



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**TURUNÇGİL MEYVE VE YAPRAKLARININ FARKLI
EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE EKSTRAKSİYONU
VE MATEMATİK MODELLEMESİ**

Zeynep İLBAY

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Temel İşlemler ve Termodinamik Programı**

Danışman

Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR

II. Danışman

Prof. Dr. Mahmut BAYRAMOĞLU

Haziran, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 15.06.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Temel İşlemler ve Termodinamik Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



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



Prof. Dr. Hanifi SARAC
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi



Prof. Dr. Mehmet Ali GÜRKAYNAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. İsmail İNCİ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Şahika Sena BAYAZIT
Beykent Üniversitesi
Mühendislik- Mimarlık Fakültesi

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim süresince çalışmalarımın gerçekleştirilmesi için en büyük desteği sağlayan ve her ihtiyacımda yanımda olan başta çok kıymetli hocam, Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR'a çok teşekkür ederim.

Bilimsel desteğini yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca hiç eksik etmeyen ve engin bilimsel tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren, çok değerli yardımcı danışman hocam Prof. Dr. Mahmut BAYRAMOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca, her türlü yardım, öneri ve yönlendirmeleri ile yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve cihazlarını kullandıran hocam Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında kendi laboratuvarındaki laboratuvar malzemelerini kullanmamı sağlayan hocam Doç. Dr. Faruk ÖKSÜZÖMER'e çok teşekkür ederim.

Analizlerimde bana yardımcı olan lisans öğrencilerinden, Meltem KILINÇ'a, Naciye BALCIOĞLU'na ve Ebru DİNLER'e çok teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım esnasında gerek yardımları, gerek dostlukları ile her zaman yanımda olan Temel İşlemler ve Termodinamik Anabilim Dalı'ndaki saygıdeğer hocalarım ve sevgili arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Haziran, 2016

Zeynep İLBAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. SERBEST RADİKALLER	5
2.1.1. Oksidatif Stres.....	8
2.2. Antioksidanlar	8
2.3. FİTOKİMYASALLAR.....	12
2.3.1. Polifenoller.....	13
2.3.1.1. Flavonoidler	14
2.4. TURUNÇGİLLER.....	15
2.4.1. Turunçgillerin Kökeni	16
2.4.2. Greyfurt ve Çeşitleri	17
2.4.3. Turunçgillerin Yetiştirme Koşulları	19
2.4.4. Turunçgillerin Dünya ve Türkiye Üzerindeki Dağılımı	20
2.5. TURUNÇGİLLERİN YAPRAK VE KABUK YAPISI.....	23
2.6. TURUNÇGİL YAPRAK VE KABUKLARININ KİMYASAL İÇERİĞİ VE FARMAKOLOJİK ETKİLERİ	25
2.6.1. Turunçgil Yaprak ve Kabuklarında Bulunan Flavonoidler ve Farmakolojik Etkileri	27
2.6.1.1 Greyfurt Yaprak ve Kabuklarında Bulunan Flavonoidler ve Farmakolojik Etkileri.....	30
2.7. KATI-SIVI EKSTRAKSİYON.....	32
2.7.1. Maserasyon Ekstraksiyonu	36

2.7.2. Soxhlet Ekstraksiyonu	36
2.7.3. Ultrases Destekli Ekstraksiyon (UDE)	39
2.7.4. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi (MDE).....	41
2.7.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon(SAE).....	48
2.8.ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN BAZI YÖNTEMLER.....	51
2.8.1. Folin-Ciocalteu (FC) Metodu: Toplam Fenolik Madde Tayini Metodu	51
2.8.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi	52
2.8.3. ABTS Yöntemi / TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi).....	53
2.8.4. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgen Antioksidan Kapasite) Kapasitesi	53
2.9. YANIT YÜZEY METODU (YYM)	54
2.9.1. Yüzey Merkezli Merkezi Kompozit Tasarımı	55
2.9.2. Box-Behnken Tasarımı.....	56
2.9.3. D-optimal Deneysel Tasarım	57
2.10: REGRESYON ANALİZİ, VARYANS ANALİZİ.....	58
3.MALZEME VE YÖNTEM	60
3.1. BİTKİ MATERYALİ	60
3.2. KİMYASALLAR VE REAKTİFLER.....	61
3.3. DENEY DÜZENEĞİNDE KULLANILAN EKİPMANLAR VE CİHAZLAR ..	61
3.4. EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ.....	61
3.4.1. Soxhlet Ekstraksiyon Yöntemi.....	61
3.4.2. Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi	62
3.4.2.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi.....	62
3.4.2.2. Greyfurt Kabuklarına Uygulanan Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi.....	68
3.4.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi.....	69
3.4.3.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi.....	69
3.4.3.2. Greyfurt Kabuklarına Uygulanan Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi.....	73
3.4.4. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi	74
3.5. ANALİZDE KULLANILAN CİHAZLAR VE YÖNTEMLER.....	77
3.5.1. UV-Vis Spektrofotometre.....	77
3.5.2. Uv-Vis Spektrofotometre ile Yapılan Analizler	78

