterilmektedir. Şekil 4.2.a'da gösterilen normal % olasılık ve artık grafiğinde verilerin doğrusal dağılım göstermesi matematiksel modelin parametrelerinin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğinin göstergesidir. Karesel modelde artıkların doğrusal dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Şekil 4.2.b'de model üzerinden belirlenen tahminlenen değerler ile artıkların karşılaştırıldığı grafik ve Şekil 4.2.c'de ise deney numaralarına karşı gelen gerçek değerler ile artıkların karşılaştırıldığı grafik gösterilmektedir. Her iki grafiktede kırmızı çizgi ile belirtilen y=3,87982 ve y=-3,87982 sınırları %95 güven aralığını temsil etmektedir. Değerlerin bu sınırlar içerisinde dağınık halde bulunması modelin tahmin yeteğinin iyi olduğunu göstermektedir. Her iki grafikte de değerlerin uygun olarak konumlandığı gözlemlenmektedir.

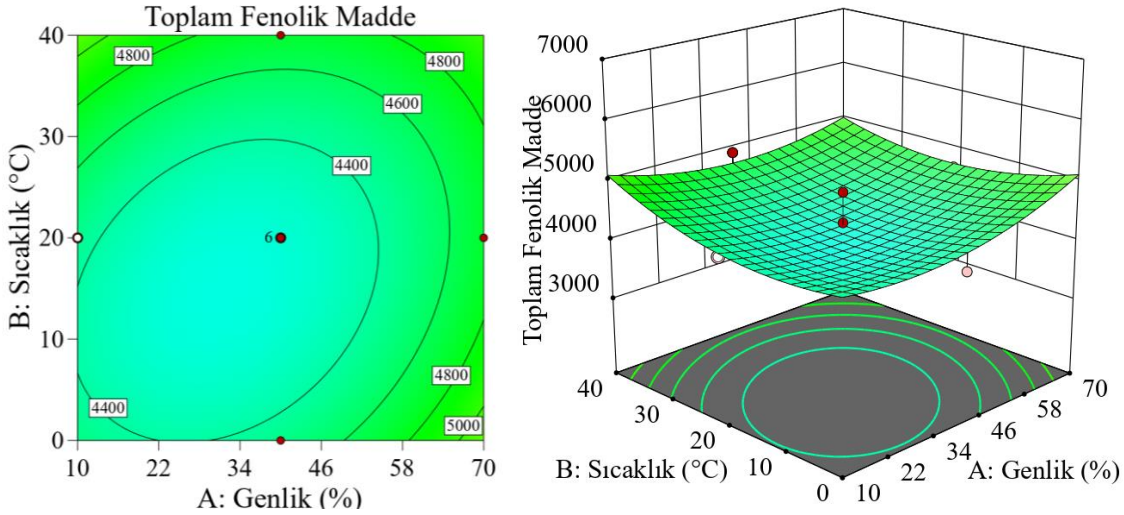


Şekil 4.2. Ekstraktların karesel model ile belirlenen toplam fenolik madde miktarlarının artık grafikleri: **a.** Normal % olasılık dağılımına karşı grafiği, **b.** Tahminlenen verilere karşı grafiği, **c.** Gerçek verilere karşı grafiği

4.3.3. Faktörlerin İkili Etkileşimlerinin Toplam Fenolik Madde Yanıt Değişkenine Etkilerini Gösteren Grafiklerin İncelenmesi

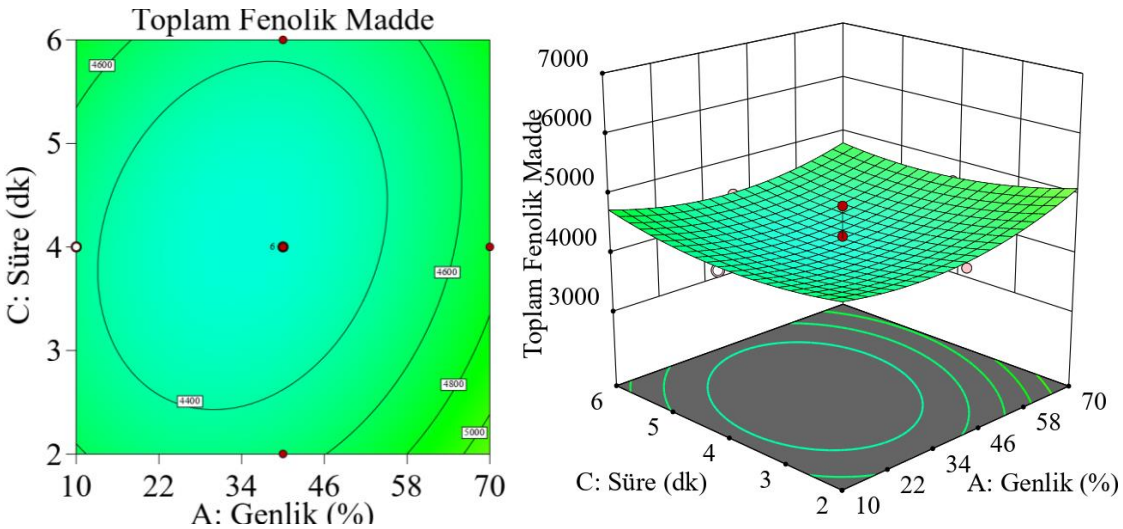
Sabit %40 etanol konsantrasyonunda 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarı sıcaklık ve/veya genliğin doğrusal artışıyla artma eğilimi göstermiştir (Şekil 4.3). Bu koşullarda en yüksek toplam fenolik madde miktarı %70 genlikte ve 0°C sıcaklıkta 5101,69 mg

GAE/kg LF olarak tespit edilebilmektedir. %10 genlikte ve 40°C sıcaklık uygulamasında da benzer bir sonuç (5096,12 mg GAE/kg LF) elde edildiği görülmektedir. Benzer şekilde Chen vd. (2015), şeker pancarı melasındaki fenolik maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonunda, toplam fenolik madde miktarının ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla arttığını, ekstraksiyon sıcaklığının 43°C'yi aşmasından sonra ise azalma eğiliminde olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, böğürtlendeki fenolik maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonunda, sıcaklığın 25°C'den 40°C'ye artması ile ekstraktın fenolik madde miktarının arttığı raporlanmıştır (Ivanovic vd., 2014). Bu ılımlı sıcaklık koşullarının ekstrakttaki fenolik bileşiklerin ortamdaki çözünürlüğünün artmasına neden olduğu belirtilmiştir (Chen vd., 2015). Genel olarak, sıcaklığın yükselmesi ham maddelerin yumuşamasını ve şişmesini hızlandırabilir, ekstrakte edilen bileşiklerin çözünürlüğünü artırabilir, çözücünün viskozitesini azaltabilir ve bunlara bağlı olarak fenolik maddelerin çözücüye geçişini arttırabilir (Tao vd., 2014). Genliğin arttırılması ultrasonik dalgaların sıkıştırma ve seyrekleştirme döngülerinin sayısı arttığından ve sonuç olarak bileşiklerin daha yüksek bir iletimi olduğundan dolayı, genlik ekstraksiyonun yoğunlaştırılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Al-dhabi vd., 2017). Ek olarak, Masuzawa vd., (2000) düşük sonikasyon frekanslarının, hücre duvarlarını ve zarları parçalayabilen pektinaz gibi enzimlerin aktivitesini artırarak fenolik bileşiklerin ekstrakta geçişini kolaylaştırabileceği bildirmiştir.



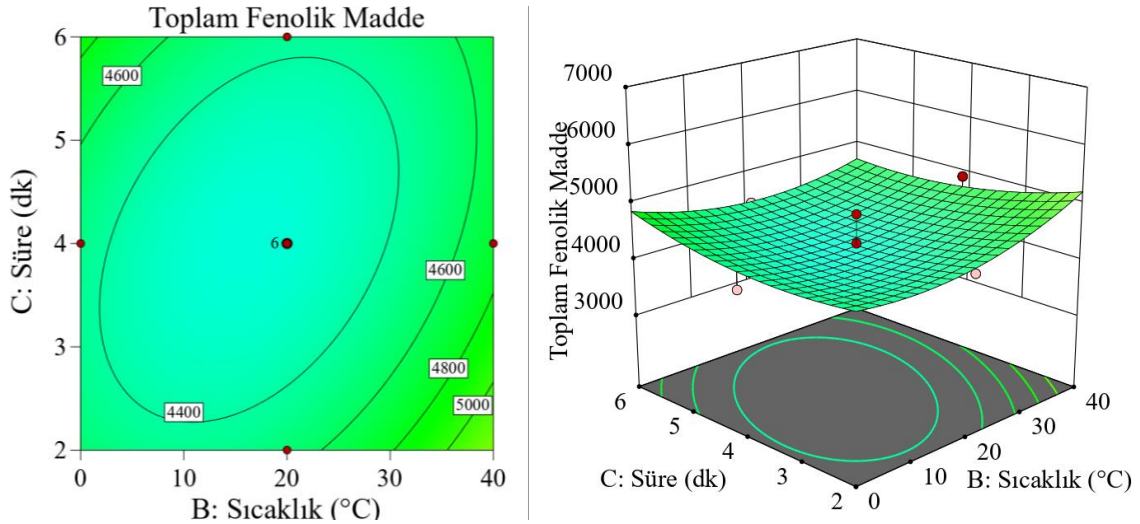
Şekil 4.3. Sabit süre ve etanol konsantrasyonunda, sıcaklık ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Etanol konsantrasyonu %40, Sıcaklık 0-40 °C, Genlik %10-70)

Sabit %40 etanol konsantrasyonunda ve 20 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarı % 70 genlik ve 2 dk ekstraksiyon süresinde en yüksek değerine (5109 mg GAE/kg LF) ulaşmıştır (Şekil 4.4). Şamlı ve Şahin (2013) ultrason ile ekstrakte edilen fenolik bileşiklerin içeriğinin, ekstraksiyonun ilk aşamasını kapsayan "yıkama" adımı olarak adlandırılan, matrisin yüzeyleri üzerinde çözünür bileşenlerin çözünmesinin gerçekleştirildiği adımla birlikte zamanın bir fonksiyonu olarak arttığını bildirmiştir. Bu aşamada, fenolik bileşiklerin toplam içeriğinin %90'ına kadar geri kazanılması sağlanmakta, bu da oldukça hızlı bir ekstraksiyon hızına işaret etmektedir. İkinci aşamada ise "yavaş ekstraksiyon" olarak adlandırılan, çözünenin bitki matriksinden çözücüye difüzyon ve ozmotik süreçlerle kütle transferidir. 2 dk ekstraksiyon işleminden sonra sürenin anlamlı bir etkisinin olmaması "yıkama" adımı olarak adlandırılan işlemin genlik faktörünün etkisiyle tamamlandığını düşündürmektedir. Süre faktörünün 4. dakikadan sonra tekrar yükselme ivmesine geçmesi "yavaş ekstraksiyon" adımına geçilmesiyle açıklanabilir.



Şekil 4.4. Sabit sıcaklık ve etanol konsantrasyonunda, süre ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Etanol konsantrasyonu %40, Süre 2-6 dk, Genlik %10-70)

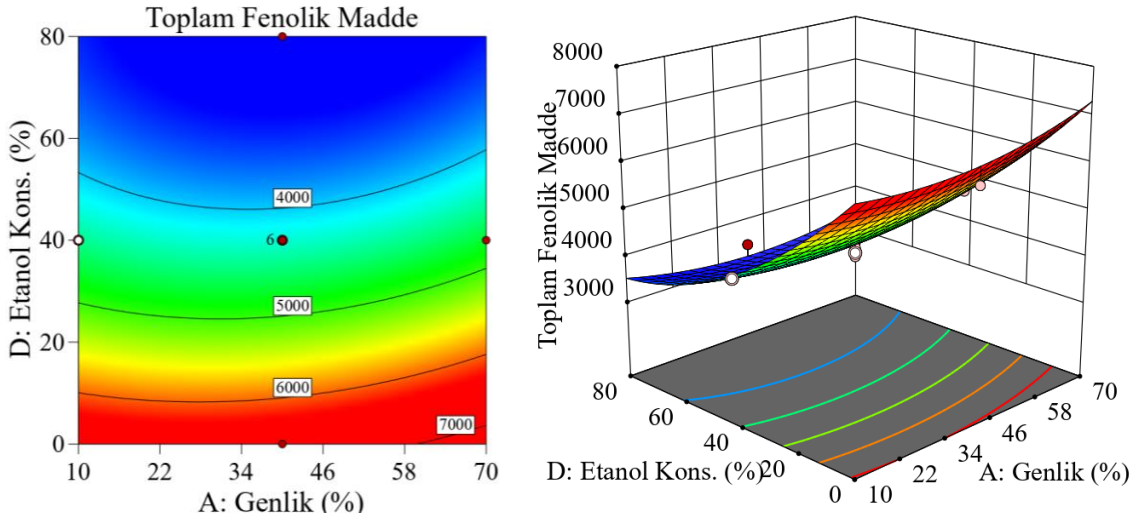
Sabit %40 etanol konsantrasyonunda ve %40 genlikte ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarı sıcaklığın 25 °C'den itibaren yükselmesi ile artmıştır (Şekil 4.5). Bu koşullarda sıcaklığın arttırılması ve sürenin azaltılmasıyla, sıcaklığın azaltılması ve sürenin arttırılmasının benzer toplam fenolik madde miktarının elde edilmesini sağlamıştır. Örneğin, örneğe sabit koşullara ek olarak 0 °C sıcaklıkta 6 dk veya 35 °C sıcaklıkta 2 dk boyunca ekstraksiyon işlemi uygulandığında 4800 mg GAE/kg LF toplam fenolik madde miktarı elde edilebilmektedir. Bu koşullarda en yüksek toplam fenolik madde değeri (5209 mg GAE/kg LF) 40 °C sıcaklıkta 2 dk ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilmiştir, ancak ekstraktiyon süresi arttıkça belirli bir aralıkta tespit edilen toplam fenolik madde miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, yüksek sıcaklık işlemlerinde ekstraksiyonun başlangıcında, partikül yüzeyinde çözücü ile temas halinde bulunan yüksek fenolik bileşen miktarına ve bu bileşiklerin salınımını hızlanmasına bağlanabilir. Ekstraksiyon sırasında uzayan süreler ile bu bileşiklerin ortama salınımı konsantrasyon gradyanını azalttır ve partiküllerin iç ve derin kısımlarında bulunan kalıntı polifenoller çözücü için daha az erişilebilir hale gelir ve çözücü içine daha az miktarda geçiş olur. Ek olarak, süre arttıkça çözücüye geçen fenolik bileşen miktarındaki azalma fenolik bileşiklerin zaman içinde yüksek sıcaklıklarda daha fazla bozunmasına da bağlanabilir (Cheok vd., 2013).



Şekil 4.5. Sabit etanol konsantrasyonu ve genlikte, sıcaklık ve süre değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Etanol konsantrasyonu %40, Genlik %40, Sıcaklık 0-40 °C, Süre 2-6 dk)

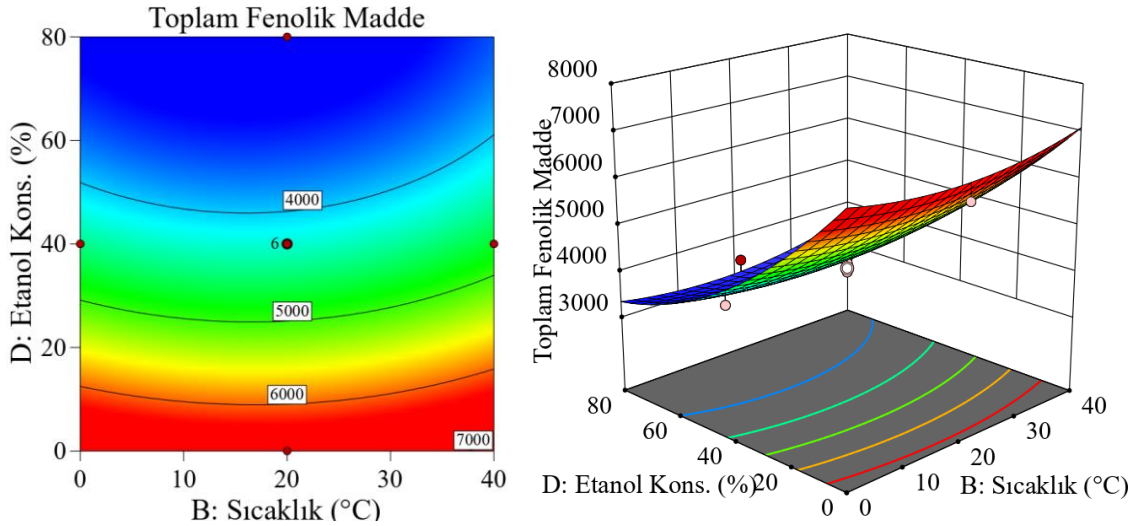
Sabit 20 °C sıcaklıkta ve 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarının, genliğin artması ile doğrusal olarak arttığı ve etanol konsantrasyonun artması ile doğrusal olarak azaldığı görülmüştür (Şekil 4.6). Ultrason uygulamasının hücre duvarlarını parçalamaya ek olarak ortamda serbest radikaller oluşturduğu ve kısa sürelerde polimerizasyon reaksiyonlarını başlatabildiği rapor edilmiştir (Luque-Garcia ve Luque de Castro, 2003). Polimerizasyon reaksiyonlarının bağlı fenolik bileşenlerin sulu fazda daha fazla çözünmesine neden olduğu ve bu nedenle çözücünün düşük etanol konsantrasyonlarında polimerik fenoliklerin daha yüksek geri kazanımlarını desteklediği ileri sürülmüştür (Özcan, 2006). Gelmez (2008) yaptığı araştırmada buğday ruşeymini UDE yöntemiyle ekstrakte etmiştir. Benzer olarak, geri kazanılan toplam fenolik madde miktarı açısından ekstraksiyon veriminin artan etanol seviyesi (%) ile azaldığını tespit etmiştir. Bu durumu, buğday rüşeymindeki protein oranı yüksek olan albüminin (%34) suda çözünür fraksiyonunun alkolde çözünen fraksiyonundan (prolamin) miktarsal olarak daha fazla olmasıyla açıklamıştır. Ek olarak yüksek etanol konsantrasyonun, protein hücre duvarını denatüre ederek difüzyonu oldukça zorlaştırdığı ve ekstraksiyon verimi üzerinde negatif etki yarattığı da savunulmaktadır (Amendola vd. , 2010). Bu koşulda elde edilen en yüksek toplam fenolik madde miktarı (7289 mg GAE/kg LF) %0 etanol ve %70

genlikte tespit edilmiştir. 20 °C sıcaklıkta 4 dk boyunca gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde etanol konsantrasyonu ve genlik faktörünün etkisi karşılaştırıldığında etanolün toplam fenolik madde miktarı üzerinde azaltıcı etkisi olduğu, genliğinde %0 etanol konsantrasyonuna sahip çözücüde (saf su) %60 seviyesinden sonra arttırıcı etkisi olduğu (>7000 mg GAE/kg LF) gözlemlenmiştir.