3.5.2.1. Toplam Fenolik Miktarı	79
3.5.2.2. CUPRAC Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini	79
3.5.2.3. DPPH Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini	79
3.5.2.4. ABTS Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini	80
3.5.3. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)	80
3.5.3.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Naringin Miktarı (NM) Tayini	81
3.6. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM)	82
4. BULGULAR.....	83
4.1. SOXHLET EKSTRAKSİYON DENEYLERİ.....	83
4.2. ULTRASES DESTEKLİ EKSTRAKSİYON DENEYLERİ	84
4.2.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi	84
4.2.1.1. Kalorimetrik Sonuçlar	84
4.2.1.2. Regresyon Model Denkleminin Geliştirilmesi	85
4.2.1.3. UDE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Yaprak Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları	90
4.2.2. Greyfurt Kabuklarına Uygulanan Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi .	98
4.2.2.1. Regresyon Mode Denkleminin Geliştirilmesi	98
4.2.2.2. UDE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Kabuk Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları	102
4.3. MİKRODALGA DESTEKLİ EKSTRAKSİYON DENEYLERİ.....	107
4.3.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi	107
4.3.1.1. Regresyon Model Denkleminin Geliştirilmesi	107
4.3.1.2. MDE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Yaprak Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları	110
4.3.2. Greyfurt Kabuklarına Uygulanan Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	113
4.3.2.1. Regresyon Model Denkleminin Geliştirilmesi	113
4.3.2.2. MDE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Kabuk Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları	115
4.4. SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKSİYON DENEYLERİ.....	118
4.4.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi	118
4.4.1.1. Regresyon Model Denkleminin Geliştirilmesi	118
4.4.1.2. SAE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Yaprak Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları	120

4.5. OPTİMİZASYON KOŞULLARINDAKİ FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNDEN ELDE EDİLEN NARİNGİN MİKTARI VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ	123
4.6. OPTİMUM EKSTRAKSİYON KOŞULLARINDAKİ YAPRAKLARIN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) İLE ANALİZİ	126
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	130
KAYNAKLAR.....	133
EKLER.....	147
ÖZGEÇMİŞ	148

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Serbest radikallerin oluşmasını sağlayan iç ve dış kaynaklar [27].....	5
Şekil 2.2: Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar [29].....	6
Şekil 2.3: Serbest radikaller tarafından oluşan hücre hasarı [31].	8
Şekil 2.4: Antioksidan ve serbest radikal arasındaki mekanizma.....	10
Şekil 2.5: Antioksidanların sistematik sınıflandırılması [38].....	11
Şekil 2.6: Fitokimyasalların sınıflandırılması [42].	13
Şekil 2.7: Flavonoidlerin yapısı.....	14
Şekil 2.8: Flavonoidlerin moleküler yapısı.	15
Şekil 2.9: Swingle (1943) [52] , Barrett ve Rhodes'e (1976) [53] göre bazı <i>Citrus</i> türlerini ve akrabalıkları arasındaki ilişkiyi göstermektedir. (yakın ilişki , orta ilişki, uzak ilişki , gruplar arasındaki ilişki).	16
Şekil 2.10: Türkiye'de illere göre greyfurt üretimi.	22
Şekil 2.11: Greyfurt yaprağının yapısı (1): Tepe, (2): Yaprak ayası, (3): Orta damar, (4): Yan damar, (5): Petiyol, (6):Gövde.	23
Şekil 2.12: Bir Turunçgilin enine kesiti (1: membran (septum); 2:meyve akısı, 3:flavedo ve yağ bezleri, 4: dilim zarı (segment membran), 5: albedo, 6: meyve suyu torbacıkları, 7: çekirdek (tohum), 8:yağ, 9: flavedo, 10: albedo) [64].	24
Şekil 2.13: Polimetoksilat flavonlar.....	28
Şekil 2.14: Kuersetin molekülü.	30
Şekil 2.15: (a) naringin, (b) ferulik asit, (c) p-kumarik asit polifenollerin molekül yapıları.....	31
Şekil 2.16: Katı-sıvı ekstraksiyonun basitleştirilmiş blok şeması [90].	33
Şekil 2.17: Soxhlet ekstraktör sistemi [94].	37
Şekil 2.18: Ultrases-destekli Soxhlet ekstraksiyonu [95].....	39
Şekil 2.19: Hücre duvarının kavitasyon ile parçalanması ve çözücünün hücre yapısı üzerine nüfuzu [99].	41
Şekil 2.20: Konveksiyonla ısıtma ve mikrodalgayla ısıtma prosesleri [103].	43