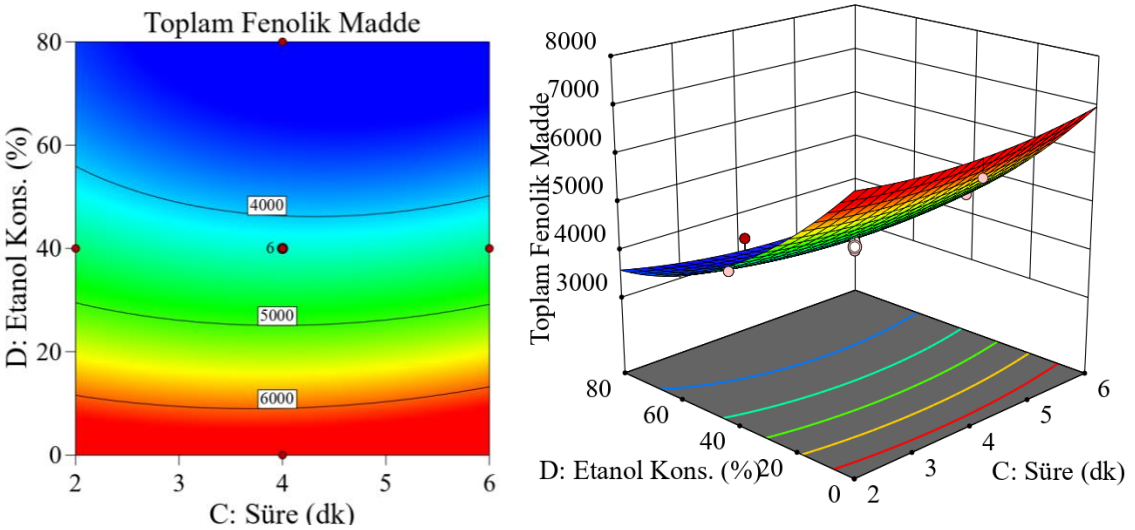
Şekil 4.6. Sabit sıcaklık ve sürede, etanol konsantrasyonu ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Süre 4 dk, Etanol konsantrasyonu %0-80, Genlik %10-70)

Sabit %40 genlikte 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, etanol konsantrasyonunun artmasıyla azalmıştır (Şekil 4.7). Bu koşullarda 0 °C'de %13 etanol konsantrasyonu ile ekstraksiyon işlemi yapıldığında toplam fenolik madde mikatrı 6000 mg GAE/kg LF olarak tespit edilmiştir. Aynı miktarda toplam fenolik madde 20 °C'de %9 etanol konsantrasyonu ile de elde edilmiştir. Sıcaklığın artması etanol kullanımını kısıtlamaktadır. Sabit %40 genlikte 4 dk ekstraksiyon işleminde çözücü olarak etanol yerine saf su tercih edilmesi ile 38 °C ve üzerinde sıcaklık uygulanmasıyla toplam fenolik madde miktarının arttığı (>7000 mg GAE/kg LF) tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Sabit süre ve genlikte, sıcaklık ve etanol konsantrasyonu değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Genlik %40, Sıcaklık 0-40 °C, Etanol konsantrasyonu %0-80)

Sabit %40 genlikte ve 20 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, sabit süre uygulanan ekstraksiyon işlemine benzer şekilde etanol konsantrasyonun artması ile tespit edilen toplam fenolik madde miktarının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Sabit sıcaklık ve genlikte, süre ve etanol konsantrasyonu değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Genlik %40, Süre 2-6 dk, Etanol konsantrasyonu %0-80)

4.4. Toplam Flavonoid Madde Miktarı Yanıtının Optimizasyon Süreci

4.4.1. Model Seçimi

Modelin anlamlılığı için P değeri ve uyum eksikliği, iyi bir model uyumu için ise R^2, tahminlenen R^2 değeri ve düzeltilmiş R^2 değeri arsındaki fark, tahmin edilen artık hata karelerinin toplamı ve yeterli hassasiyet katsayısı üzerinden değerlendirme yapılmıştır (Çizelge 4.8). %95 güven aralığında gerçekleştirilen model seçiminde doğrusal ve karesel modelin P-değeri anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$), bu nedenle istatistiksel yazılım programı her iki modelin de kullanılabileceğini önermiştir. Merkez noktaların tekrarlanmasıyla belirlenen uyum eksikliği değeri doğrusal ve karesel model için hatanın önemsiz olduğunu ve modellerin anlamlı olduğunu belirtmektedir ($P>0,05$). Model seçiminde tahmin edilen artık hata karelerinin toplamının (PRESS) kullanılacak model için en küçük olması önerilmektedir. Karesel modelin diğer modellerden daha yüksek PRESS değerine (3,514E+06) sahip olduğu görülmektedir. Modelin uygunluğunun saptanması için R^2'nin 1-0,8 aralığında olması gerektiği ve yüksek R^2 değerlerinin daha iyi olarak yorumlandığı belirtilmektedir (Joglekar ve May, 1987). Doğrusal ve karesel modelin R^2 değerleri karşılaştırıldığında, doğrusal modelin R^2 değerinin aralıkta olmadığı ve karesel modelin R^2 değerinin (0,9004) doğrusal modele (0,7967) göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu nedenle PRESS değeri yüksek olmasına rağmen, optimizasyon süreci için R^2 değeri daha yüksek olan karesel modelin kullanılması tercih edilmiştir. Ek olarak, karesel modelin tahminlenen R^2 değeri (0,6077) ve düzeltilmiş R^2 değeri (0,8074) arasındaki fark 0,2'den daha düşük olduğu saptanmıştır. Karesel modelde sinyal ve gürültü oranının ölçüldüğü yeterli hassasiyet katsayısı 13,124 bulunmuş ve 4'ten büyük olduğu için uygun olarak değerlendirilmiştir. Toplam flavonoid madde miktarı yanıtının optimizasyon sürecinde karesel model kullanılmıştır.

Çizelge 4.8. Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı yanıt değişkeni için elde edilen modellerin uyum istatistiği verileri

Model	P-değeri	R^2	Düzeltilmiş R^2	Tahminlenen R^2	Uyum Eksikliği	Standart Sapma	PRESS
Doğrusal	**< 0.0001**	**0,7967**	**0,7641**	**0,7219**	**0,5793**	**269,93**	**2,492E+06**
2FI	0,9793	0,8075	0,7062	0,6103	0,4209	301,24	3,491E+06
Karesel	**0,0331**	**0,9004**	**0,8074**	**0,6077**	**0,7147**	**243,91**	**3,514E+06**
Kübik	0,4325	0,9570	0,8218	0,7977	0,9437	234,59	1,813E+06

4.4.2. Modelin ANOVA ile İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Karesel modelin uygulandığı toplam flavonoid madde miktarı yanıtı için varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. Toplam flavonoid madde miktarı yanıtı için varyans analizi sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Karelerin Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	8,066E+06	14	5,761E+05	9,68	< 0.0001	Önemli
Doğrusal etkiler						
A-Genlik	88931,98	1	88931,98	1,49	0,2403	
B-Sıcaklık	1,017E+05	1	1,017E+05	1,71	0,2107	
C-Süre	28574,28	1	28574,28	0,4803	0,4989	
D-Etanol Kons.	6,917E+06	1	6,917E+06	116,27	< 0.0001	
İkili etkileşim						
AB	1235,96	1	1235,96	0,0208	0,8873	
AC	1102,45	1	1102,45	0,0185	0,8935	
AD	309,03	1	309,03	0,0052	0,9435	
BC	11123,39	1	11123,39	0,1870	0,6716	
BD	83557,13	1	83557,13	1,40	0,2544	
CD	3,81	1	3,81	0,0001	0,9937	
Karesel etki						
A^2	68461,12	1	68461,12	1,15	0,3004	
B^2	76725,33	1	76725,33	1,29	0,2739	
C^2	18589,32	1	18589,32	0,3125	0,5844	
D^2	7,945E+05	1	7,945E+05	13,35	0,0023	
Artık	8,924E+05	15	59494,50			
Uyum Eksikliği	5,160E+05	10	51600,82	0,6854	0,7147	Önemsiz
Saf Hata	3,764E+05	5	75281,86			
Toplam	8,958E+06	29				

SD: Serbestlik derecesi

Modelin F-değerinin 9,68 olması ve P-değeri'nin 0,05'ten küçük olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.9'da A, B, C ve D doğrusal etkileri, AB, AC, AD, BC, BD ve CD ikili etkileşimleri, A^2, B^2, C^2 ve D^2 karesel etkileri ifade etmektedir. Model terimlerinin P-değerleri incelendiğinde etanol konsantrasyonun doğrusal etkisi (D) ($P<0,01$) ve etanol konsantrasyonun karesel etkisinin (D^2) ($P<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer terimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$). Modelin analizi, doğrusal etkiler arasında etanol konsantrasyonunun en önemli faktör olduğunu göstermiştir.

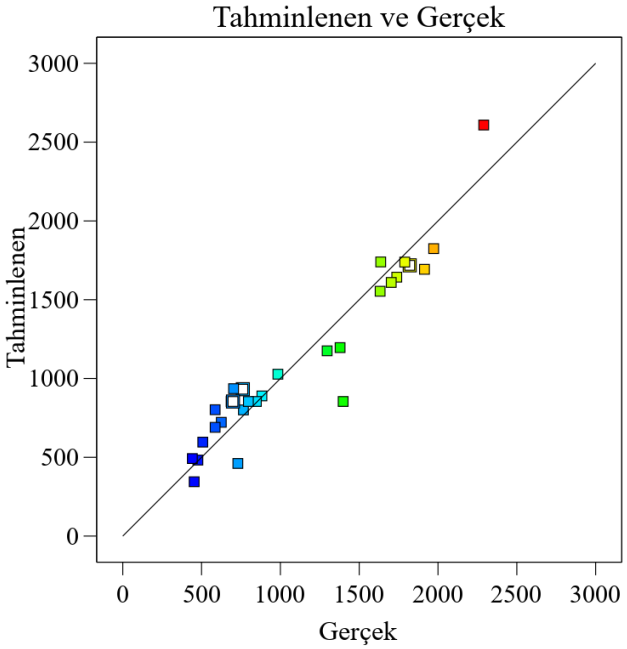
Değişkenlerin toplam flavonoid madde miktarına etkisini ifade eden matematiksel model Eşitlik 4.2'de verilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir. Terimlerin önündeki pozitif işaret yanıt üzerindeki olumlu etkiyi gösterirken, negatif işaret olumsuz etkiyi ifade etmektedir.

Toplam Flavonoid Madde = +854,12
+60,87 *Genlik*
+65,10 *Sıcaklık*
-34,51 *Süre*
-536,86 *Etanol konsantrasyonu*
-8,79 *Genlik*Sıcaklık*
+8,30 *Genlik*Süre*
-4,39 *Genlik*Etanol konsantrasyonu*
+26,37 *Sıcaklık*Süre*
+72,27 *Sıcaklık*Etanol konsantrasyonu*
+0,4883 *Süre*Etanol konsantrasyonu*
+49,96 *Genlik²*
+52,89 *Sıcaklık²*
+26,03 *Süre²*
+170,19 *Etanol konsantrasyonu²*

(4.2)

Toplam fenolik madde miktarı ekstraksiyon sürecindekine benzer olarak, etanol konsantrasyonunun flavonoid madde miktarının ekstraksiyon sürecinin üzerinde negatif etkisi olduğu (β_4= - 536,86), etanol konsantrasyonun miktarının artması ile daha düşük miktarda flavonoid madde elde edildiği tespit edilmiştir.

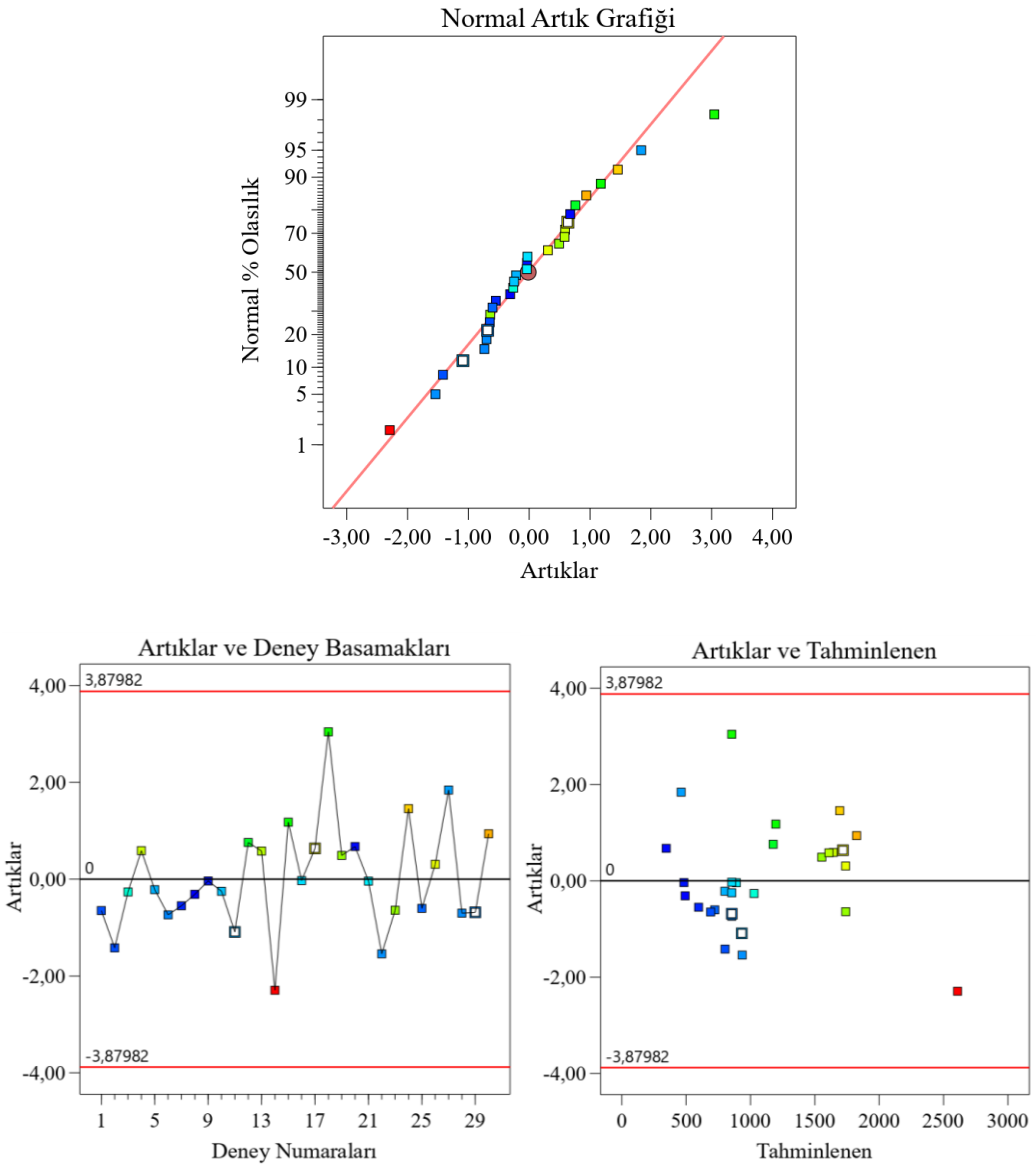
Deney basamaklarına karesel modelin uygulanmasıyla hesaplanan tahmin edilen (predicited) veriler ile gerçek (actual) veriler Şekil 4.9'da gösterilmektedir. Gerçek ve tahminlenen değerler arasında doğrusal bir ilişki ve uyum olduğu gözlemlenmektedir. Bu nedenle karesel model bağımsız değişkenler için uygun olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9. Ekstraktların karesel model üzerinde toplam flavonoid madde yanıtı için tahminlenen ve gerçek verileri

Karesel model üzerinde tahminlenen değerler ile gerçek değerler arasındaki farkı gösteren artık grafikleri Şekil 4.10'da gösterilmektedir. Şekil 4.10.a'da gösterilen normal % olasılık ve artık grafiğinde verilerin doğrusal dağılım göstermesi matematiksel modelin parametrelerinin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğinin göstergesidir. Karesel modelleme de artıkların doğrusal dağılım gösterdiği gözlenmiştir.

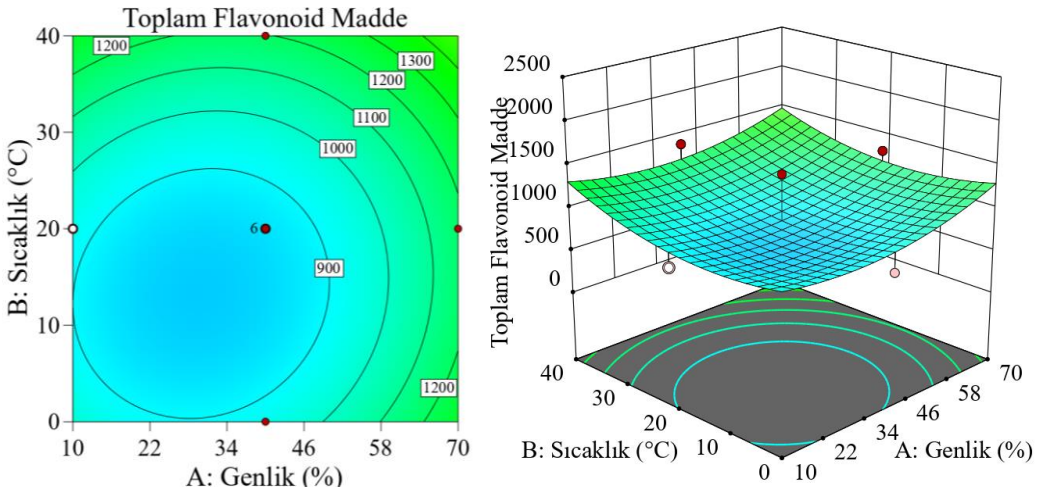
Şekil 4.10.b'de model üzerinden belirlenen tahminlenen değerler ile artıkların karşılaştırıldığı grafik ve Şekil 4.10.c'de deney numaralarına karşı gelen gerçek değerler ile artıkların karşılaştırıldığı grafik gösterilmektedir. Her iki grafiktede kırmızı çizgi ile belirtilen y=3,87982 ve y=-3,87982 sınırları %95 güven aralığını temsil etmektedir. Değerlerin bu sınırlar içerisinde dağınık halde bulunması modelin tahmin yeteğinin iyi olduğunu göstermektedir. Her iki grafikte de değerlerin uygun olarak konumlandığı gözlemlenmektedir.