Şekil 2.21: Mikrodalga ekipmanının kısımları [105].	44
Şekil 2.22: Sürekli mikrodalga reaktörü (1:Reaksiyon karışımının olduğu reaksiyon kabı, 2: Pompa, 3:Basınç dönüştürücü, 4:Mikrodalga kavite, 5: Reaksiyon kanalı, 6:Sıcaklık, 7:Isı değiştirici, 8: Basınç kontrol valfi, 9: Kontrol paneli, 10: Ürün).	45
Şekil 2.23: Çok modlu mikrodalga reaktör sistemi.	46
Şekil 2.24: Tek modlu mikrodalga reaktör sistemi.	47
Şekil 2.25: Süperkritik CO ₂ ait ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi [113].	49
Şekil 2.26: Karbondioksitin süperkritik akışkan halini alırken geçirdiği faz değişimi [114].	50
Şekil 2.27: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin yapısı.	52
Şekil 2.28: Antioksidan DPPH radikali tepkimesi.	52
Şekil 2.29: ABTS radikali.	53
Şekil 2.30: Cu (II)'nin antioksidan madde ile Cu(I)'e indirgenmesi.	54
Şekil 2.31: Üç değişkenli üç seviyeli merkezi kompozit tasarımın kübik şekli.	55
Şekil 2.32: Box-Behnken tasarımının kübik şekli.	56
Şekil 3.1: Ultrases destekli ekstraksiyon deney düzeneği.	63
Şekil 3.2: MDE yönteminin deney düzeneği.	70
Şekil 3.3: SMDE deney düzeneği.	71
Şekil 3.4: Yüklenen su miktarına karşılık korelasyon faktörü (p).	72
Şekil 3.5: Süperkritik akışkan ekstraksiyon deney düzeneği (1:CO ₂ tüpü, 2: Ekstraktör, 3: Sıcaklık-basınç kontrol sistemi, 4: Hava basınç regülatörü, 5: Kompresör 6: Soğutmalı su sürkületörü, 7:Mikro-ölçüm vanası, 8: Ekstraktör toplama kabı, 9:Monoetilen glikol:Su karışımı soğutma banyosu, 10: Soğutmalı su banyosu).	76
Şekil 3.6: Uv-Vis Spektrofotometre.	78
Şekil 3.7: HPLC şeması.	80
Şekil 4.1: Farklı problarla elde edilen kalorimetrik güce karşı elektrik gücü.	85
Şekil 4.2: Greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM ile deneysel TFM arasındaki korelasyon.	88
Şekil 4.3: Greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM-ÜH ile deneysel TFM-ÜH arasındaki korelasyon.	88
Şekil 4.4: Greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM-SE ile deneysel TFM-SE arasındaki korelasyon.	89

Şekil 4.5: US güç yoğunluğu ve EtOH (%(v/v)) konsantrasyonunun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman: 30 dk., sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L ⁻¹ , yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).	91
Şekil 4.6: US güç yoğunluğu ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman: 30 dk., sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L ⁻¹ , yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın, US güç yoğunluğu: 0.076 kW L ⁻¹).	92
Şekil 4.7: US güç yoğunluğu ve zamanın TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (EtOH: %100, zaman: 30 dk., sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L ⁻¹ , yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).	93
Şekil 4.8: EtOH-H ₂ O ve zamanın TFM-SE üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (US güç yoğunluğu: 0.076 kW L ⁻¹ , sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L ⁻¹ , yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).	94
Şekil 4.9: US güç yoğunluğu ve EtOH-H ₂ O'nun TFM-SE üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman: 30 dk., sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L ⁻¹ , yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).	94
Şekil 4.10: US güç yoğunluğu ve zamanın TFM-SE üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (EtOH: %100, sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L ⁻¹ , yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).	95
Şekil 4.11: Sıcaklık ve EtOH-H ₂ O konsantrasyonunun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (US güç yoğunluğu ise 0.406 kW L ⁻¹ , katı/sıvı oranı: 50 g L ⁻¹ , prob: orta).	97
Şekil 4.13: Greyfurt kabuklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM ile deneysel TFM arasındaki korelasyon.	101
Şekil 4.14: Greyfurt kabuklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM-ÜH ile deneysel TFM-ÜH arasındaki korelasyon.	101
Şekil 4.15: Katı/sıvı oranı ve EtOH (%(v/v)) konsantrasyonunun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Ekstraksiyon zamanı 30 dk., ekstraksiyon sıcaklığı 50 °C).	103
Şekil 4.16: Zaman ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (% 50 EtOH, ekstraksiyon sıcaklığı 50 °C).	104
Şekil 4.17: Sıcaklık ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (% 50 EtOH, ekstraksiyon zamanı 30 dk).	105
Şekil 4.18: Sıcaklık ve zamanın TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (% 50 EtOH, katı/sıvı oranı 16 g L ⁻¹).	106
Şekil 4.19: EtOH ve zamanın TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı 16 g L ⁻¹ , sıcaklık 37°C).	106
Şekil 4.20: Zaman ve mikrodalga güç yoğunluğu'nun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı: 8.00 gL ⁻¹).	110