Şekil 4.10. Ekstraktların karesel model ile belirlenen toplam flavonoid madde yanıtının artık grafikleri: **a.** Normal % Olasılık dağılıma karşı grafiği, **b.** Tahminlenen verilere karşı grafiği, **c.** Gerçek verilere karşı grafiği

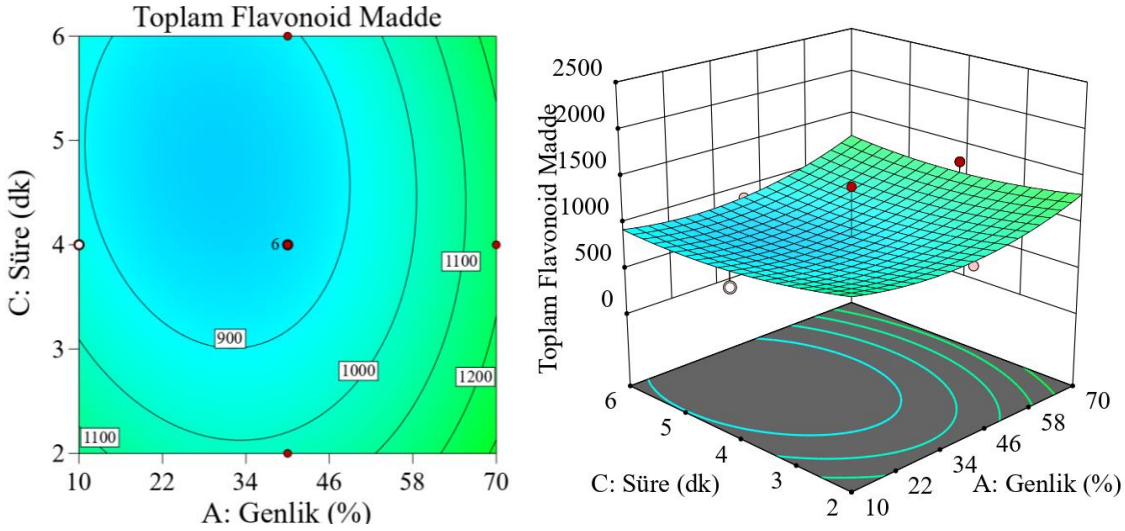
4.4.3. Faktörlerin İkili Etkileşimlerinin Toplam Flavonoid Madde Miktarı Yanıt Değişkenine Etkilerini Gösteren Grafiklerin İncelenmesi

Sabit %40 etanol konsantrasyonunda 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı, sıcaklık ve/veya genliğin arttırılmasıyla doğrusal olarak artmıştır (Şekil 4.11). Bu koşullarda en yüksek toplam flavonoid madde miktarı (1481 mg KE/kg LF) 40 °C sıcaklıkta ve %70 genlikte ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Ilımlı sıcaklık uygulamaları; matris bağlarının kopmalarının indüklenmesi, bileşik çözünürlüğünün artması, çözücü difüzyon hızının artması, kütle transferinin artması, viskozitede ve çözücünün geriliminde azalma etkisi yarattığından dolayı toplam flavonoid madde miktarını arttırıcı etkiye sahiptir (Medina-Torres vd., 2017). Benzer şekilde Garcia-Castello vd. (2015) UDE yönteminde sıcaklık uygulamasının flavonoid içeriğini arttırdığını bildirmiştir. Bu koşullarda 20 °C sıcaklıkta %10-70 genlikte ekstraksiyon işlemi uygulandığında toplam flavonoid madde miktarı sırasıyla 932 ve 1176 mg KE/kg LF olarak tespit edilmiştir. Yüksek düzeyde ultrason enerjisinin, enerji seviyesi yüksek kavitasyon nedeniyle bitki hücre duvarlarının bozulmasına neden olduğu bilinmektedir (Upadhyay vd., 2015). Altemimi vd. (2015) ıspanak örneği üzerine yaptıkları çalışmada toplam flavonoid madde üzerine ultrasonik güç ve sıcaklık faktörlerinin olumlu etkisini kütle transfer sürecini güçlendirmelerine bağlamıştır.



Şekil 4.11. Sabit etanol konsantrasyonu ve sürede, sıcaklık ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Etanol konsantrasyonu %40, Süre 4 dk, Sıcaklık 0-40 °C, Genlik %10-70)

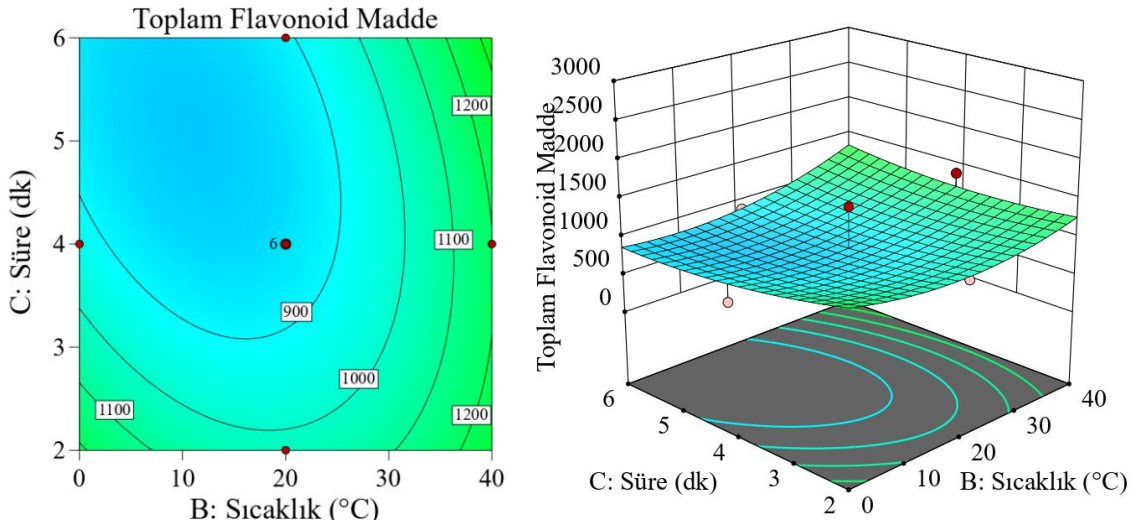
Sabit %40 etanol konsantrasyonunda ve 20 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı, genliğin %40 seviyesinden sonra arttırılmasıyla artmış, ekstraksiyon süresinin arttırılmasıyla az oranlarda azalmıştır (Şekil 4.12). Bu koşullarda en yüksek toplam flavonoid madde miktarı (1315 mg KE/kg LF) %70 genlikte 2 dk ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Upadhyay vd. (2015) süre faktörünün toplam flavonoid madde miktarını azaltıcı etkisini özütlenen bileşiklerin konsantrasyon gradyanında bir azalmaya yol açan solvent doygunluğunun meydana gelmesi şeklinde değerlendirmiştir. Artan genlik, özütlenen biyoaktif bileşiklerin solvent fazına kütle transferini arttırır ve dolayısıyla yüksek toplam flavonoid madde değeri ile sonuçlanırken, aşırı bir sonikasyon süresinin, özütleme çözücüsünün ısınmasına neden olduğu ve bunun da biyoaktif bileşiklerin bozulmasına neden olduğu belirtilmektedir (Pan vd., 2012).



Şekil 4.12. Sabit etanol konsantrasyonu ve sıcaklıkta, süre ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Etanol konsantrasyonu %40, Sıcaklık 20 °C, Süre 2-6 dk, Genlik %10-70)

Sabit %40 etanol konsantrasyonunda ve %40 genlikte ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı sıcaklığın arttırılmasıyla artmıştır (Şekil 4.13). Sıcaklığın 10 °C ve üzeri uygulamalarda etki ettiği, dolayısıyla bu koşulda %40 etanol-saf su olan çözgenin 10 °C'den daha sıcak olan işlemlerde termal olarak etkilendiği ve çözücü difüzyon hızının artmaya başladığı

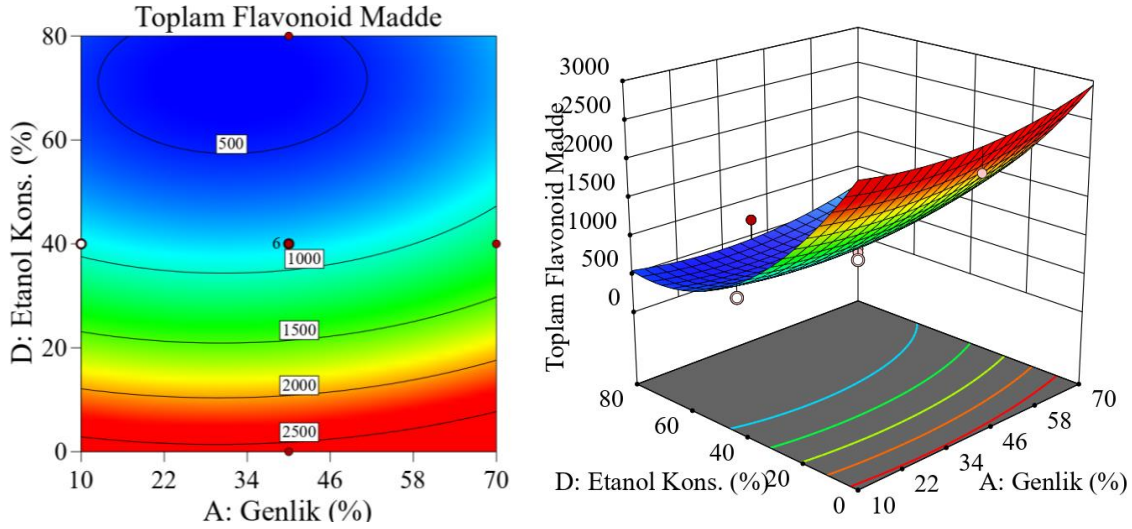
görülmektedir. Bu koşullarda en yüksek toplam flavonoid madde miktarı (1336 mg KE/kg LF) 40 °C sıcaklıkta 6 dk ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilmektedir. Şekil 4.13'te görüldüğü üzere bu koşulda süre faktörü düşük sıcaklıklarda etki etmemiş ancak yüksek sıcaklıkta (40 °C) etki etmiştir. Toplam fenolik madde miktarının süre faktöründen etkilenmesine benzer olarak, toplam flavonoid madde miktarının da yüksek sıcaklığın ilk 4 dakikasında zamanın bir fonksiyonu olan "yıkama" adımıyla örneğin yüzeyine etki ettiği ve örnekten çözücüye kütle transferini hızlandırdığı düşünülmektedir (Şamlı ve Şahin, 2013).



Şekil 4.13. Sabit etanol konsantrasyonu ve genlikte, süre ve sıcaklık değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Etanol konsantrasyonu %40, Genlik %40, Süre 2-6 dk, Sıcaklık 0-40 °C)

Sabit 20 °C sıcaklıkta 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı, etanol konsantrasyonunun artmasıyla keskin bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.14). Bu koşullarda en yüksek toplam flavonoid madde miktarı (2947 mg KE/kg LF) %70 genlikte ve %0 etanol konsantrasyonunda (saf su) ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Toplam fenolik madde miktarında da belirtildiği gibi, polimerik fenolikler sulu fazda daha fazla çözünür ve bu nedenle çözücünün düşük etanol konsantrasyonlarında polimerik fenoliklerin daha yüksek geri kazanımlarını desteklemesi beklenir (Özcan,

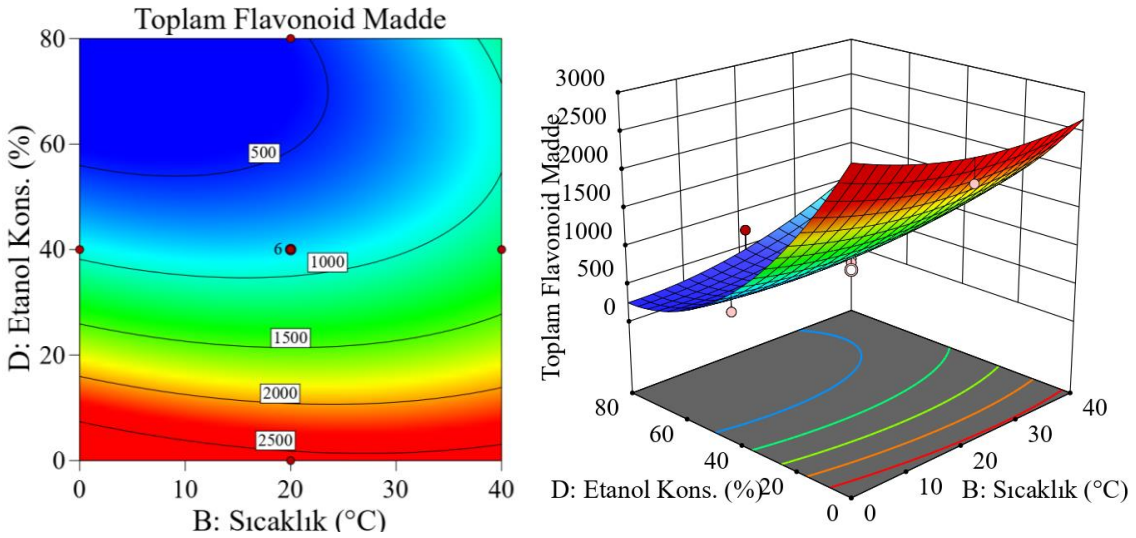
2006). Galvan d'Alessandro vd. (2012) siyah aronya meyvesinden elde ettikleri ultrasonik ekstraktta polifenol içeriğinde etanolün azaltıcı etkisini, flavonoidlerin ve çözünmeyen polifenollerin proteinler ve polisakkaritlerle hidrofobik bağlanmak için hücre duvarında yer almaları ve yüksek etanol konsantrasyonunun hücre duvarında protein denatürasyonuna neden olabileceği ve polifenollerin çözünmesini önleyebileceği ve daha sonra ekstraksiyon oranını etkileyebileceği şeklinde açıklamıştır. Ispanak kökünde de alkolde çözünen polifenol bileşiklerinin miktarının daha az olması nedeniyle etanol konsantrasyonun negatif etkisi olduğu düşünülmektedir. Ekstraktların %0 etanol konsantrasyonunda %10 genlikte ekstrakte edilmesi durumunda toplam flavonoid madde miktarı 2665 mg KE/kg LF olarak tespit edilmiştir. Bu durumda genliğin arttırılması toplam flavonoid madde miktarını arttırıcı bir etki sağlamıştır.



Şekil 4.14. Sabit süre ve sıcaklıkta, etanol konsantrasyonu ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Sıcaklık 20 °C Etanol konsantrasyonu %0-80, Genlik %10-70)

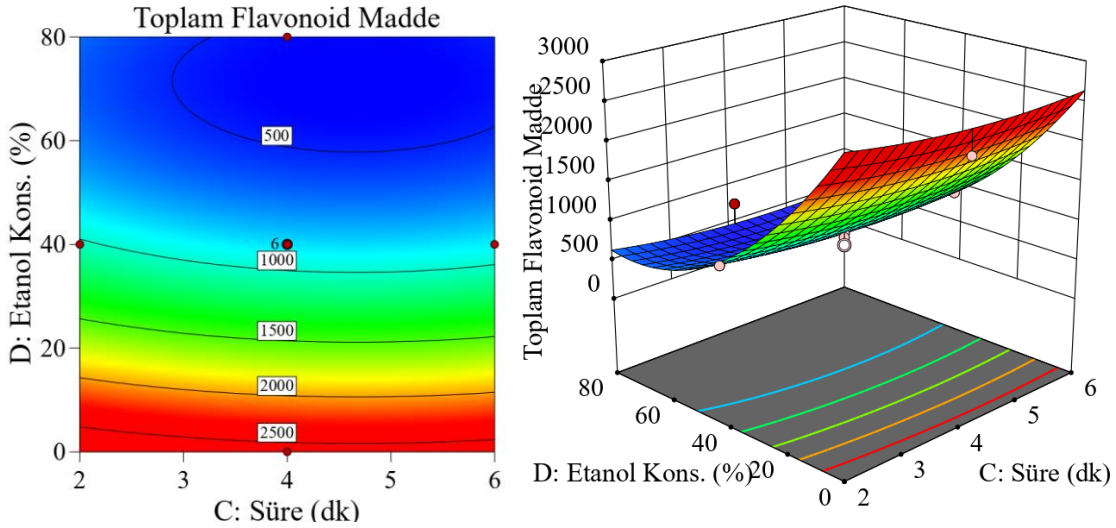
Sabit %40 genlikte 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı etanol konsantrasyonunun artmasıyla keskin bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.15). Bu koşullarda en yüksek toplam flavonoid madde miktarı (2978 mg KE/kg LF) 0°C sıcaklıkta %0 etanol konsantrasyonunda (saf su) ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. %0 etanol konsantrasyonunda 40 °C sıcaklıkta yapılan ekstraksiyon işleminde toplam

flavonoid madde miktarı 2657 mg KE/kg LF olarak tespit edilmiştir. Ekstraktı negatif yönde etkileyen yüksek etanol konsantrasyonun sıcaklıkla etkileşiminde, protein hücre duvarında denatürasyonun sıcaklık artışıyla hızlandığı ve difüzyonu oldukça zorlaştırdığı düşünülmektedir (Amendola vd., 2010).



Şekil 4.15. Sabit süre ve genlikte, etanol konsantrasyonu ve sıcaklık değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Genlik %40, Sıcaklık 0-40 °C, Etanol konsantrasyonu %0-80)

Sabit %40 genlikte ve 20 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı etanol konsantrasyonunun artmasıyla keskin bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.16). Bu koşullarda en yüksek toplam flavonoid madde miktarı (2783 mg KE/kg LF) %0 etanol konsantrasyonunda (saf su) 2 dk ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Düşük etanol konsantrasyonlarında süre faktörünün herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.16. Sabit sıcaklık ve genlikte, etanol konsantrasyonu ve süre değişkenlerinin ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarına etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Genlik %40, Süre 2-6 dk, Etanol konsantrasyonu %0-80)

Bitki ve bitkisel kaynaklı gıdalarda polifenoller ve flavonoidler arasında önemli bir korelasyon olduğu literatürde birçok çalışmada belirtilmiştir (Alothman vd., 2009; Lim vd., 2019). Benzer şekilde, yapılan bu çalışmada da toplam fenolik ve toplam flavonoid maddelerin bağımsız değişkenlerden etkilenme davranışlarının genel olarak birbirleriyle uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

4.5. Antioksidan Aktivite Yanıtının Optimizasyon Süreci

4.5.1. Model Seçimi

Model uygunluğunu belirlemek amacıyla uyum eksikliği testleri uygulanmıştır (Çizelge 4.10). %95 güven aralığında gerçekleştirilen model seçiminde karesel modelin P-değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0,05). Merkez noktaların tekrarlanmasıyla belirlenen uyum eksikliği değeri karesel model için hatanın önemsiz olduğunu ve modelin anlamlı olduğunu belirtmektedir (P>0,05). Karesel modelin R^2 değeri 0,9323 olarak tespit edilmiştir. Tahminlenen R^2 değeri (0,6901) ve düzeltilmiş R^2 değeri (0,8691) arasındaki farkın 0,2'den küçük olması modelin yeterli ve uyum içinde olduğunun diğer bir ölçütüdür. Model seçiminde tahmin edilen artık hata karelerinin toplamının (PRESS) en küçük değer olması istenmektedir. Karesel modelin PRESS

değeri istenildiği gibi diğer modellerden daha düşük bir değer (4,29E+01) olarak tespit edilmiştir. Ek olarak, model seçiminde sinyal ve gürültü oranının ölçüldüğü yeterli hassasiyet katsayısının 4'ten büyük olması önemlidir. Karesel modelde yeterli hassasiyet katsayısı 15,121 bulunmuş ve uygun olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca varyasyon katsayısı (%CV) antioksidan aktivite yanıtı için %4,49 olarak bulunmuştur. CV değerlerinin %5'ten küçük olması modelin deneysel değerleri yüksek oranda tahmin ettiğini göstermektedir.

Çizelge 4.10. Ekstraktların antioksidan aktivite yanıt değişkeni için elde edilen modellerin uyum istatistiği verileri

Model	P-değeri	R^2	Düzeltilmiş R^2	Tahminlenen R^2	Uyum Eksikliği	Standart Sapma	PRESS
Doğrusal	< 0.0001	0,6742	0,6220	0,5066	0,0607	1,3400	6,83E+01
2FI	0,3617	0,7622	0,6370	0,5531	0,0603	1,3200	6,18E+01
Karesel	**0,0005**	**0,9323**	**0,8691**	**0,6901**	**0,3979**	**0,7903**	**4,29E+01**
Kübik	0,2161	0,9783	0,9099	0,5121	0,6714	0,6555	6,75E+01

4.5.2. Modelin ANOVA ile İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Karesel modelin uygulandığı antioksidan aktivite yanıtı için varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.11'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.11. Antioksidan aktivite yanıtı için varyans analizi sonuçları

Kaynak	Kareler Toplamı	SD	Karelerin Ortalaması	F-değeri	p-değeri	
Model	1,29E+02	14	9,21E+00	14,75	< 0.0001	Önemli
Doğrusal etkiler						
A-Genlik	6,17E-01	1	6,17E-01	0,9881	0,336	
B-Sıcaklık	0,9538	1	0,9538	1,53	0,2355	
C-Süre	11,85	1	11,85	18,98	0,0006	
D-Etanol Kons.	7,99E+01	1	7,99E+01	127,85	< 0.0001	
İkili etkileşim						
AB	4,1	1	4,1	6,56	0,0217	
AC	0,1362	1	0,1362	0,218	0,6472	
AD	2,99	1	2,99	4,78	0,045	
BC	0,2989	1	0,2989	0,4786	0,4996	
BD	3,3	1	3,3	5,28	0,0363	
CD	1,36	1	1,36	2,18	0,1604	
Karesel etki						
A^2	1,94E+00	1	1,94E+00	3,11	0,098	
B^2	7,13E+00	1	7,13E+00	11,41	0,0041	
C^2	4,24	1	4,24	6,78	0,0199	
D^2	8,19E+00	1	8,19E+00	13,11	0,0025	
Artık	9,37E+00	15	0,6245			
Uyum Eksikliği	6,80E+00	10	0,6803	1,33	0,3979	Önemsiz
Saf Hata	2,56E+00	5	0,5129			
Toplam	1,38E+02	29				

SD: Serbestlik derecesi

Modelin F-değerinin 14,75 olması ve P-değeri'nin 0,05'ten küçük olması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.11'de A: Genlik (%), B: Sıcaklık (°C), C: Süre (dk) D: Etanol Konsantrasyonu (%) olarak tanımlanan bağımsız değişkenleri temsil ederken, A, B, C ve D doğrusal etkileri, AB, AC, AD, BC, BD ve CD ikili etkileşimleri, A^2, B^2, C^2 ve D^2 karesel etkileri ifade etmektedir. Model terimlerinin P-değerleri incelendiğinde sürenin doğrusal etkisi (C) (P<0,01), etanol konsantrasyonun doğrusal etkisi (D) (P<0,01), genlik-sıcaklık ikili etkileşiminin etkisi (AB) (P<0,05), genlik-etanol konsantrasyonu ikili etkileşiminin etkisi (AD) (P<0,05), sıcaklık-etanol konsantrasyonu ikili etkileşiminin etkisi (BD) (P<0,05), sıcaklığın karesel etkisi (B^2) (P<0,01), sürenin karesel etkisi (C^2) (P<0,05) ve etanol konsantrasyonun karesel etkisinin (D^2) (P<0,01) anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer

terimler istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (P>0,05). Modelin analizi, doğrusal etkiler arasında etanol konsantrasyonun en önemli faktör olduğunu göstermiştir.

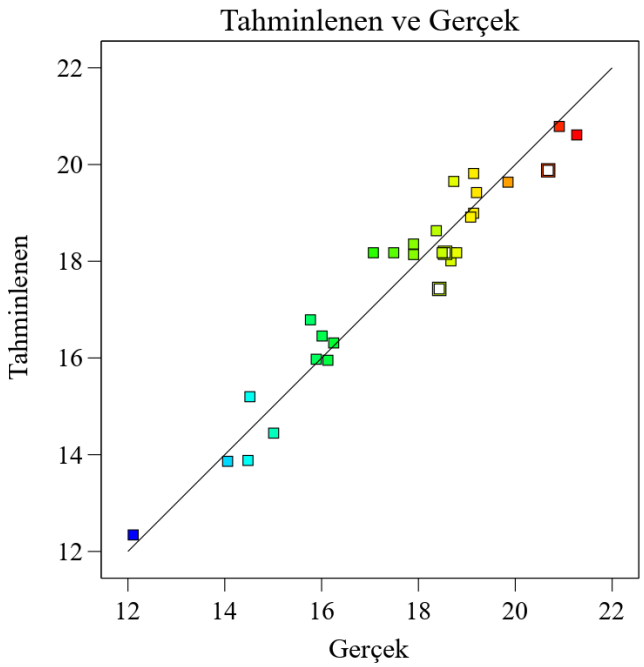
Değişkenlerin antioksidan aktivite üzerine olan etkisini ifade eden matematiksel model Eşitlik 4.3'te verilmiştir. Denklem kodlanmış faktörler cinsinden ifade edilmiştir. Terimlerin önündeki pozitif işaret yanıt üzerindeki olumlu etkiyi gösterirken, negatif işaret olumsuz etkiyi ifade etmektedir.

$$
\begin{aligned}
\textit{Antioksidan Aktivitesi} = {} & +18{,}18 \\
& -0{,}1603\ \textit{Genlik} \\
& +0{,}1994\ \textit{Sıcaklık} \\
& -0{,}7028\ \textit{Süre} \\
& -1{,}82\ \textit{Etanol konsantrasyonu} \\
& -0{,}5059\ \textit{Genlik*Sıcaklık} \\
& +0{,}0923\ \textit{Genlik*Süre} \\
& -0{,}432\ \textit{Genlik*Etanol konsantrasyonu} \\
& +0{,}1367\ \textit{Sıcaklık*Süre} \\
& +0{,}4541\ \textit{Sıcaklık*Etanol konsantrasyonu} \\
& -0{,}2918\ \textit{Süre*Etanol konsantrasyonu} \\
& -0{,}2662\ \textit{Genlik}^2 \\
& +0{,}5098\ \textit{Sıcaklık}^2 \\
& -0{,}3929\ \textit{Süre}^2 \\
& -0{,}5464\ \textit{Etanol konsantrasyonu}^2
\end{aligned}
\tag{4.3}
$$

İstatistiksel olarak anlamlı bulunan etkilerden etanol konsantrasyonu (D) faktörünün 1,82 katsayı ile en yüksek etkiye sahip olduğu görülmektedir. Etanol konsantrasyonu ($\beta_{4=}$ - 1,82), süre (β_3= - 0,7028) ve genlik (β_1= - 0,1603) faktörlerinin antioksidan aktivite yanıtı üzerinde negatif etkisi olduğu, ekstraksiyonda kullanılan etanol konsantrasyon miktarının arttıkça ekstraktta tespit edilen antioksidan aktivitenin azaldığı görülmüştür. Benzer olarak, Ilaiyaraja vd. (2015) *Feronia limonia* (odun elma) meyvesinden elde ettikleri ultrasonik ekstrakttın antioksidan aktivitesinde sıcaklık-etanol konsantrasyonu ikili etkileşim etkisinin önemli olduğunu ve etkileşimin süreci negatif etkilediğini bildirmiştir. Sıcaklığın karesel etkisi (β_{22}= + 0,5098) ekstraksiyon

üzerinde olumlu etkiye sahipken, sürenin (β_{33}= - 0,3929) ve etanol konsantrasyonun (β_{44}= - 0,5464) karesel etkisinin ekstraksiyon üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Gelmez (2008) yaptığı çalışmada kavrulmuş buğday tohumundan UDE yöntemiyle antioksidanları ekstrakte etmiş, sürenin (β_{11}= - 14.541) ve etanol konsantrasyonunun (β^{33}= - 13.790) karesel etkisinin ekstraksiyon işleminde önemli (P<0,05) derecede olumsuz etkiye sahip olduğunu raporlamıştır.

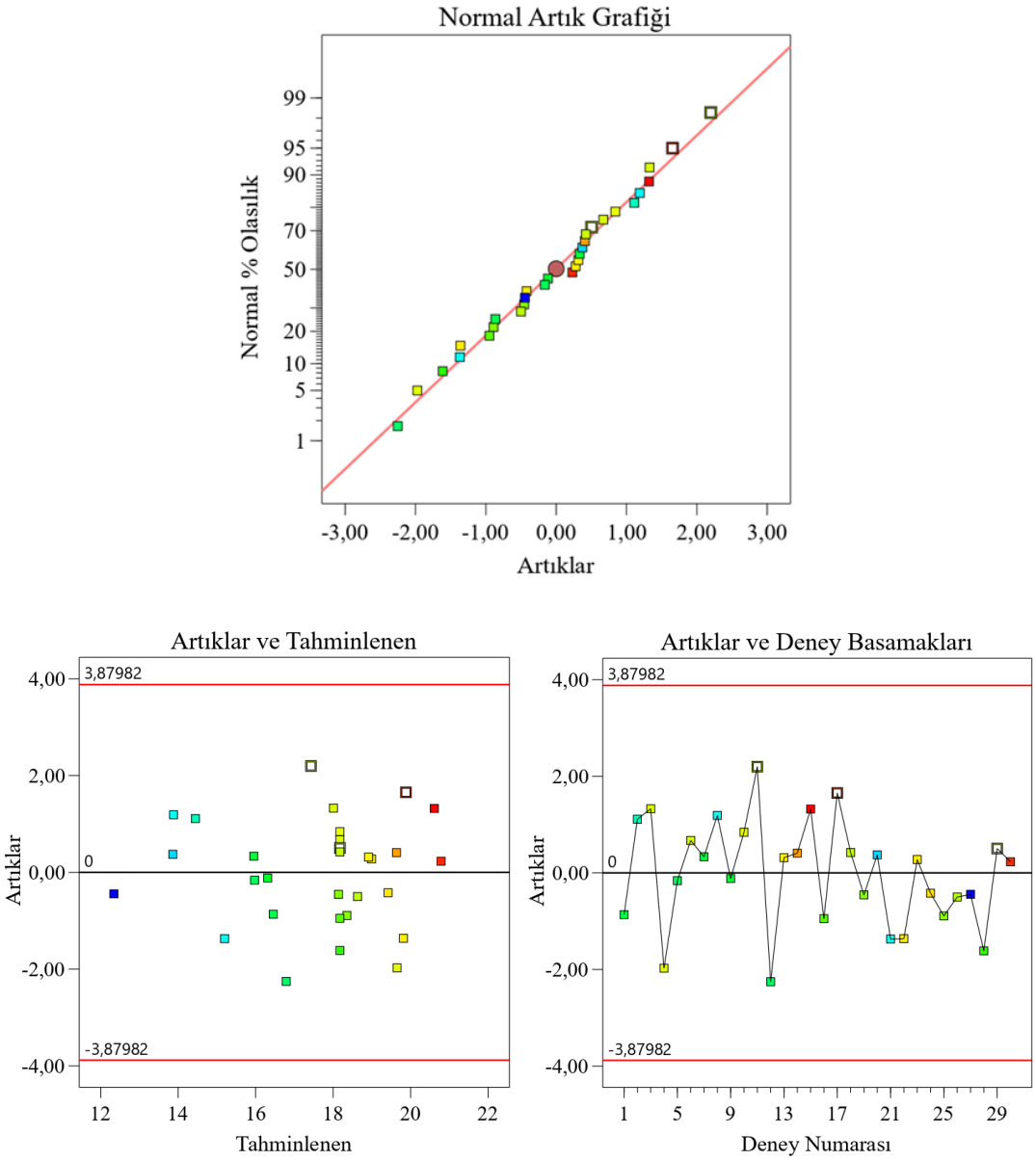
Deney basamaklarına karesel modelin uygulanmasıyla hesaplanan tahmin edilen (predicited) veriler ile gerçek (actual) veriler Şekil 4.17'de gösterilmektedir. Gerçek ve tahminlenen değerler arasında doğrusal bir ilişki ve uyum olduğu gözlemlenmektedir. Bu nedenle karesel model bağımsız değişkenler için uygun olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.17. Ekstraktların karesel model üzerinde antioksidan aktivite yanıtı için tahminlenen ve gerçek verileri

Karesel model üzerinde tahminlenen değerler ile gerçek değerler arasındaki farkı gösteren artık grafikleri Şekil 4.18'de gösterilmektedir. Şekil 4.18.a'da gösterilen normal % olasılık ve artık grafiğinde verilerin doğrusal dağılım göstermesi

matematiksel modelin parametrelerinin etkileşimini başarılı bir şekilde ifade ettiğinin göstergesidir. Buna uygun olarak, karesel modelde artıkların doğrusal dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Şekil 4.18.b'de model üzerinden belirlenen tahminlenen değerler ile artıkların karşılaştırıldığı grafik ve Şekil 4.18.c'de ise deney numaralarına karşı gelen gerçek değerler ile artıkların karşılaştırıldığı grafik gösterilmektedir. Her iki grafiktede kırmızı çizgi ile belirtilen y=3,87982 ve y=-3,87982 sınırları %95 güven aralığını temsil etmektedir. Değerlerin bu sınırlar içerisinde dağınık halde bulunması modelin tahmin yeteğinin iyi olduğunu göstermektedir. Her iki grafikte de değerlerin uygun olarak konumlandığı gözlemlenmektedir.

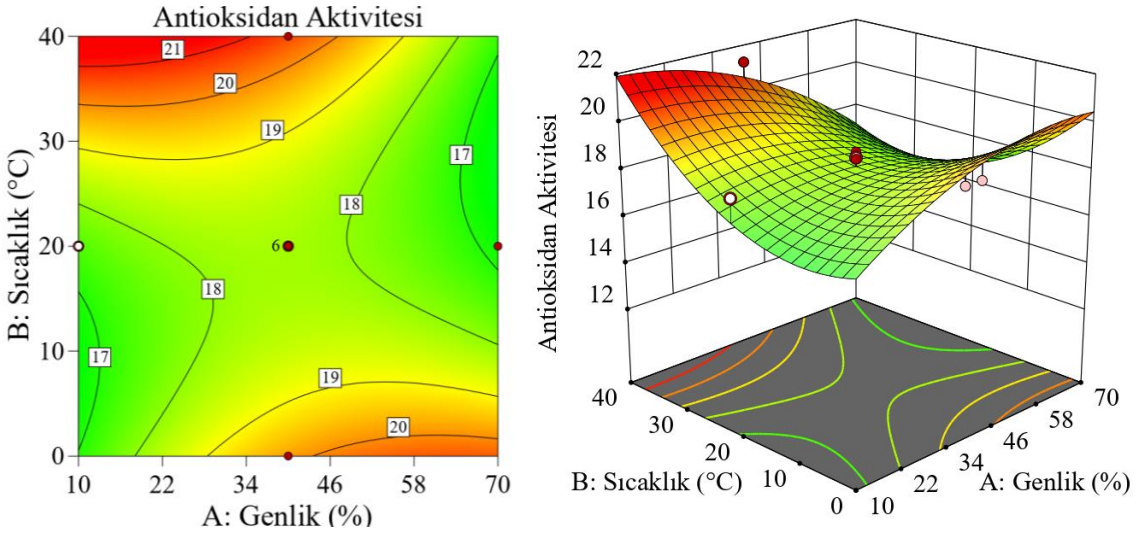


Şekil 4.18. Ekstraktların karesel model ile belirlenen antioksidan aktivitesi yanıtının artık grafikleri: **a.** Normal % Olasılık dağılıma karşı grafiği, **b.** Tahminlenen verilere karşı grafiği, **c.** Gerçek verilere karşı grafiği

4.5.3. Faktörlerin İkili Etkileşimlerinin Antioksidan Aktivite Yanıt Değişkenine Etkilerini Gösteren Grafiklerin İncelenmesi

Sabit %40 etanol konsantrasyonunda 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesi sıcaklığın veya genliğin artmasıyla artmıştır (Şekil 4.19). Bu koşullarda en yüksek antioksidan aktivite değeri

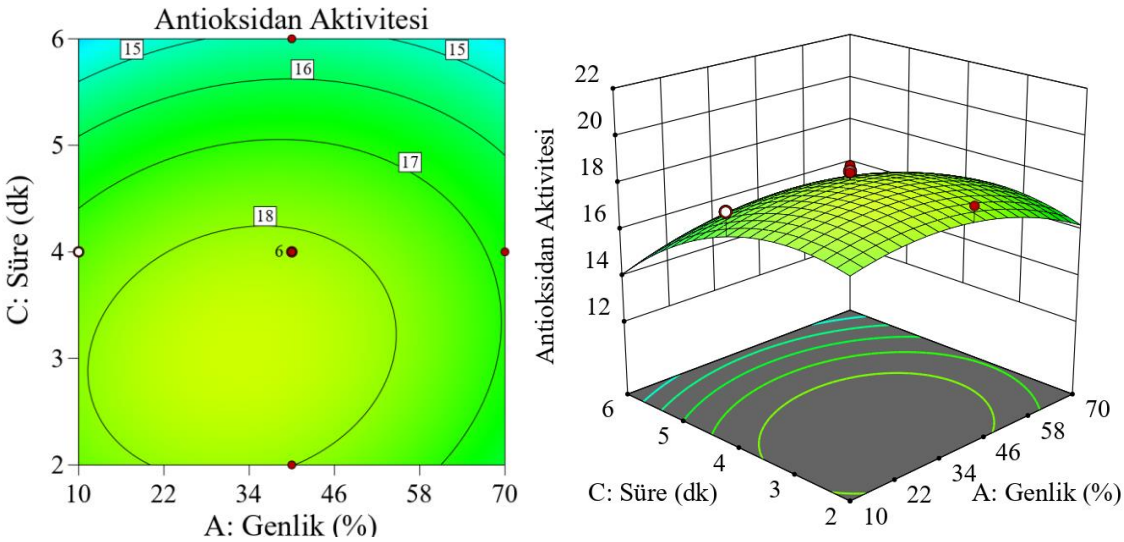
(20,89 mmol TE/kg LF) %10 genlikte 40 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Yine bu koşullarda %10 genlikte 34 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla 20 mmol TE /kg LF antioksidan aktivite tespit edilebiliyorken, benzer şekilde %58 genlikte 2 °C sıcaklıkta da aynı değer tespit edilebilmektedir. Genlik ve sıcaklık faktörlerinin birbirlerine zıt yönde ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Ultrasonik güç ve sıcaklık faktörlerinin olumlu etkisi kütle transfer sürecini güçlendirmelerine bağlanmıştır (Altemimi, 2015). İki faktöründe eş zamanlı artması ortamdaki sıcaklığı daha da arttıracaktır. Oluşan yüksek sıcaklık, daha düşük sıcaklıkta harekete geçirmek için daha uygun olabilecek termo-duyarlı antioksidanların denatürasyonuna yol açacaktır (Jing vd., 2015). Tomsik vd. (2016) benzer sonucu bularak *A. ursinum* ekstraktlarında en yüksek antioksidan aktiviteyi tespit edebilmek için daha düşük ultrasonik güçte daha yüksek sıcaklıklar uygulanmalısını tavsiye etmişlerdir.