Şekil 4.21: Zaman ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Mikroalga güç yoğunluğu: 1.4kWL^{-1}).....	111
Şekil 4.22: Zaman ve mikroalga güç yoğunluğunun TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı: 8 g.L^{-1}).....	112
Şekil 4.23: Zaman ve katı-sıvı oranının TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı: 8 gL^{-1}).	112
Şekil 4.24: Katı/sıvı oranı ve mikroalga güç yoğunluğu'nun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman=120 sn.).....	116
Şekil 4.25: Zaman ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Mikroalga güç yoğunluğu: 2.8 kWL^{-1}).....	116
Şekil 4.26: Zaman ve mikroalga güç yoğunluğunun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı: 10 gL^{-1}).....	117
Şekil 4.27: Zaman ve mikroalga güç yoğunluğunun TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Katı/sıvı oranı:10).	117
Şekil 4.28: EtOH ve sıcaklığın TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Basınç: 100 bar).....	121
Şekil 4.29: EtOH ve basıncın TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık: 40°C).	121
Şekil 4.30: Sıcaklık ve basıncın TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (EtOH %100 v/v).	122
Şekil 4.31: Sıcaklık ve basıncın TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (EtOH %100)......	123
Şekil 4.32: İşlem görmemiş greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.....	127
Şekil 4.33: MDE yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.....	127
Şekil 4.34: SMDE yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.....	128
Şekil 4.35: UDE yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.	128
Şekil 4.36: SAE yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.	129
Şekil 4.37: Soxhlet ekstraksiyon yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı. ..	129

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Serbest radikal türleri.....	7
Tablo 2.2: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların rolü ve özellikleri.	11
Tablo 2.3: Turunçgil türlerine göre dünyadaki üretimi (2012).	20
Tablo 2.4: Dünyada ülkelere göre turunçgil üretimi (2013).	21
Tablo 2.5: Turunçgil türlerinin Türkiye'deki üretimi (2013).	21
Tablo 2.6: Dünya turunçgil ihracatı (Bin \$).....	22
Tablo 2.7: 2012-2013 Yılına ait Türkiye'nin ürün bazında turunçgil ihracatı.	23
Tablo 2.8: Aglikon ve glikon formunda turunçgil flavonoidlerinin moleküler ağırlığı ve yapısal karakteristiği.....	27
Tablo 2.9: Doğal matristen ekstraksiyon için çözücü karakterisasyonu.....	34
Tablo 2.10: MDE kullanılan bazı çözeltiler için fiziksel sabitler ve dağılma faktörleri.....	42
Tablo 2.11: Süperkritik akışkanlara ait özellikler.	48
Tablo 2.12: Akışkanların fizikokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması.	48
Tablo 2.13: İstatistiksel olarak bazı belirteçler.	59
Tablo 3.1: Greyfurt yapraklarına D-optimal deney tasarımında kullanılan parametreler ve seviyeleri.....	65
Tablo 3.2: Greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yönteminin D-optimal deney tasarımı.....	66
Tablo 3.4: Greyfurt kabuklarına yüzey merkezli merkezi kompozit deney tasarımında kullanılan parametreler ve seviyeleri.....	69
Tablo 3.5: Greyfurt yapraklarına uygulanan MDE yönteminin deney planı.	73
Tablo 3.6: Greyfurt kabuklarına uygulanan MDE yönteminin yüzey merkezli merkez kompozit tasarımına ait deney planı.....	73
Tablo 3.7: Greyfurt yapraklarına uygulanan SAE yönteminin Box-Behnken deney planı.	77
Tablo 3.8: HPLC gradient programı.....	81

Tablo 4.1: Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilen greyfurt kabuğu ekstraksiyonunda çözücü türünün toplam fenolik miktarına ve üretim hızına etkisi.	83
Tablo 4.2: Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilen greyfurt yaprağı ekstraksiyonunda çözücü türünün ekstrakt miktarına etkisi.	84
Tablo 4.3: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler.	86
Tablo 4.4: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.	87
Tablo 4.7: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen bağımlı değişkenler.	98
Tablo 4.8: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.	99
Tablo 4.9: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM-ÜH için ANOVA analizi.	99
Tablo 4.10: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.	100
Tablo 4.11: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler.	107
Tablo 4.12: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.	108
Tablo 4.13: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen TFM-ÜH için ANOVA analizi.	108
Tablo 4.14: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.	109
Tablo 4.15: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen bağımlı değişkenler.	113
Tablo 4.16: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.	113
Tablo 4.17: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM-ÜH için ANOVA analizi.	114
Tablo 4.18: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.	115
Tablo 4.19: SAE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler.	118
Tablo 4.20: SAE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.	119

Tablo 4.21: SAE yöntemi kullanılarak greyluft yapraklarından elde edilen TFM-ÜH için ANOVA analizi.	119
Tablo 4.22: SAE yöntemi kullanılarak greyluft yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.....	120
Tablo 4.23: Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktların naringin miktarı ve antioksidan aktiviteleri.	124
Tablo 4.24: Optimum ekstraksiyon koşullarında tüketilen elektrik enerjisine karşılık gelen TFM.....	124