Şekil 4.19. Sabit etanol konsantrasyonu ve sürede, sıcaklık ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Etanol konsantrasyonu %40, Sıcaklık 0-40 °C, Genlik %10-70)

Sabit %40 etanol konsantrasyonunda ve 20 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesi, sürenin ve/veya genliğin artmasıyla azalmıştır (Şekil 4.20). Bu koşullarda en yüksek antioksidan aktivite miktarı (18,54 mmol TE /kg LF) %32 genlikte 2,8 dk ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Daha yüksek ultrasonik güç, daha fazla hücre duvarının hasar görmesine neden olarak fenolik bileşikler de dahil olmak üzere

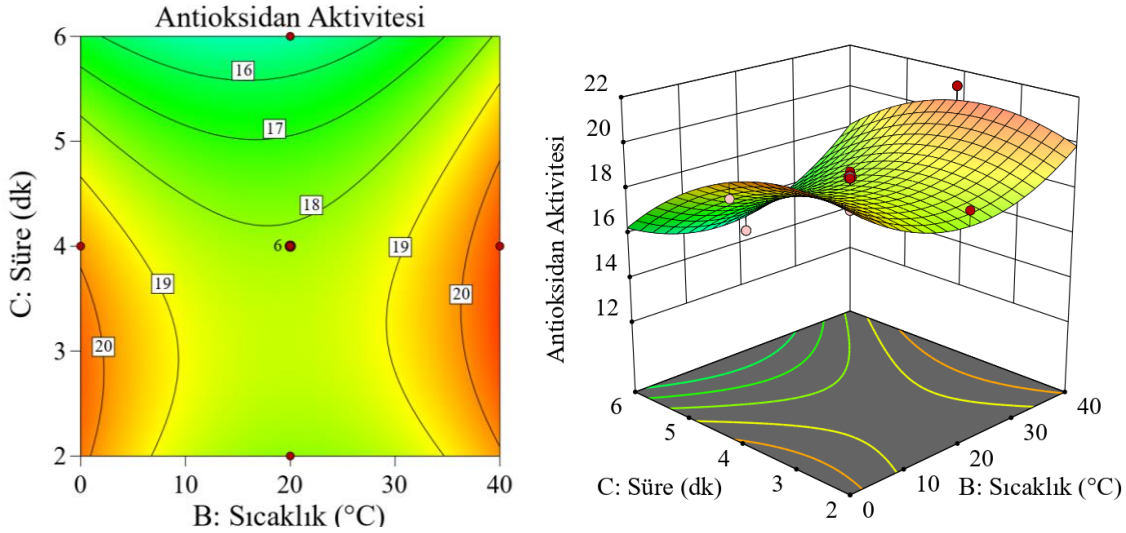
daha fazla antioksidanın salınmasına neden olmaktadır, ancak antioksidan aktiviteye katkıda bulunan askorbik asit ve karotenoidler gibi diğer bazı antioksidan bileşiklerin bozunmasına neden olduğu da belirtilmiştir (Tomsik vd., 2016). Bu koşullarda sabit %40 genlikte uygulanan ekstraksiyon işleminde, ekstraktın antioksidan aktivitesi 2. dakikada 18 mmol TE /kg LF, 4. dakikada 18,17 mmol TE /kg LF ve 6. dakikada 15,19 mmol TE /kg LF olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.20). İlk 4 dakikada sürenin etkili olmadığı ancak 4 dakikadan sonra azaltıcı etki sergilediği görülmektedir. Bu gibi ekstraksiyon işlemlerinde daha uzun sürelerin daha fazla enerjiyi sisteme dahil ettiği ve geri kazanılan bileşiklerin parçalanabildiği raporlanmıştır (Jing vd., 2015).



Şekil 4.20. Sabit etanol konsantrasyonu ve sıcaklıkta, süre ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık 20 °C, Etanol konsantrasyonu %40, Süre 2-6 dk, Genlik %10-70)

Sabit %40 etanol konsantrasyonunda ve %40 genlikte ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, ekstraktların antioksidan aktivitesinin 20 °C'den sonra sıcaklık uygulamasının arttırılması ve azaltılması ile doğrusal olarak arttığı ve azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.21). Bu koşullarda 0 °C sıcaklıkta 2 dk ekstraksiyon işlemi uygulandığında antioksidan aktivitesi 20 mmol TE /kg LF olarak tespit edilirken, benzer şekilde 40°C sıcaklıkta 2,1 dk ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla aynı antioksidan içeriği elde edilebilmektedir. Sıcaklık arttıkça azalma eğilimi gösteren antioksidan bileşiklerin difüzyon ve çözünürlük oranları, daha yüksek bir ekstraksiyon sıcaklığı ile

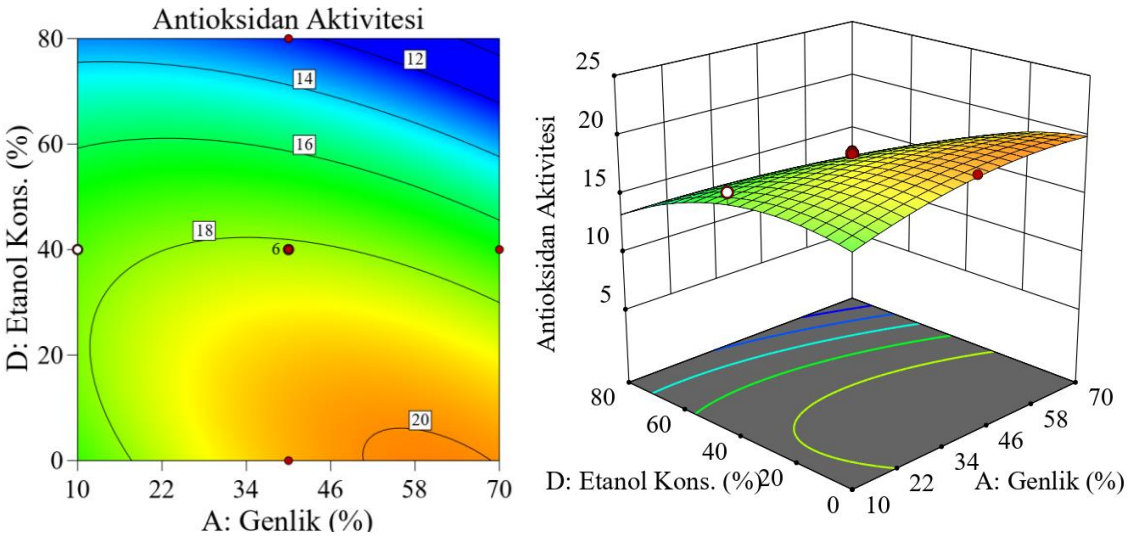
artmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığı, hem antioksidan bileşiklerin parçalanması hem de diğer bileşenlerle reaksiyona girmesi sebebiyle ekstraktların antioksidan aktivitesini etkileyen önemli bir faktördür (Şahin, 2018). Yüksek sıcaklık uygulamalarının antioksidan bileşiklerin çözünürlüğünü arttırarak ekstrakta geçişini kolaylaştırdığı belirtilirken (Liang vd., 2017) ve aynı zamanda antioksidan bileşiklerin termal bozunması için önemli bir risk oluşturduğu da vurgulanmaktadır (Şahin, 2018).



Şekil 4.21. Sabit etanol konsantrasyonu ve genlikte, süre ve sıcaklık değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Genlik %40, Etanol konsantrasyonu %40, Süre 2-6 dk, Sıcaklık 0-40 °C)

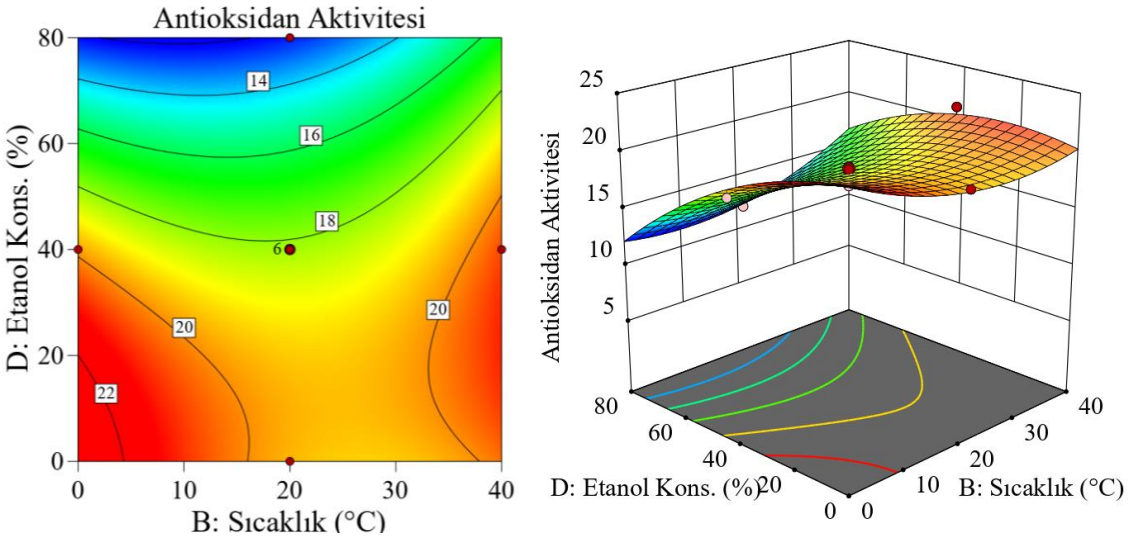
Sabit 20 °C sıcaklıkta 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, ekstraktların antioksidan aktivitesi, %0 ile %40 konsantrasyon aralığında sabit kalırken, bu konsantrasyondan sonra etanol konsantrasyonunun artmasıyla azalmıştır (Şekil 4.22). Bu koşullarda en yüksek antioksidan aktivite miktarı (20,1 mmol TE /kg LF) %0 etanol konsantrasyonunda %59 genlikte ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Ekstraktın antioksidan aktivitesi, polifenollerin kimyasal yapıları tarafından belirlenen bileşik veya sinerjistik etkisinden etkilenir. Bu nedenle polifenol içeriğindeki değişim, antioksidan aktivitede gözlenen değişime işaret eder ve böylece aralarında pozitif bir korelasyon olduğunu gösterir (Ilaiyaraja vd., 2015). Etanol konsantrasyonunun toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarındaki azaltıcı etkisi, ABTS radikal süpürme aktivitesinde gözlemlenen değişikliğe atfedilebilir. Bu nedenle toplam fenolik madde ve toplam flavonoid madde miktarındaki

azalışın, ABTS radikal süpürme aktivitesinin azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Çözücü olarak saf su tercih edildiğinde (%0 etanol konsantrasyonu) genlik arttıkça antioksidan aktivitenin arttığı görülmektedir (Şekil 4.22).



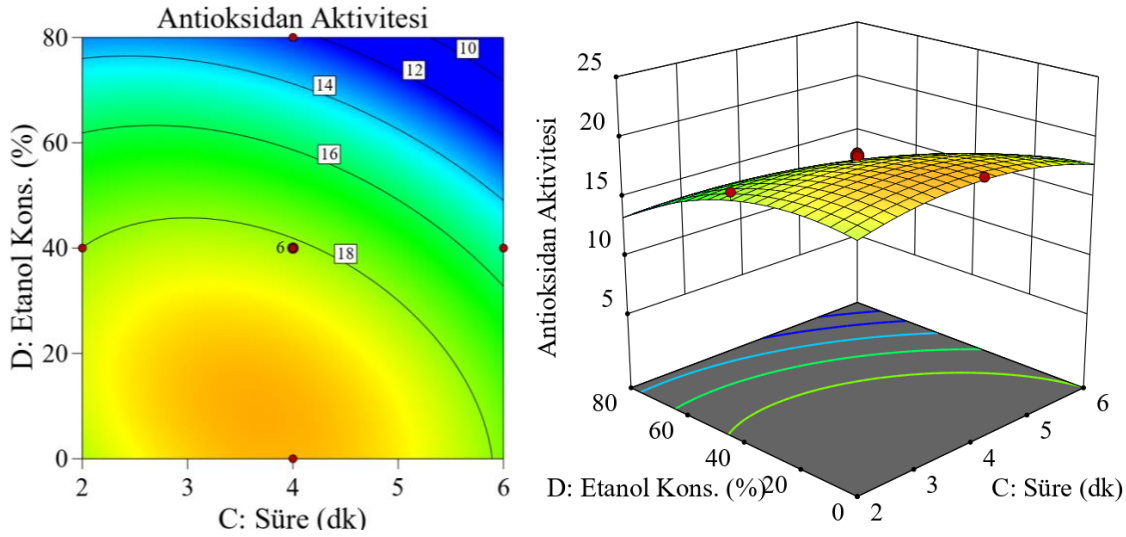
Şekil 4.22. Sabit süre ve sıcaklıkta, etanol konsantrasyonu ve genlik değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Sıcaklık 20 °C, Genlik %10-70, Etanol konsantrasyonu %0-80)

Sabit %40 genlikte 4 dk ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, ekstraktların antioksidan aktivitesi, %40 etanol konsantrasyonunun artmasıyla azalmıştır (Şekil 4.23). Bu koşullarda en yüksek antioksidan aktivite değeri (23,09 mmol TE /kg LF) %0 etanol konsantrasyonunda 0 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Yine %0 etanol konsantrasyonunda 40 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla antioksidan aktivite 20,26 mmol TE /kg LF olarak tespit edilmiştir. Yüksek sıcaklık uygulamalarında, antioksidan aktivitenin azalmasının nedeni olarak, bazı polifenollerin kimyasal ve termal bozunması ile verim düşüşü oluşması gösterilmiştir (Ilaiyaraja vd., 2015).



Şekil 4.23. Sabit süre ve genlikte, etanol konsantrasyonu ve sıcaklık değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Süre 4 dk, Genlik %40, Sıcaklık 0-40 °C, Etanol konsantrasyonu %0-80)

Sabit %40 genlikte 20 °C sıcaklıkta ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmesi durumunda, ekstraktların antioksidan aktivitesi 4 dakikadan kısa uygulamalarda ve yaklaşık %40 etanol konsantrasyonundan fazla etanol konsantrasyonu uygulamasıyla azalmıştır (Şekil 4.24). Bu koşullarda en yüksek antioksidan aktivite değeri (19,73 mmol TE /kg LF) %8 etanol konsantrasyonunda 3,7 dk ekstraksiyon işlemi uygulanmasıyla elde edilebilmektedir. Süre faktörünün 3,7. dakikaya kadar arttırıcı etkisi olduğu daha sonra işlem süresi arttıkça azaltıcı etki sergilediği görülmektedir (Şekil 4.24.). Benzer şekilde Nguyen ve Le (2016) ABTS analizi ile tahmin edilen rumduol suyunun antioksidan aktivitesinin ultrasonik süre 4 dakika olduğunda maksimum değere ulaştığını bildirmiş ve 4. dakikadan sonra azalışı uzun sanikasyon sürelerinde ekstraktta yüksek düzeyde hidroksil radikallerin üretilebileceğine atfetmiştir.



Şekil 4.24. Sabit sıcaklık ve genlikte, etanol konsantrasyonu ve süre değişkenlerinin ekstraktlardaki antioksidan aktiviteye etkisinin izohips ve yanıt yüzey grafiği (Genlik %40, Sıcaklık 20 °C, Etanol konsantrasyonu %0-80, Süre 2-6 dk)

4.6. Sürecin Optimizasyonu

Bu çalışma için yapılan ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilen ıspanak köklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde miktarları ve antioksidan aktivitesi yanıt değişkenlerini belirlemek amacıyla uygulanan deneyler sonucunda en uygun deney koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. Ekstraksiyon verimi için toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde miktarları ve antioksidan aktivitenin maksimize olduğu işlem koşulları optimum olarak seçilmiştir. Optimizasyonda kullanılan yanıtlar için istenen hedefler Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Ispanak köklerinden UDE yöntemiyle ekstrakte edilen yanıtların optimizasyonunda kullanılan alt-üst limitleri, önem ve hedefler

		Hedef	Alt Limit	Üst Limit	Alt Ağırlık	Üst Ağırlık	Önem
Değişkenler	**A:Genlik (%)**	Aralıkta	25	55	1	1	3
	B:Sıcaklık (°C)	Aralıkta	10	30	1	1	3
	C:Süre (dk)	Aralıkta	3	5	1	1	3
	D:Etanol Kons.(%)	Aralıkta	20	60	1	1	3
Yanıtlar	**Toplam Fenolik Madde (mg GAE/kg LF)**	Maksimize	3426,72	6272,55	1	1	4
	Toplam Flavonoid Madde (mg KE/kg LF)	Maksimize	441,41	2290,00	1	1	4
	Antioksidan Aktivite (mmol TE/kg LF)	Maksimize	12,11	21,27	1	1	5

Bağımsız değişkenlerde merkezi kompozit tasarıma göre +1 ve -1 olarak kodlanan değerler alt ve üst limit olarak kabul edilirken, bağımlı değişkenlerde deney basamaklarına göre yapılan denemelerde tespit edilen en düşük ve en yüksek değerler alt ve üst limit olarak kabul edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin önem seviyesi 3 olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid madde miktarı bağımlı değişkenlerinin önem seviyesi 4, antioksidan aktivitesi bağımlı değişkeninin önem seviyesi 5 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

En yüksek ekstraksiyon verimine sahip optimum koşulları bulmak için, istatistiksel bir yazılım programının (Desing Expert) istenebilirlik (1.000) fonksiyonu kullanılarak sayısal optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Program ile optimizasyonda kullanılabilecek 100 adet farklı sonuç elde edilmiş, 25 adedi Çizelge 4.13'te verilmiştir. Bu çözümler arasından programın da önermiş olduğu en yüksek istenebilirliğe sahip olan birinci çözüm optimizasyon için seçilmiştir. Seçilen çözümün istenebilirlik değerinin 0,80'den yüksek olduğu ve Lazić **(**2004)'in çalışmasında vermiş olduğu istenebilirlik katsayısı değerlendirme skalasına göre bu değerin "çok iyi" olduğu tespit edilmiştir. Optimum çözüm olarak seçilen %55 genlikte, %20 etanol

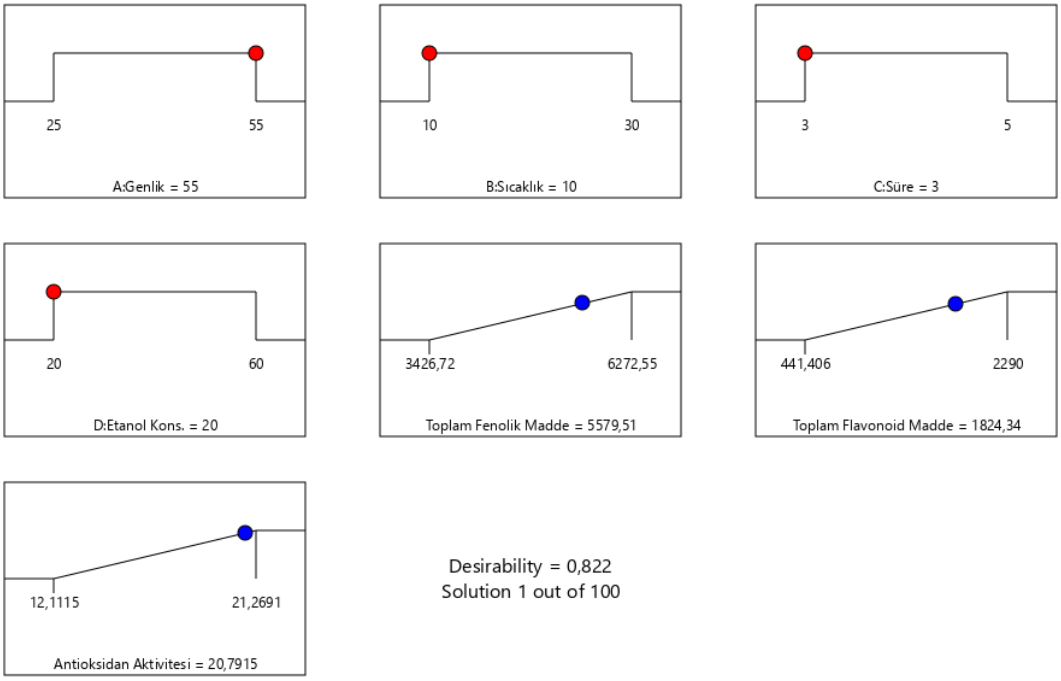
konsantrasyonunda, 10°C sıcaklıkta 3 dk yapılacak ekstraksiyon işleminin deney tasarımında belirlenen 2. standart sıra deney koşullarına denk geldiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. Süreç için Design Expert programında belirlenen optimum değerlerin sonuç listesi (25 adet)

	Genlik (%)	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Etanol Kons. (%)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/kg KM)	Toplam Flavonoid Madde (mg KE/kg KM)	Antioksidan Aktivitesi (mmol TE/kg KM)	İstenebilirlik
1	**55,000**	**10,000**	**3,000**	**20,000**	**5579,506**	**1824,336**	**20,791**	**0,822**
2	54,883	10,030	3,000	20,000	5576,484	1822,600	20,785	0,821
3	54,701	10,000	3,000	20,000	5572,622	1821,052	20,788	0,821
4	54,999	10,157	3,000	20,000	5577,837	1822,004	20,761	0,820
5	54,999	10,000	3,117	20,000	5571,327	1812,357	20,825	0,820
6	54,995	10,000	3,132	20,000	5570,363	1810,923	20,828	0,820
7	55,000	10,000	3,000	20,242	5564,814	1812,752	20,775	0,818
8	54,118	10,000	3,000	20,000	5559,419	1814,780	20,782	0,818
9	55,000	10,048	3,241	20,000	5563,912	1799,867	20,839	0,818
10	55,000	10,000	3,280	20,000	5562,639	1796,944	20,853	0,817
11	55,000	10,002	3,304	20,000	5561,633	1794,832	20,855	0,817
12	54,999	10,000	3,320	20,000	5560,969	1793,381	20,857	0,817
13	54,991	10,541	3,000	20,000	5573,843	1816,375	20,689	0,816
14	55,000	10,001	3,339	20,002	5560,178	1791,704	20,858	0,816
15	54,997	10,000	3,465	20,003	5556,251	1781,019	20,860	0,814
16	55,000	10,000	3,486	20,021	5554,726	1778,466	20,858	0,813
17	53,062	10,000	3,000	20,020	5534,918	1802,850	20,766	0,812
18	54,999	10,000	3,631	20,000	5554,191	1768,425	20,843	0,811
19	54,798	10,001	3,000	20,627	5537,028	1792,347	20,747	0,810
20	55,000	10,000	3,683	20,001	5554,111	1764,754	20,834	0,810
21	54,335	10,000	3,658	20,000	5539,757	1759,058	20,829	0,807
22	51,865	10,011	3,000	20,000	5510,562	1791,773	20,746	0,806
23	55,000	10,008	3,858	20,000	5556,112	1753,327	20,784	0,806
24	55,000	10,000	3,494	20,451	5528,219	1757,430	20,825	0,805
25	54,847	10,000	3,861	20,015	5552,092	1750,782	20,781	0,805

Şekil 4.25'te her bir bağımsız değişken ve bağımlı değişken için verilen rampa grafikleri ve seçilen optimum koşuldaki değerler ve bu değerlerin alt ve üst limitlerine göre konumu gösterilmiştir. Bu koşullarda toplam fenolik madde miktarı 5579,51 mg

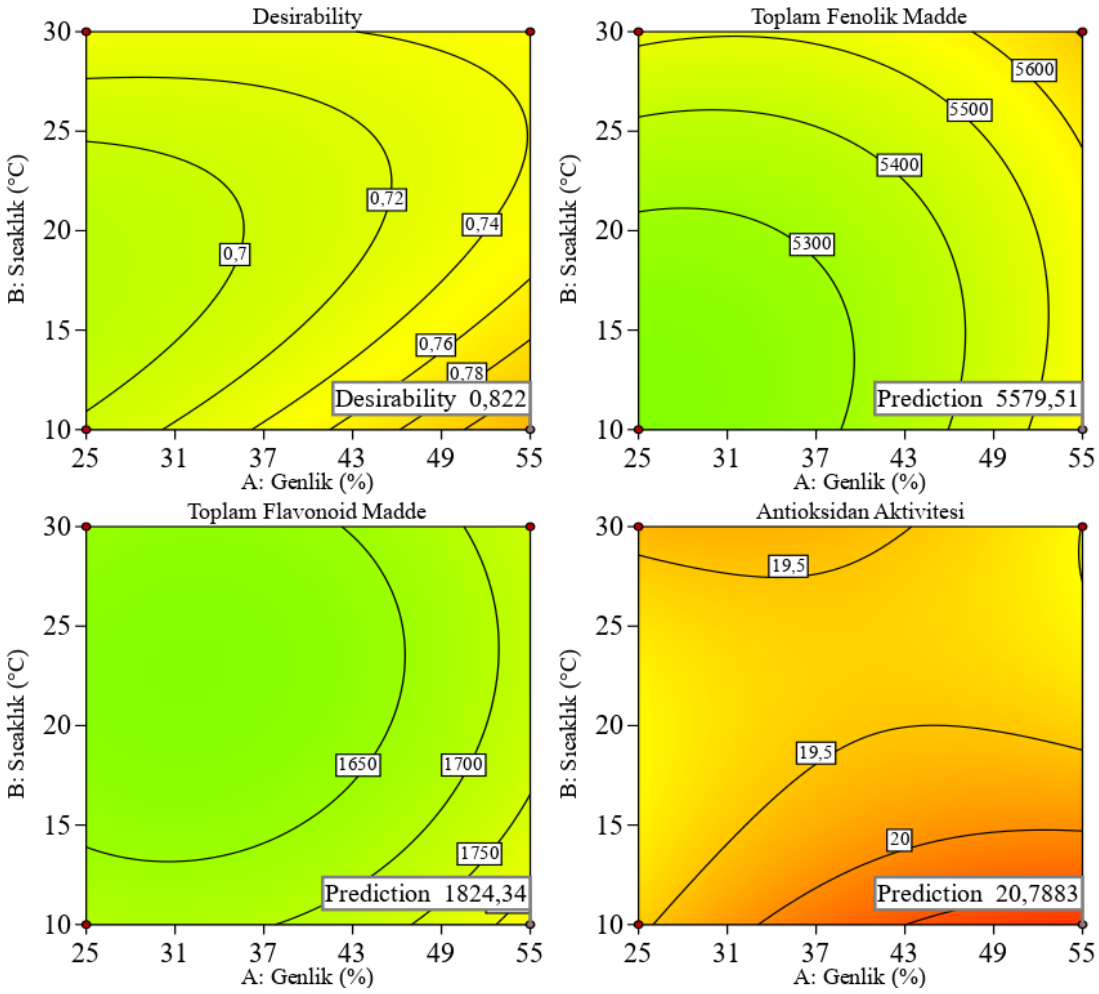
GAE/kg LF, toplam flavonoid madde miktarı 1824,34 mg KE/kg LF ve antioksidan aktivite 20,79 mmol TE/kg LF olarak tahminlenmiştir. Tahminlenen sonuçların 2. standart sıra deney basamağında tespit edilen miktarlarla (toplam fenolik madde miktarı 5719,83 mg GAE/kg LF, toplam flavonoid madde miktarı 1972,66 mg KE/kg LF ve antioksidan aktivite 20,91 mmol TE/kg LF) uyuştuğu gözlemlenmiştir. İstenebilirlik değeri 0,822 olan optimum koşullarda toplam fenolik madde miktarının %31,55 ve toplam flavonoid madde miktarının %66,8 arttığı, antioksidan aktivitesinin ise %11,15 azaldığı tespit edilmiştir.



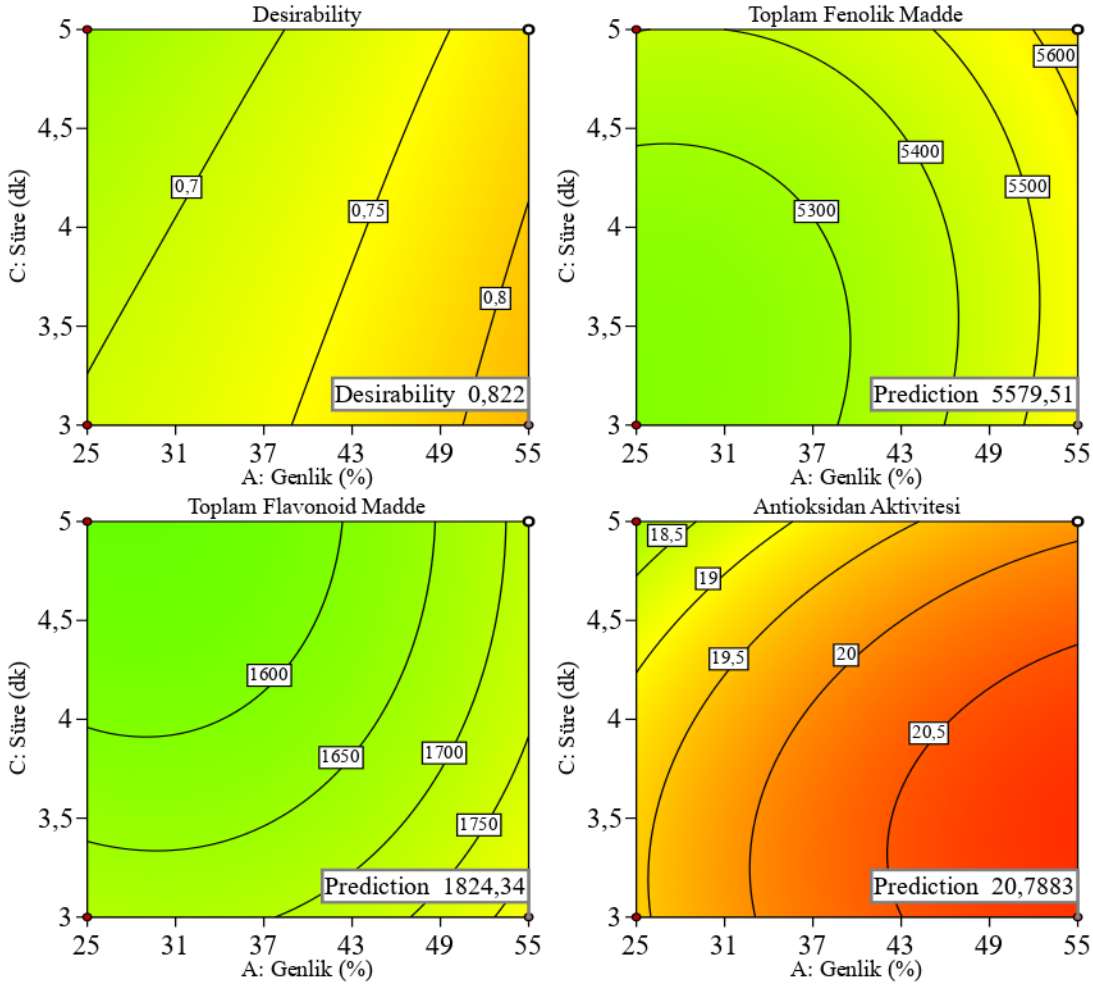
Şekil 4.25. Ispanak köklerinden UDE yöntemiyle ekstrakte edilen toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde içerikleri ve antioksan aktivitenin ekstraksiyon sürecinin optimizasyonunda optimum koşulları (A:Genlik (%), B:Sıcaklık (°C), C:Süre (dk), D:Etanol konsantrasyonu (%)) ve toplam fenolik madde (mg GAE/kg LF), toplam flavonoid madde (mg KE/kg LF) içerikleri ve antioksan aktivite değeri (mmol TE/kg LF) için elde edilen rampa grafikleri

Ekstraksiyon sürecinin optimizasyonunda kullanılan herhangi bir faktörün, seçilen optimum koşullarda sabit tutulmasıyla elde edilen istenebilirlik, toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi artışı izohips grafikleri Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de

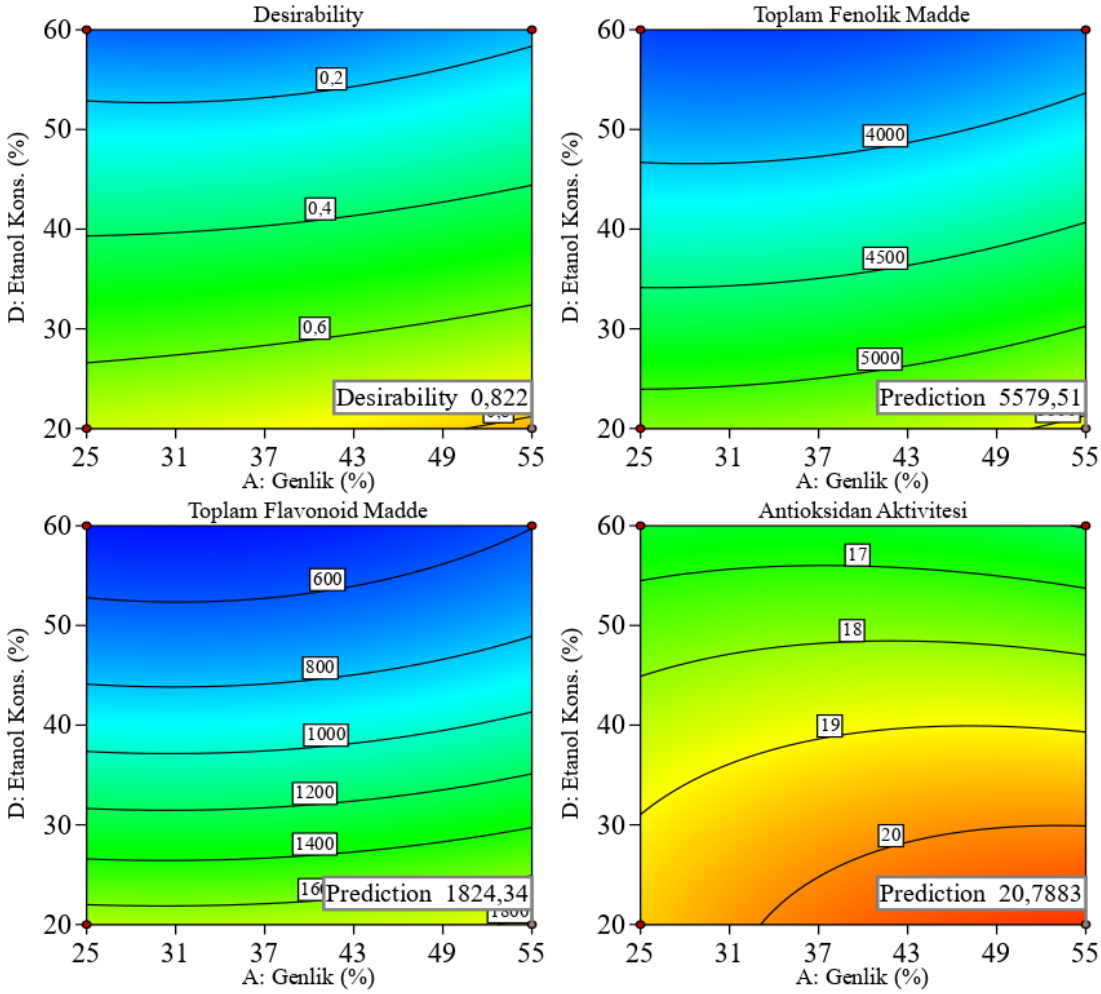
gösterilmiştir. Tüm faktör etkileşimlerinde, belirlenen optimum koşulların en yüksek istenebilirlik seviyesinde olduğu gözlemlenmiştir.



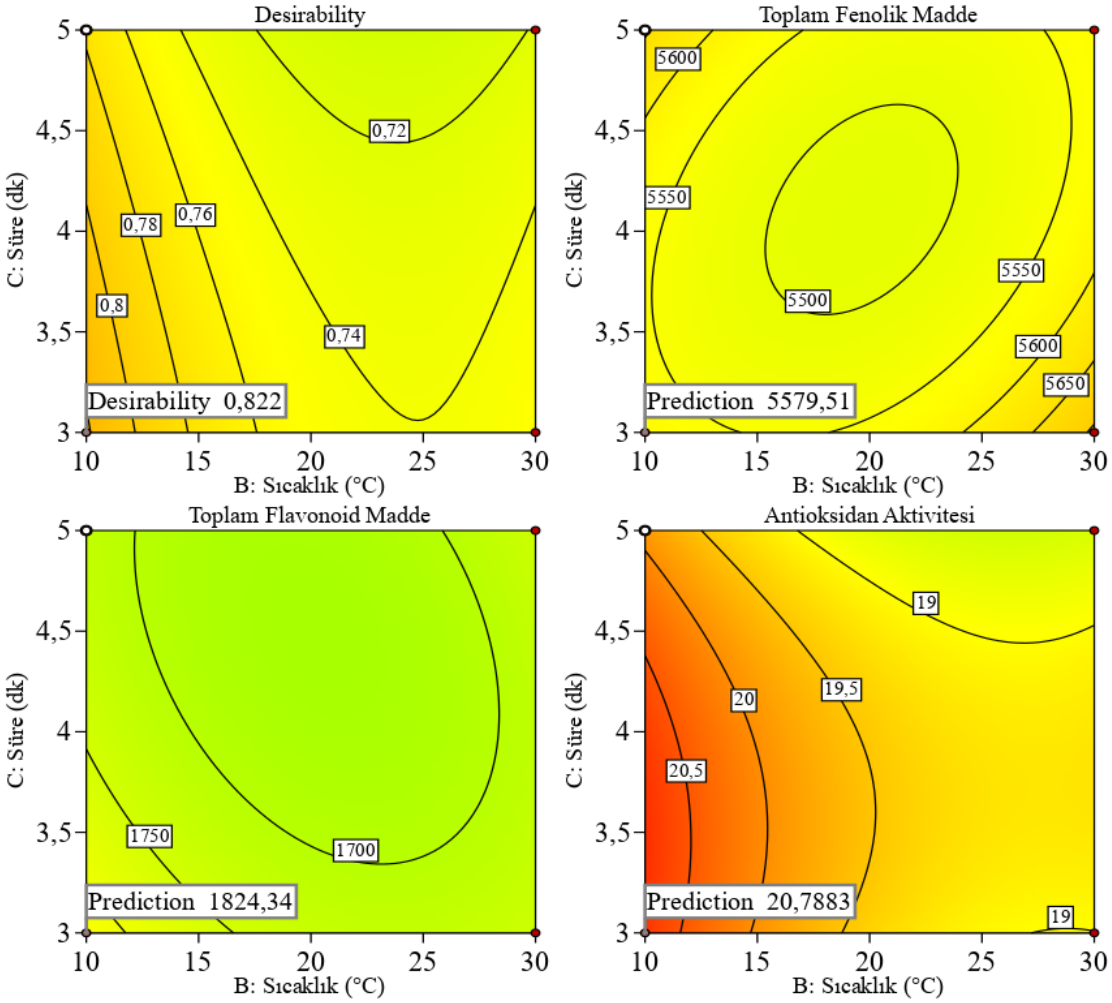
Şekil 4.26. Optimum koşullarda sıcaklık ve genlik faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri