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
A	: Akım
C_s	: Suyun ısıl kapasitesi
C_e	: Ekstraktörün ısıl kapasitesi
cos ϕ	: Güç faktörü
ϵ	: dielektrik sabiti
ϵ''	: dielektrik kayıp faktörü
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
kW-h	: Kilowatt-saat
•OH	: Hidroksil radikali
M_s	: Suyun ağırlığı
M_e	: Ekstraktörün ağırlığı
P	: Probabilty (olasılık)
R²	: Korelasyon katsayısı
R²_a	: Ayarlanmış korelasyon katsayısı
R²_t	: tahmin edilen korelasyon sayısı
T_k	: Kritik sıcaklık
P_k	: Kritik basınç
V	: Volt
W	: Güç
Y	: Yanıt

Kısaltmalar	Açıklama
ACAT	: Hepatik asil-CoA kolestrol asiltransferaz
AP	: Adequate precision-uygun hassasiyet
ANOVA	: Varyans analizi
BHA	: Butillenmiş hidroksianizol
BHT	: Butillenmiş hidroksitoluen
CV	: Coefficient of variation- varyans katsayısı
ET	: Elektron transferi
FDA	: Gıda ve ilaç dairesi
GAE	: Gallik asit eşdeğer
GSP	: Glutatyon-S-transferaz
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HAT	: Hidrojen atom transferi
İ	: İnce
K	: Kalın
KY	:Kuru yaprak
MDE	: Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MGY	: Mikrodalga güç yoğunluğu
NM	: Naringin miktarı

O	: Orta
OFAT	: One-factor at a time
OKH	: Ortalama kare hata
OMH	: Ortalama mutlak hata yüzdesi
OMYH	: Ortalama mutlak yüzde hata
OSHA	: U.S. Occupational Safety and Health Administration
PCBler	: Poliklorürlü bifenoller
PG	: Propil gallat
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
SAE	: Süperkritik akışkan ekstraksiyon
SD	: Standart deviation-standart sapma
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBHQ	: Butil hidro kinon tersiyer
TEAK	: Troloks eşdeğer antioksidan aktivite
TFM	: Toplam fenolik miktar
TFM-SE	: Toplam fenolik miktarın spesifik enerjisi
TFM-ÜH	: Toplam fenolik miktarın üretim hızı
UDE	: Ultrases destekli ekstraksiyon
Uv-Vis	: Ultraviole-visible
YK	: Yaş kabuk
YYM	: Yanıt yüzey metodolojisi

ÖZET

DOKTORA TEZİ

TURUNÇGİL MEYVE VE YAPRAKLARININ FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİYLE EKSTRAKSİYONU VE MATEMATİK MODELLEMESİ

Zeynep İLBAY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR

II. Danışman : Prof. Dr. Mahmut BAYRAMOĞLU

Türkiye, yaklaşık 3 milyon tonluk narenciye üretim potansiyeliyle dünyada ilk 10'a giren ülkeler arasındadır. Türkiye'de yetiştirilen narenciyelerin %3'lük kısmını greyfurt oluşturmakta ve 2010 yılında 213.768 tonluk üretimiyle ülkemizi 7. sıraya taşımaktadır.

Altıntop olarak da bilinen greyfurtlar özellikle meyve suyu üretiminde kullanılmaktadır. Meyve suyu üretimi sırasında kabuk, yaprak, posa vb. biyolojik atıklar oluşur. Söz edilen biyolojik atıkların en önemli özelliği yapısında yüksek miktarda çeşitli fenolik maddeler içermesidir. Antioksidan özelliği gösteren fenolik maddeler, farklı reaktif oksijen türlerine (süperoksit, hidroksil radikal gibi) karşı etki göstererek; kanser, şeker, kalp, Alzheimer, Parkinson ve felç gibi birçok hastalıklara yakalanma riskini azaltır. Ancak, biyolojik atıkları gıda takviyesi olarak kullanabilmek için ekstraksiyon ve izolasyon işlemlerine gereksinim duyulmaktadır.

Tez kapsamında, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünde yetiştirilen greyfurtun (*Citrus paradisi*) kabuk ve yapraklarına yeni ve çevre dostu ekstraksiyon yöntemlerinden ultrases destekli ekstraksiyon (UAE), solventsiz mikrodalga destekli ekstraksiyon (SMDE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE), süperkritik akışkan ekstraksiyon (SAE) metotları uygulanmıştır. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden Soxhlet ekstraksiyon yöntemi de kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sırasında, yanıt

yüzey metodolojisi (YYM) kullanılarak ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı, çözücü türü, çözücü konsantrasyonu gibi ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon sonucunda, en yüksek toplam fenolik miktar (TFM) ve toplam fenolik miktarının üretim hızını (TFM-ÜH) veren optimum reaksiyon koşullarıyla beraber, en iyi ekstraksiyon metodu da belirlenmiştir. Ekstraksiyon işleminden sonra, özütlerin yapısındaki naringinin kantitatif olarak analizi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak yapılmıştır. Optimum ekstraksiyon koşullarında uygulanan greyfurt yapraklarının morfolojik yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) cihazı ile belirlenmiştir. Ayrıca, her bir yöntemde tüketilen elektrik enerjisi belirlenmiştir.

En yüksek toplam fenolik miktar (TFM) 28.986 (mg-GAEg⁻¹KY) ve naringin miktarı (NM) 117.08 (mg-NMg⁻¹KY) greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yönteminde elde edilmiştir. Elektrik enerjisini en az tüketen yöntemin 0.022kW-h ile MDE yöntemi olduğu gözlemlenmiştir.

Bu çalışma endüstriyel üretim için alt yapı oluşturmayı da hedeflemektedir. Diğer taraftan, flavonoidlerin analiz sonuçları literatürdeki Çin, ABD ve Meksika gibi ilk sırada greyfurt yetiştirilen ülkelerin greyfurtlarının flavonoid miktarlarıyla karşılaştırılmıştır.

Haziran 2016, 166 Sayfa

Anahtar kelimeler: Greyfurt (*Citrus paradisi*), antioksidan, naringin, ekstraksiyon, optimizasyon.

SUMMARY

Ph.D. THESIS

EXTRACTION OF THE CITRUS FRUIT AND LEAVES BY VARIOUS EXTRACTION METHODS AND MATHEMATICAL MODELLING

Zeynep İLBAY

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemical Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR

Co-Supervisor: Prof. Dr. Mahmut BAYRAMOĞLU

Turkey is in the top ten world's biggest citrus producers with a 3 million tons of production potential. 213.768 tons of grapefruit have been grown in Turkey and with its %3 ratio in total citrus production helps Turkey to have its 7th place in 2010.

Grapefruit, which is also known as "altıntop", is especially used in fruit juice sector. During grapefruit juice production, biological wastes occur, such as peels, leaves and pulp. These mentioned leftovers are important with their high phenolic content. Phenolic contents with their antioxidant properties are effective against different reactive oxygen species (superoxide, hydroxyl radicals), thus reducing the risk of cancer, diabetes, heart attack, Alzheimer, Parkinson and paralysis. However, these wastes should be processed with extraction and isolation.

In the scope of this thesis, leaves and peels of grapefruit (*Citrus paradisi*) could be processed with ultrasonic assisted extraction (UAE), solvent free microwave assisted extraction (SFME), microwave assisted extraction (MAE), supercritical fluid extraction (SFE). From a conventional extraction method, Soxhlet extraction was applied. During the extraction, response surface methodology (YYM) could be used to optimize extraction parameters such as duration, temperature, solvent type, solvent concentration and material size. Optimizing these parameters helped us identify the preferable extraction method along with the best conditions to have highest extraction yield and

quality. After the extraction process, the isolation process could be applied to extracts, and important flavonoids such as naringin would be analyzed quantitatively using high pressure liquid chromatography (HPLC). The morphological structure of grapefruit leaves at optimal extraction conditions determined with Scanning electron microscope (SEM). Furthermore, total electrical energy consumed of each extraction methods were calculated.

The highest total phenol content (TFC) and naringin content (NM) were calculated as 28.986 (mg-GAEg⁻¹DL) and 117.08 (mg-NMg⁻¹DL from grapefruit leaves under ultrasound-assisted extraction method; respectively. Microwave-assisted extraction had the lowest electrical energy consumption as 0.022 kWh.

Also, this thesis would served as a background work for industrial production. Analysis results would be compared to other studies from other countries such as China, USA and Mexico, in which the grapefruit production is the highest.

June 2016, 166 Pages

Keywords: Grapefruit (*Citrus paradisi*), antioxidant, naringin, extraction, optimization.

1.GİRİŞ

Son yıllarda nüfusun hızla artması ekolojik tahribatı beraberinde getirip, ekosistemimizi tehdit etmektedir. Artan insan popülasyonu, besin kaynakları, enerji kaynakları ve su kaynakları gibi canlıların hayatta kalabilmesi için son derece önemli olan tabii kaynakların azalmasına neden olmaktadır. Bununla beraber, kömür, fosil yakıtları gibi enerji kaynaklarının aşırı derecede tüketilmesi sera gazlarının atmosferdeki konsantrasyonunun artmasına yol açmaktadır. Böylece, küresel ısınma ve iklim değişikliğinin sel baskını, kuraklık ve türlerin yok olması gibi sonuçları doğuracağı beklenmektedir [1]. Bahsedilen kritik etkiler gıda kaynakları ve habitat için önemli bir risk oluşturmaktadır. Bilim adamları azalan gıda kaynaklarını telafi etmek için gıda atıklarını değerlendirme yoluna gitmektedir. Ayrıca, bu biyolojik atıkların bir kısmı hayvan yemi olarak kullanılmakta; büyük bir bölümü ise çevreye atılmakta ve bakteriler tarafından fotokimyasal biyodegradasyonla ekolojik tahribata neden olmaktadır [2]. Bu atıklar, insan sağlığı için gerekli antioksidanları içeren birçok polifenolik bileşiklere sahiptir. Çevresel ve sağlık boyutundan bakıldığında, tarımsal gıda endüstrisinde kullanılan ham maddelerin atıklarının, yan ürünlerinin ve kalıntılarının faydalı ürüne dönüştürülerek geri kazanılması gerekmektedir.