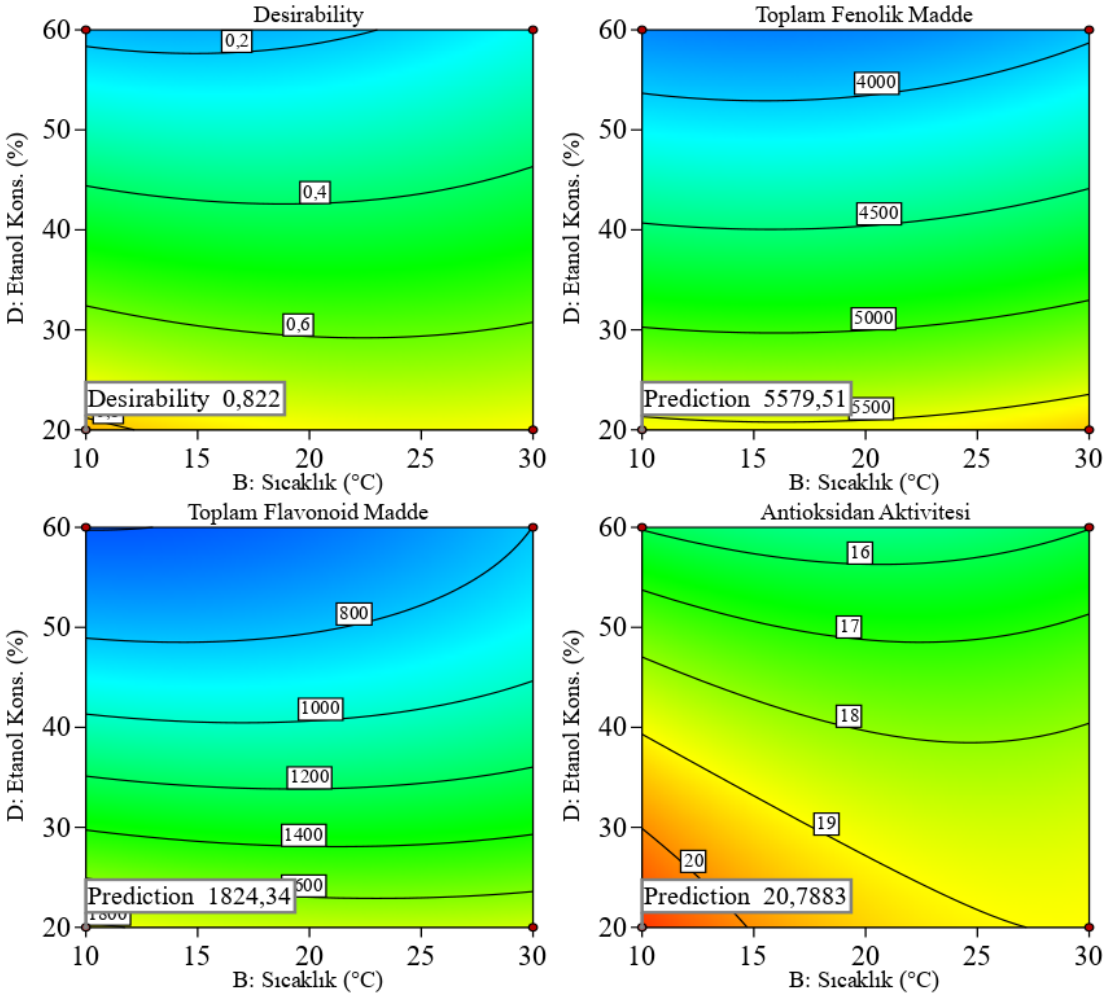
Şekil 4.27. Optimum koşullarda süre ve genlik faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri



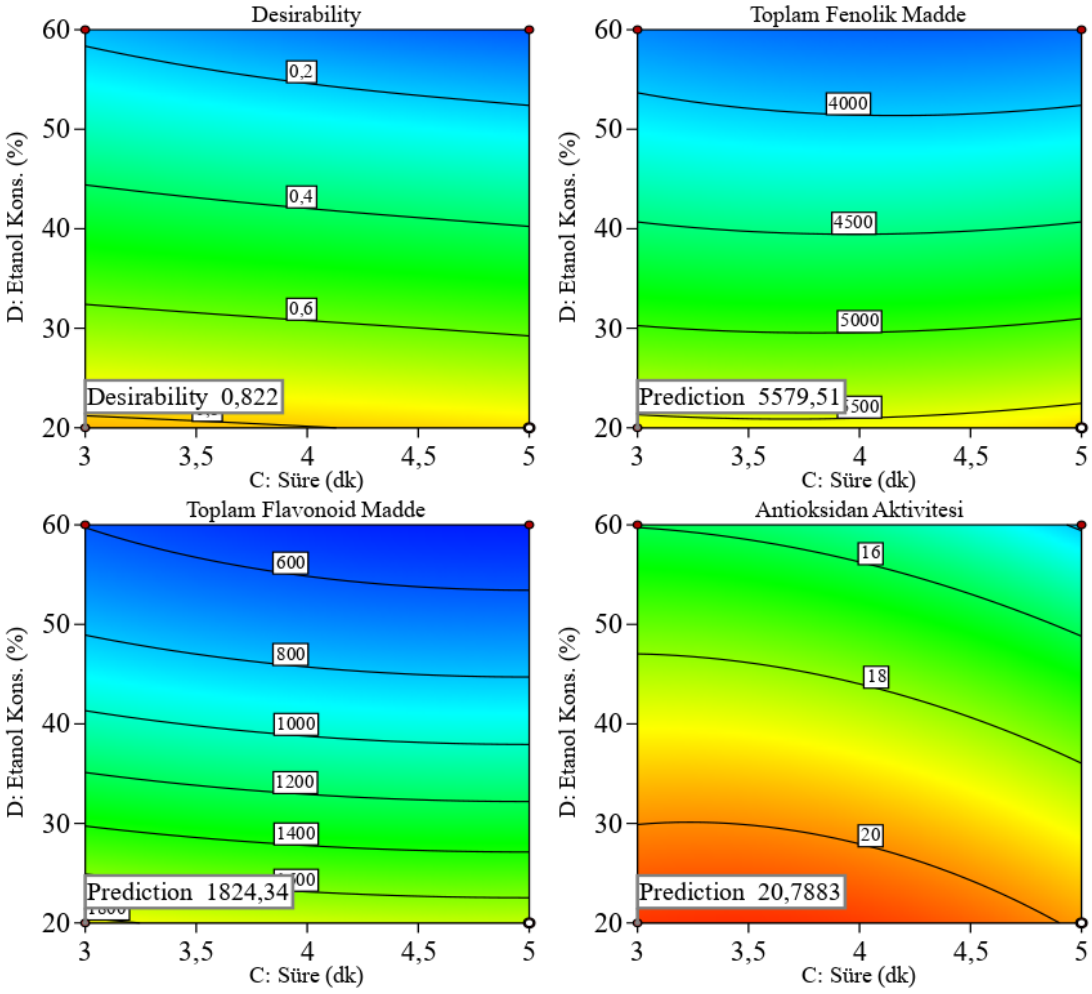
Şekil 4.28. Optimum koşullarda etanol konsantrasyonu ve genlik faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri



Şekil 4.29. Optimum koşullarda süre ve sıcaklık faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri



Şekil 4.30. Optimum koşullarda etanol konsantrasyonu ve sıcaklık faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri



Şekil 4.31. Optimum koşullarda etanol konsantrasyonu ve süre faktör etkileşiminin toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi ile istenebilirlik değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren izohips grafikleri

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada ıspanak kökünde bulunan fenolik bileşikler, flavonoid maddeler ve antioksidan maddeler gibi biyoaktif bileşiklerin geri kazanılması hedeflenmiştir. Ispanak, C vitamini, fenolik asitler ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşenler bakımından zengindir ve zengin besin içeriği insan sağlığı açısından önemini arttırmaktadır. Literatürde ıspanak yaprakları ve saplarının biyoaktif içeriklerine ait bilgi bulunmasına rağmen ıspanak kökü ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmayla birlikte ıspanak kökünün temel kimyasal içeriği, mineral kompozisyonu, fenolik madde dağılımı, toplam fenolik madde miktarı, toplam flavonoid madde miktarı ve antioksidan aktivitesi literatüre kazandırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi için tercih edilen yeşil ve yenilikçi ultrason destekli yöntem geleneksel yöntemlere kıyasla daha kısa sürede, ısıya duyarlı biyoaktif bileşenleri koruyarak, yüksek verimde sonuçlar elde edilmesini sağlamıştır.

Ispanak kökünden fenolik bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) yöntemi ile geri kazanılması amacıyla gerçekleştirilen bu çalışmada ıspanak köklerinde bulunan fenolik bileşiklerin yüksek verim ile ekstrakte edilebilmesi için süreç optimize edilmiştir. Süreç değişkenlerinin ekstraktların toplam fenolik madde miktarına, toplam flavonoid madde miktarına ve antioksidan aktivitesine olan etkilerinin belirlenmesi için yanıt yüzey yöntemine göre merkezi kompozit tasarım uygulanmıştır. Denemeler genlik, sıcaklık, süre ve etanol konsantrasyonu faktörlerinin 5 seviyesinin farklı kombinasyonları ile oluşturulan merkezi kompozit tasarım deneme tasarımına göre gerçekleştirilmiştir. Model seçimi tüm yanıt değişkenleri için elde edilen modellerin uyum istatistiği verileri analiz edilerek değerlendirilmiş ve en uygun modelin karesel

model olduğu tespit edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre oluşturulan ikinci dereceden modelin yeterliliği istatistiksel veriler kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiş ve modelin deneysel verileri temsil yeteneğinin yüksek olduğu saptanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı ekstraksiyon modelinin istatistiksel olarak anlamlı terimi (%95 güven aralığında); etanol konsantrasyonunun doğrusal ve karesel etkisidir. Benzer olarak, toplam flavonoid madde miktarı ekstraksiyon modelinin anlamlı terimi de etanol konsantrasyonunun doğrusal ve karesel etkisidir. Antioksidan aktivite ekstraksiyon modelinde ise, sürenin doğrusal etkisinin, etanol konsantrasyonun doğrusal etkisinin, genlik-sıcaklık ikili etkileşiminin etkisinin, genlik-etanol konsantrasyonu ikili etkileşiminin etkisinin, sıcaklık-etanol konsantrasyonu ikili etkileşiminin etkisinin, sıcaklığın karesel etkisinin, sürenin karesel etkisinin ve etanol konsantrasyonun karesel etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir.

Ekstraksiyon sürecinin optimizasyon sonucu istenebilirlik fonksiyonu yaklaşımı kullanılarak sayısal olarak belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik madde miktarına (5579,51 mg GAE/kg LF), toplam flavonoid madde miktarına (1824,34 mg KE/kg LF) ve antioksidan aktiviteye (20,79 mmol TE/kg LF) sahip çözüm 0,822 istenebilirlikle %55 genlikte, %20 etanol konsantrasyonunda, 10 °C sıcaklıkta ve 3 dk'da yapılacak ekstraksiyon işlemi olarak belirlenmiştir. Bu koşulun deney tasarımında belirlenen 2. standart sıra deney koşullarına denk geldiği tespit edilmiştir. İstenebilirlik değeri 0,822 olan optimum koşullarda toplam fenolik madde miktarının %31,55 ve toplam flavonoid madde miktarının %66,80 arttığı, antioksidan aktivitesinin ise %11,15 azaldığı tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarının; genlik ve sıcaklığın yükseltilmesiyle arttığı, etanol konsantrasyonunun yükselmesiyle azaldığı tespit edilmiştir. Toplam flavonoid madde miktarının; genliğin yükselmesiyle arttığı, süre ve etanol konsantrasyonun yükselmesiyle azaldığı tespit edilmiştir. Ek olarak sıcaklığın 10 °C ve üzeri uygulamalarda diğer bağımsız değişkenlerle etkileşimine bağlı olarak negatif etki ettiği belirlenmiştir. Antioksidan aktivitenin; genlik yükseldikçe arttığı, sıcaklık, etanol konsantrasyonu arttıkça azaldığı ve sürenin 4. dakikadan sonra azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. Her üç yanıtta da görülen etanolün azaltıcı etkisi, ıspanak kökünde alkolde çözünen polifenollerin suda çözünen polifenollere göre miktarsal olarak az olma olasılığı, etanolün protein hücre duvarını denatüre ederek çözünmeyen ve hücre

duvarında yer alan polifenollerin difüzyonu zorlaştırması ve ekstraksiyon verimini düşürmesi, ultrasonun etkisiyle ortamda serbest radikallerin oluşmasıyla polimerik reaksiyonların başlaması ve polimerik fenoliklerin alkolde suya göre daha az miktarda çözünmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, ıspanak kökünden biyoaktif bileşenlerin kazanımında UDE yönteminin kullanılabileceğini ortaya koymuştur. Bu yöntem, ıspanak kökünden biyoaktif bileşenlerin kazanılmasında kullanımıyla ilk kez bu çalışma kapsamında ele alınmıştır.

Bu çalışmada ıspanağın evsel ve endüstriyel olmak üzere yemek halinde, yıkanmış hazır ıspanak, dondurulmuş ve kurutulmuş minimal işlenmiş ıspanak olarak değerlendirilmesinde ortaya çıkan en önemli atık olan ıspanak kökleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ıspanak kökünden biyoaktif bileşenlerin geri kazanılmasına yöneliktir. Bu çalışmanın farklı meyve ve sebzelerin kendisi dışında atık olarak değerlendirilen sap, kök, yaprak, çekirdek ve kabuk kısımlarının da biyoaktif bileşenlerin kazanımında kullanılmasına yönelik yapılacak diğer çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Bu sayede gıda endüstrisinde açığa çıkan gıda atık ve artıkları değerlendirilerek alternatif biyoaktif bileşen kaynaklarına dönüşecek ve bu kaynaklardan elde edilen katma değeri yüksek yeni ürünler elde edilecektir. Bu durum hem gıdanın sürdürülebilirliğini hem de gıda atıklarının ülkemiz ekonomisine kazandırılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Aires, A. (2017). Phenolics in foods: extraction, analysis and measurements. *Phenolic Compounds Natural Sources, Importance and Applications*, 61-88.

Akyüz, E. (2011). *Digitalis ferruginea ssp. schischkinii ve bazı endemik digitalis türlerinin ekstraktlarında mevcut kardiyak glikozitleri ve fenolik bileşiklerin kromatografik yöntemlerle belirlenmesi* (Doktora tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

Al-Dhabia, N.A., Ponmurugana, K. & Jeganathanb, P. M. (2017) Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 206-213.

Alan, R. & Padem, H. (1989) Erzurum yöresinde sebze olarak kullanılan yabani otlardan ışgın, uzun yemlik, madımak, tel pancarı ile ebegümeci üzerinde araştırmalar. *Gıda*, 14 (5), 281-287.

Alara, O. R., Abdurahman, N. R. & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: a review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.

Alexander P.D., Alloway B.J. & Dourado A.M. (2006). Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environmental Pollution*, 144, 736–745.

Alibaş, İ. & Okursoy, R. (2012). Karalahana (*brassica oleracea* L. var. *acephala*), pazı (*beta vulgaris* L. var. *cicla*) ve ıspanak (*spinacia oleracea* L.) yapraklarının bazı teknik özellikleri, *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 26 (1), 39-48.

Alothman, M., Bhat, R. & Karim, A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, 115(3), 785-788.

Altemimi, A., Lightfoot, D. A., Kinsel, M. & Watson, D. G. (2015). Employing response surface methodology for the optimization of ultrasound assisted extraction of lutein and β-carotene from spinach. *Molecules*, 20, 6611-6625.

Amendola, D., De Faveri, D.M. & Spigno, G. (2010). Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J Food Eng*, 97, 384-392.

AOAC (1990). Official Methods of Analysis. 15th Edition, *Association of Official Analytical Chemist*, Washington DC.

Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilkhu, K. & Versteeg, C. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 155-160.

Atalay, A. B. & İnanç, A. L. (2019). Optimization of ultrasound-assisted phenolic extraction from red pepper seed by response surface methodology. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(1), 132–140.

Avşar, B. (2011). *Genetic diversity of turkish spinach cultivars (Spinacia oleracea L.)*. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü/Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir. 5.10.2021 tarihinde https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=9F8z0P6U7YTpHPDDDkljg&no=vTzsVgKvX93eixqaR_Cb3g adresinden erişildi.

Baltacıoğlu, H., Şahin, E. M. & Karadağ, E. D. (2019). Şeftali posasından ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleriyle fenolik bileşiklerin eldesi. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8 (2), 875-881.

Bates, D. M., Bagnall, W. A. & Bridges, M. W. (2006). Method of treatment of vegetable matter with ultrasonic energy. *US patent application* 20060110503.

Bayram, N. E., Canlı, D., Gerçek, Y. C., Bayram, S., Çelik, S., Güzel, F., Morgil, H. & Cevahir Öz, G. (2020). Macronutrient and micronutrient levels and phenolic compound characteristics of monofloral honey samples. *Journal of Food and Nutrition Research*, 59 (4), 311-322.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, R. S. & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76, 965–977.

Bhattacharya, S. (2021). *Central composite design for response surface methodology and ıts application in pharmacy* [digital version]. 30.06.2022 tarihinde https://www.intechopen.com/chapters/74955 adresinden erişildi.

Bunea, A., Andjelkovic, M., Socaciu, C., Bobis, O., Neacsu, M., Verhe, R. & Camp, J. V. (2008). Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, 108(2), 649-656.

Chemat, F., Huma, Z. & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 813–835.

Chen, M., Zhao, Y. & Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food Chemistry*, 172, 543-550.

Cheok, C.Y., Chin, N.L., Yusof, Y.A., Talib, R.A. & Law, C.L. (2013). Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions from mangosteen (*Garciniamangostana Linn*.) hull using ultrasonic treatments. *Industrial Crops and Products*, 50,.1-7.

Choudhary, R., Altemimi, A., Watson, D. G. & Lightfoot, D. A. (2015). Effects of ultrasonic treatments on the polyphenol and antioxidant content of spinach extracts. *Ultrasonics Sonochemistry*, 24, 247-255.

Cornel, J.A. (1990) How to Apply Response Surface Methodology, second ed., *American Society for Quality Control*, Wisconsin.

Dal, Y. & Türkmen, Ö. (2016). Ispanak tarımı ve ıslahı, *Türktob Dergisi* ,20, 13-17.

Daşdemir, Y. (2019). Farklı kurutma yöntemleri ile kurutulmuş maviyemiş meyvesinin farklı oranlarda ilavesi ile üretilen siyah çayların antioksidan kapasitesi ve fenolik profilinin tespiti (Yayınlanmış yüksek lisans tezi), Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Nevşehir.