Polifenolik bileşikler, bitkilerin büyümesi, gelişmesi ve korunması gibi birçok fonksiyonları sağlayan, aromatik halkada bir ya da daha çok hidroksil grupları içeren bileşiklerdir [3]. Günümüzde, doğal kaynaklı polifenolik bileşiklerin antioksidan, antitümör, antimikrobiyel gibi özelliklerinin fark edilmesi ile meyve ve sebzelerin atıklarının geri kazanılması gündeme gelmiştir [4]. Ayrıca, sentetik antioksidanlar butillenmiş hidroksitoluen (BHT), butillenmiş hidroksianizol (BHA), butil hidrokinon tersiyer (TBHQ) ve propil galat (PG) gıdaların raf ömrünü uzatmak için gıda katkı maddesi olarak kullanılmalarına rağmen, sağlık riski ve toksik özelliklerinden dolayı kullanımları yasaklanmıştır [5]. Böylelikle, doğal kaynaklı gıda katkı maddelerinin önemi daha da çok artmıştır [6].

Türkiye 2012 yılında 243.267 tonluk greyfurt üretimiyle dünyada 7. sırada yer almaktadır [7]. Greyfurt turuncgil ailesine ait bir meyve olarak tüketilmekte, kabuğundan uçucu yağ elde edilmekte ve tohumlarından elde edilen özütler ilaç etken maddesi olarak kullanılmaktadır.

Greyfurtun yenilebilir bölümü tüketildikten sonra; biyolojik atık olarak nitelendirilen ve toplam meyve ağırlığının yarısını içeren kabuk, posa, yaprak kısımları geriye kalır [8]. Bu geriye kalan kısımları yenilebilir kısımlara kıyasla antioksidan özelliklere sahip, gerekli besin kaynağı olarak bilinen flavonoid özelliğe sahip yüksek miktarda naringin içerir [9]. Naringinin kolesterolü ve düşük yoğunluklu lipoproteini düşürdüğü, sinir sistemine iyi geldiği, antiaterojenik etkisi (arter duvarlarının sertleşmesine karşı), Alzheimer hastalığını önlediği ve antiülser aktivitesi olduğu bilinmektedir [10-15].

Greyfurttan elde edilen özütler, içerdiği polifenoller sayesinde, gıdalardaki lipid oksidasyonu önleyici olarak da kullanılabilir. Örneğin, zeytinyağının işlenmesi sırasında, zamanla oleuropein miktarı azalır, yani polifenol bileşen miktarındaki azalmaya bağlı olarak, kötü tat ve kötü koku gibi besin kalitesinde düşüşler olmaktadır. Hem bu düşüşleri ortadan kaldırmak hem de oksidatif kararlılığı sağlamak için doğal kaynaklardan elde edilen özütlerin zeytinyağı içerisine ilave edilmesi önerilmektedir [16].

Biyolojik atıklardan antioksidan özellik gösteren değerli fitokimyasal maddeleri özütlemek için çözücü yardımıyla katı-sıvı ekstraksiyon işlemine gerek duyulmaktadır. Gıda endüstrisinde, ekstraksiyon işlemi için tüketilen enerji toplam proses enerjisinin %70'inden daha fazlasını ve yeni bir fabrikanın yatırımının %50'sini içermektedir [17].

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden olan Soxhlet ve maserasyon (maceration) yüksek enerji tüketimi, düşük özüt verimi, yüksek maliyet, fazla çözücü kullanımı, fazla ekstraksiyon süresi gibi dezavantajlara sahiptirler. Ayrıca, var olan yöntemler, yasaların ürün/proses emisyonu, malzeme güvenliği ve kontrolü üzerine getirdiği katı kuralları sağlayamamaktadır [18]. Böylece, son yıllarda yenilikçi, ekonomik, çevreci proseslere olan ihtiyacın artması farklı ekstraksiyon yöntemlerinin artmasına yol açmaktadır [19]. Bu proses teknolojileri arasında ultrases-destekli ekstraksiyon (UDE), mikrodalga-

destekli ekstraksiyon (MDE) ve süperkritik akışkan ekstraksiyon (SAE) yöntemleri gelmektedir [20-23].

Ekstraksiyon yöntemleri dışında, çözücünün türü, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, bitki materyalinin cinsi, katı/sıvı oranı gibi birçok proses parametreleri ekstraksiyon işleminin verimini ve fizibilitesini etkilemektedir. Ekstraksiyon işlemini ölçeklendirmede, optimal işletme koşullarını belirlemek gereklidir. Yanıt yüzey metodolojisi (YYM) bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki karşılıklı etkileşimi inceleyen, birden fazla amacı optimize etmeye yarayan, bağımlı değişkenleri (yanıtları) analiz etmek için kullanılan deneysel tasarımıdır [24]. Yanıt yüzey metodolojisi kısaca, prosesin büyümesi, gelişmesi ve optimizasyonu için yararlı matematiksel ve istatistiksel teknikleri içerir [25].