Değirmencioğlu, A. & Yazgı, A. (2006). Tepki yüzeyleri metodolijisi "optimizasyon esaslı çalışmalara ilişkin teorik esaslar ve tarımsal mekanizasyon uygulamaları". *Tarım Makinaları Bilim Dergisi*, 2 (2) 111-115.

Dehkharghanian, M., Adenier, H. & Vijayalakshmi, M. A. (2010). Study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121, 863–870.

Derrien, M., Aghabararnejad, M., Gosselin, A., Desjardins, Y., Angers, P. & Boumghar, Y. (2018). Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of lutein and chlorophyll from spinach by-products using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 93, 79-87.

Deveci, M. & Uzun, E. (2011). Determination of phenolic compounds and chlorophyll content of spinach (*Spinacia oleracea L*.) at different growth stages. *Asian Journal of Chemistry*, 23(8), 3739-3743.

Diaz, A. I., Laca, A., Laca, A. & Diaz, M. (2017). Treatment of supermarket vegetable wastes to be used as alternative substrates in bioprocesses. *Waste Management*, 67, 59–66.

Dorman, H. J. D., Koşar, M., Kahlos, K., Holm, Y. & Hiltunen, R. (2003). Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from Mentha species, hybrids, varieties, and cultivars. *J Agric Food Chem.*, 51(16), 4563-4569.

Dutka, M., Ditaranto, M. & Løvås, T. (2015). Application of a central composite design for the study of NOx emission performance of a low NOx burner. Energies, 8(5), 3606-3627.

Ercan, S.Ş., & Soysal, Ç. (2010). Effect of ultrasound and temprature on tomato peroxidase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 689-695.

Eren, İ. (2004) *Patateslerin osmotik dehidrasyonunun "Response Surface Metodu" kullanılarak optimizasyonu* (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Ergün, A. R., Baysal, T. & Bozkır, H. (2013). Ultrases yöntemi ile karotenoitlerin ekstraksiyonu, *Gıda*, 38 (4), 239-246.

Espada-Bellido, E., Ferreiro-González, M., Carrera, C., Palma, M., Barroso, C. G. & Barbero, G. F. (2017). Optimization of the ultrasound-assisted extraction of

anthocyanins and total phenolic compounds in mulberry (*Morus nigra*) pulp. *Food Chemistry* 219, 23–32.

FAOSTAT. (2020). 12.04.2022 tarihinde http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC adresinden erişildi.

Galvan d'Alessandro, L., Kriaa, K., Nikov, L. & Dimitrov, K. (2012). Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42–47.

Gao, Y., Wang, S., Dang, S., Han, S., Yun, C., Wang, W. & Wang, H. (2021). Optimized ultrasound-assisted extraction of total polyphenols from *Empetrum nigrum* and its bioactivities, *Journal of Chromatography*, B 1173, 122699.

Garcia-Castello, E.M., Rodriguez-Lopez, A.D., Mayor, L., Ballesteros, R., Conidi, C. & Cassano, A. (2015). Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1114-1122.

Gavahian, M., Chu, Y. & Sastry, S. (2018). Extraction from food and natural products bymoderate electric field: mechanisms, benefits and potential ındustrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 1040-1052.

Gelmez, N. (2008). *Ultrasound assısted and supercrıtıcal carbon dıoxıde extractıon of antıoxıdants from roasted wheat germ* (Master Thesis). Middle East Technical University/ Graduate School of Natural and Applied Sciences, Ankara.

He, B., Zhang, L., Yue, X., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. & Yue, P. (2016). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70–76.

Herrera, M.C. & De Castro, M.L. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *J Chromat A*, 1100(1), 1- 7.

Hong, J. & Ahn, T. (2005) Changes in total polyphenol contents of leafy vegetables (spinach, chard and mhorled mallow) by blanchin time, Korean J. Food Cookery SCI., 21 (2), 190-194.

Howard, L. & Pandjaitan, N. (2008). Pressurized liquid extraction of flavonoids from spinach, *Journal of Food Science*, 73 (3), C151-157.

Huang, W., Xue, A., Niu, H., Jia, Z., & Wang, J. (2009). Optimised ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Folium eucommiae and evaluation of antioxidant activity in multi-test systems in vitro. *Food Chemistry*, 114, 1147-1154.

Ilaiyaraja, N., Likhith, K., Babu, G.S. & Khanum, F. (2015). Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). *Food Chem.*, 173, 348–354.

Ildırar, D. (2014). *Maya endüstrisi atıksuyunun ultrases ile koyu renginin giderilmesi*. (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi) Hitit Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Çorum.

Ivanovic, J., Tadic, V., Dimitrijevic, S., Stamenic, M., Petrovic, S. & Zizovic, I. (2014). Antioxidant properties of the anthocyanin-containing ultrasonic extract from blackberry cultivar "Čačanska Bestrna". *Industrial Crops and Products*, 53, 274-281.

Jaime, L., Vazquez, E., Fornari, T., Lopez-Hazas, M. C., García-Risco, M. R., Santoyo, S. & Reglero, G. (2015). Extraction of functional ingredients from spinach (*Spinacia oleracea L.)* using liquid solvent and supercritical CO_2 extraction, *Sci Food Agric*, 95, 722–729.

Jambrak, A. R., Herceg, Z., Subaric, D., Babic, J., Brncic, M., Brncic, S.R., Bosiljkov, T., Cvek, D., Tripalo, B. & Gelo, J. (2010). Ultrasound effect on physical properties of corn starch. *Carbohydrate Polymers*, 79, 91-100.

Jing, C.L., Dong, X.F. & Tong, J.M. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of flavonoid compounds and antioxidants from alfalfa using response surface method. *Molecules*, 20, 15550-15571.

Joglekar, A.M. & May, A.T. (1987) Product excellence through design of experiment. *Cereal Foods World*, 32, 857–868.

Karaca, H. (2010). *Ozonlamanın Marul, ıspanak ve maydanozlarda mikrobiyel inaktivasyon ve raf ömrü üzerine etkisi* (Yayınlanmamış doktora tezi), Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Kaya, D. & Ergönül, P. (2015). Uçucu yağları elde etme yöntemleri. *Gıda*, 40 (5), 303-310.

Khandpur, P. & Gogate, P.R. (2016). Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 337–353.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. & Lee, D. (2004). Applications andpotential ofultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 261–266.

Köse, E. (2018). *Bazı ıspanak aksesyonlarının morfolojik özeliklerinin belirlenmesi*, (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi), Namık Kemal Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

Kutlu, N., Yeşilören, G., İşçi, A. & Şakıyan, Ö. (2017). Konvansiyonel ekstraksiyona alternatif: yeşil teknolojiler, *Gıda*, 42 (5), 514-526.

Laurentiis, V. D., Corrado, S. & Sala, S. (2018). Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. *Waste Management*, 77, 238–251.

Lazić, Z.R. (2004) *Designs of experiments in chemical engineering*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 620.

Lee, H., Kim, H., Cadwallader, K. R., Feng, H. & Martin, S. E. (2013). Sonication in combination with heat and low pressure as an alternative pasteurization treatment – Effect on *Escherichia coli* K12 inactivation and quality of apple cider. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1131–1138.

Leong, T.S.H., Wooster, T.J., Kentish, S.E. & Ashokkumar, M. (2009). Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 721–727.

Liang, H., Wang, W., Xu, J., Zhang, Q., Shen, Z., Zeng, Z. & Li, Q. (2017). Optimization of ionic liquid-based microwave-assisted extraction technique for curcuminoids from *Curcuma longa* L. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 57-65.

Lim, Y. P., Pang, S. F., Yusoff, M. M., Mudalip, S. K. A. & Gimbun, J. (2019). Correlation between the extraction yield of mangiferin to the antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid content of Phaleria macrocarpa fruits. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 14, 100224.

Luque-García, J.L. & Luque de Castro, M.D. (2003) Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22 (1), 41-47.

Ma, Y. Q., Chen, J. C., Liu, D. H. & Ye, X.Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts, effect of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 57– 62.

Martinez-Solano, K.C., Garcia-Carrera, N.A., Tejada-Ortigoza, García-Cayuela, T. & Garcia-Amezquita, L.E. (2021). Ultrasound application for the extraction and modification of fiber-rich by-products. *Food Engineering Reviews*, 13, 524–543.

Martins, S., Mussatto, S. I., Martinez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C. N. & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29, 365–373.

Masuzawa, N., Ohdaira, E. & Ide, M. (2000). Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Japanese Journal of Applied Physics*, 39(5S), 2978.

Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A. & Pacheco, P. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 47 (7), 1-19.

Milella, A. R., Basile, T., Alba, V., Gasparro, M., Giannandrea, M. A., Debiase, G., Genghi, R. & Antonacci, D. (2019). Optimized ultrasonic-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape (*Vitis vinifera L.*) skin using response surface methodology. *J Food Sci Technol*, 56(10), 4417–4428.

Miller, N. J., Diplock, A. T. & Rice-Evans, C. A. (1995). Evaluation of the total antioxidative activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J. Agric. Food. Chem*., 43, 1794-1801.

Mohamed A.E., Rashed M.N. & Mofty A. (2003). Assessment of essential and toxic elements in some kinds of vegetables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55, 251–260.

Monier, V., Mudgal, S., Escalon, V., O'Connor, C., Gibon, T., Anderson, G. & Morton, G. (2010). *Preparatory study on food waste across EU 27*. Report for the European Commission (DG ENV – Directorate C) BIO Intelligence Service (BIOIS), Paris.

Mortazavi, A. & Tabatabaie, F. (2008). Study of ice cream freezing process after treatment with ultrasound, *World Appl. Sci. J*., 4, 188–190.

Murcia, M. A., Jimenez-Monreal, A. M., Gonzalez, J. & Martinez-Tome, M. (2020). *Nutritional composition and antioxidant properties of fruits and vegetables*, 181-195.

Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2009). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments (3. Baskı). New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Publication.

Nemzer, B., Al-Taher, F. & Abshiru, N. (2021). Extraction and natural bioactive molecules characterization in spinach, kale and purslane: a comparative study. *Molecules*, 26, 2515.

Nguyen, T. Y. L. & Le, V. V. M. (2016). Effects of ultrasonic treatment of rumduol mash on the antioxidant level of fruit juice. *International Food Research Journal*, 23(6), 2335-2340.

Nguyen, T. N. T., Phan, L. H. N. & Le, V. V. M (2014). Enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of phenolics from mulberry (*Morus alba*) fruit: comparison of kinetic parameters and antioxidant level. *International Food Research Journal*, 21(5), 1937-1940.

Özcan, E. (2006). *Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace* (Master thesis). Middle East Technical University/ Graduate School of Natural And Applied Sciences, Ankara.

Özçelik, S. (2013). *Kapiler elektroforez yöntemi ile pvı kaplı kapilerde inorganik anyonların hassas analizi: kemometrik deneysel tasarım ile metod optimizasyonu* (Yüksek lisans tezi), İstanbul Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Pan, G., Yu, G., Zhu, C. & Qiao, J. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) of flavonoids compounds (FC) from hawthorn seed (HS). *Ultrason. Sonochem.* 19, 486-490.

Raak, N., Symmank, C., Zahn, S., Aschemann-Witzel, J. & Rohm, H. (2017). Processing- and product-related causes for food waste and implications for the food supply chain. *Waste Management*, 61, 461–472.

Riera, G., Golas, Y., Blanco, A., Gallego, J. A., Blasco, M. & Mulet, A. (2004). Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrason Sonochemistry*, 11(3-4), 241-4.

Rozola-Diaz, M.D.C., Guerra-Hernandez, E. J., Rodriguez-Perez, C., Gomez-Caravaca, A. M., Garcia-Villanova, B. & Verardo, V. (2021). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from orange by-product, *Proceedings*, 70(1), 49.

Said, K. A. M. & Amin, M. A. M. (2015). Overview on the response surface methodology (rsm) in extraction processes, *Journal of Applied Science & Process Engineering*, 2(1), 8-17.

Santos, S. F., Cardoso, R. C. V., Borges, I. M. P., Almeida, A. C., Andrade, E. S., Ferreira, I. S. & Ramos, L. C. (2020). Post-harvest losses of fruits and vegetables in supply centers in Salvador, Brazil: Analysis of determinants, volumes and reduction strategies. *Waste Management*, 101, 161–170.

Seven Erdemir, Ü. (2013). *Gıda ve yağmur suyu örneklerinde mangan ile bakır türlendirmesi/fraksiyonlaması ve hplc-ıcp-ms tekniği* (Doktora tezi). Uludağ Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Shekarchizadeh, H., Kadivar, M., Ghaziaskar, H. S. & Rezayat, M. (2009). Optimization of enzymatic synthesis of cocoa butter analog from camel hump fat in supercritical carbon dioxide by response surface method (RSM). *The Journal of Supercritical Fluids*, 49(2), 209-215.

Sin, H., Yusof, S., Hamid, N. S. A., & Rahman, R. A. (2006). Optimization of enzymatic clarification of sapodilla juice using response surface methodology. Journal of Food Engineering, 73(4), 313-319.

Spanos, G.A. & Wrolstad, R.E. (1990). Influence of processing and storage on the phenolic composition of thompson seedless grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 1565-1571.

Soria, A. C. & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 21, 323-331.

Stalikas C.D., Mantalovas A.C. & Pilidis G.A. (1997). Multielement concentrations in vegetable species grown in two typical agricultural areas of greece. *The Science of the Total Environment*, 206, 17–24.

Sultana, B. & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempeferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chemistry*, 108(3), 879-884.

Şahin, Ö. (2019). *Determination of components of extracted from different parts of melocan (Smilax excelsa L.) plant by microwave and ultrasonic assisted extraction*. (Yüksek lisans tezi). Hacettepe Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Şahin, S. (2018). Optımızatıon of ultrasonic-assisted extraction parameters for antioxidants from *Curcuma longa* L.. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 19(2), 121-128.

Şahin, S. & Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 595–602.

Şat, İ. G. & Öz, Ö. (2015). Haşlama ve kurutmanın bazı sebzelerin bileşimi üzerine etkisi, *ADYU Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 3, 54-62.

Şengül, M. & Topdaş, E. F. (2019). Katı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılan modern teknikler ve bu teknikler arasında ultrason yardımlı ekstraksiyonun yeri. *Atatürk Univ. J. of the Agricultural Faculty*, 50 (2), 201-216.

Şimşek, O. (2019). *Artan miktarlarda uygulanan demir dozlarının ıspanak bitkisinin gelişimi ve kimi besin elementi içeriğine etkisi,* (Yüksek lisans tezi), Bursa Uludağ Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Tao, Y., Zhang, Z. & Sun, D. (2014). Kinetic modeling of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grape marc: Influence of acoustic energy density and temperature. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 1461–1469.

Tomšik, A., Pavlic´, B., Vladic´, J., Ramic´, M., Brindza, J. & Vidovic´, S. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 502–511.

Tunç, İ., Çalışkan, F., Özkan, G. & Karacabey, E. (2014). Mikrodalga destekli soxhlet cihazı ile fındık yağı ekstraksiyonunun yanıt yüzey yöntemi ile optimizasyonu. *Akademik Gıda,* 12(1) ,20-28.

TÜİK, 12.06.2022 tarihinde https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Urun-Denge-Tablolari-2020-2021-45505 adresinden erişildi.

Türken, T. & Erge, H. S. (2017) Effect of ultrasound on some chemical and microbiological properties of sour cherry juice by response surface methodology. *Food Science and Technology International*, 23 (6), 540-549.

Türkmen, F. (2012) *Yüksek Güçlü ultrases işleminin sütün fizikokimyasal ve jelleşme özelliklerine etkisi*. (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstisüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İstanbul.

Türkomp, 07.01.2022 tarihinde http://www.turkomp.gov.tr/food-ispanak-268 adresinden erişildi.

Upandyay, R., Nachiappan, G. & Mishra, H.N. (2015). Ultrasound-assisted extraction of flavonoids and phenolic compounds from *Ocimum tenuiflorum* leaves *Food Sci. Biotechnol.*, 24 (6), 1951-1958.

Vinatoru, M., Mason, T. J. & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178.

Yağcıoğlu, P. (2015). *Farklı ekstraksiyon metotları ile adaçayı (Salvia officinalis L.) bitkisinden antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu*. (Yayımlanmamış doktora tezi) İstanbul Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Yaman, T. & Kuleaşan, Ş. (2016). Uçucu yağ elde etmede gelişmiş ekstraksiyon yöntemleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1, 78-83.

Yıldırım, Z. B. (2019). Beton teknolojisi uygulamalarında yüzey yanıt yöntemlerinin kullanımı, *Çukurova 3. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi Tam Metin Kitabı*, 84-93.

Yıldız, G. & İzli, G. (2020). *Gıdaların kurutulmasında mikrodalga ve sıcak hava yöntemleri*, İksad:Ankara. 20.09.2021 tarihinde https://iksadyayinevi.com/wp-content/uploads/2020/05/GIDALARIN-KURUTULMASINDA-M%C4%B0KRODALGA-VE-SICAK-HAVA Y%C3%96NTEMLER%C4%B0-1.pdf adresinden erişildi.

Yıldız, S. (2019). *Hidrotermal yöntem kullanılarak sentezlenen nanoparçacıklar ile sulardan ağır metal gideriminin incelenmesi* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi), İstanbul Üniversitesi/Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

Yolmeh, M. & Jafari, S. M. (2017) Applications of response surface methodology in the food ındustry processes, *Food Bioprocess Technol*, 10, 413–433.

Yosefi, Z., Tabaraki, R., Asadi Gharneh, H. A. & Mehrabi, A. A. (2010). Variation in antioxidant activity, total phenolics, and nitrate in spinach, *International Journal of Vegetable Science*, 16, 233–242.

Yüksel, A. (2015). *Bir hastane mutfağında oluşan katı atık çeşit ve miktarlarının saptanıp değerlendirilmesi* (Yayımlanmamış doktora tezi), Başkent Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Zhou, K. & Yu, L. (2006) Total phenolic contents and antioxidant properties of commonly consumed vegetables grown in Colorado, *LWT- Food Science and Technology*, 39(10), 1155-1162.

Zivkovic, Z., Jankovic, T., Menkovic, N. & Savikin, K. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of isogentisin, gentiopicroside and total polyphenols from gentian root using responsesurface methodology. *Industrial Crops & Products*, 139, 111567.

Wannes, W. A., Mhamdi, B., Sriti, J., Jemia, M. B., Ouchikh, O., Hamdaoui, G., Kchouk, M. E. & Marzouk, B. (2010) Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis var. italica L.*) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1362–1370.

Win, H. Y., Wah Oo, N., S. & Chin, K. M. (2020) Analysis on phytochemicals, minerals and total flavonoid content of spinach (*Spinacia oleracea* linn.), *Journal of Computer Applications and Research*, 1 (1), 237-240.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hande ÖZCAN

Yabancı Dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lise : 2010-2014 Tepekent Anadolu Lisesi

Lisans : 2014-2018 Sakarya Üniversitesi/ Mühendislik Fakültesi/ Gıda Mühendisliği Bölümü

Önlisans: 2019-2021 Anadolu Üniversitesi/Açıköğretim Fakültesi/ İş Sağlığı ve Güvenliği Bölümü

MESLEKİ DENEYİM

Sama Gıda Tic. Ltd. Şti. – Gıda Mühendisi Temmuz 2018-Mart 2020