Literatürde, çeşitli tarımsal gıdalara yeni ekstraksiyon teknikleri uygulanıp, yanıt yüzey metodolojisiyle prosesin optimizasyonu sağlanmıştır. Ancak, literatürdeki yayınlarda özüt verimlerinin üretim hızı, spesifik enerji yoğunluğu ve kullanılan enerjinin maliyeti gibi hesaplara rastlanılmamıştır. Bu tezde hedeflenen, biyolojik atık olarak ülkemizde potansiyeli olan greyfurtun yaprak ve kabuklarından polifenollerin geri kazanımdaki etkinlikleri araştırılacaktır. Bu amaçla, greyfurt kabuk ve yapraklarına yeni ve çevre dostu ekstraksiyon yöntemlerinden, UDE, MDE ve SAE metotları uygulanıp, farklı tasarım modelleri ile birlikte yanıt yüzey metodolojisi kullanılarak farklı ekstraksiyon parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilecektir. Optimizasyondaki asıl amaç, harcanan enerji de dahil olmak üzere bütün giderlerin maliyetini kapsayan minimum maliyette, maksimum verimde özüt elde etmektir. Böylelikle, proseste önemli bağımsız parametre olarak ele alınan özütün üretim hızı ve özütün spesifik enerji yoğunluğu da incelenip, proses için önemli çalışma parametrelerinin etkisi de belirlenecektir. Optimizasyon sonucunda, en yüksek özüt verimi ve kalitesini veren optimal ekstraksiyon koşulları belirlenecektir. Ayrıca, optimal koşullardaki bağımlı parametreler, Soxhlet ekstraksiyon metoduyla da kıyaslanacaktır. Ekstraksiyon sonunda elde edilen özütlerin antioksidan kapasiteleri Ultraviyole-visible (UV-Vis) spektrofotometre cihazı ile tespit edilecektir.

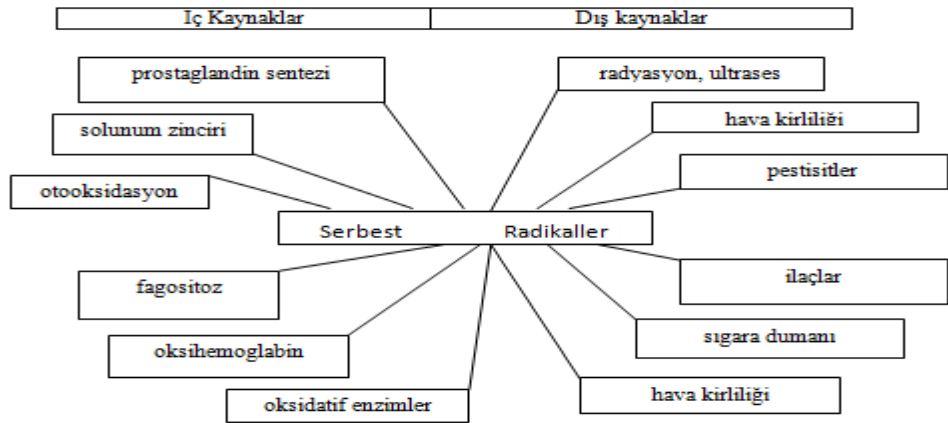
Elde edilen özütlerin içerisindeki naringin miktarı yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazı kullanılarak miktarları kantitatif olarak belirlenecektir.

Greyfurttan elde edilen antioksidanca zengin özütün, optimal koşullarda yüksek verimle kazanılması ile ek besin, gıdalar için koruyucu antioksidan ya da farmakolojik endüstri uygulamaları ve kozmetikte hammadde olarak kullanılabilmesi mümkün olabilecektir.

2.GENEL KISIMLAR

2.1. SERBEST RADIKALLER

Dış orbitallerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom ya da moleküllere serbest radikal denir [26]. Serbest radikaller, kısa ömürlü, kararlı olmayan, molekül ağırlıkları düşük ve oldukça reaktif moleküllerdir. Kararlılık kazanmak için diğer maddelerden elektron yakalama ihtiyacı duyarlar. Ayrıca, Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} ve Mo^{+2} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahiptir ancak serbest radikal olarak kabul edilmemekle beraber, serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Mitokondri oksidatif metabolizma boyunca reaktif süper oksit radikali ($O_2\bullet$) ya da hidroksil radikali ($OH\bullet$) gibi serbest radikaller ortaya çıkar. Ayrıca, insan bağışıklık sistemi virüs ya da bakterileri nötralize etmek için serbest radikalleri üretir. Çevresel faktörlerden hava kirliliği, radyasyon, sigara dumanı ve pestisitler, bazı kimyasal maddeler, diyetle alınan yağlar, aşırı güneş ışığı, oksidan ilaçlar, organik maddelerin çürümesi, stres gibi etkenler serbest radikallerin oluşmasını artırır. Serbest radikallerin oluşmasını sağlayan iç ve dış kaynakları göstermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Serbest radikallerin oluşmasını sağlayan iç ve dış kaynaklar [27].

Serbest radikaller 3 şekilde oluşabilmektedir [28].

1) Homolitik bağ kırılması ile



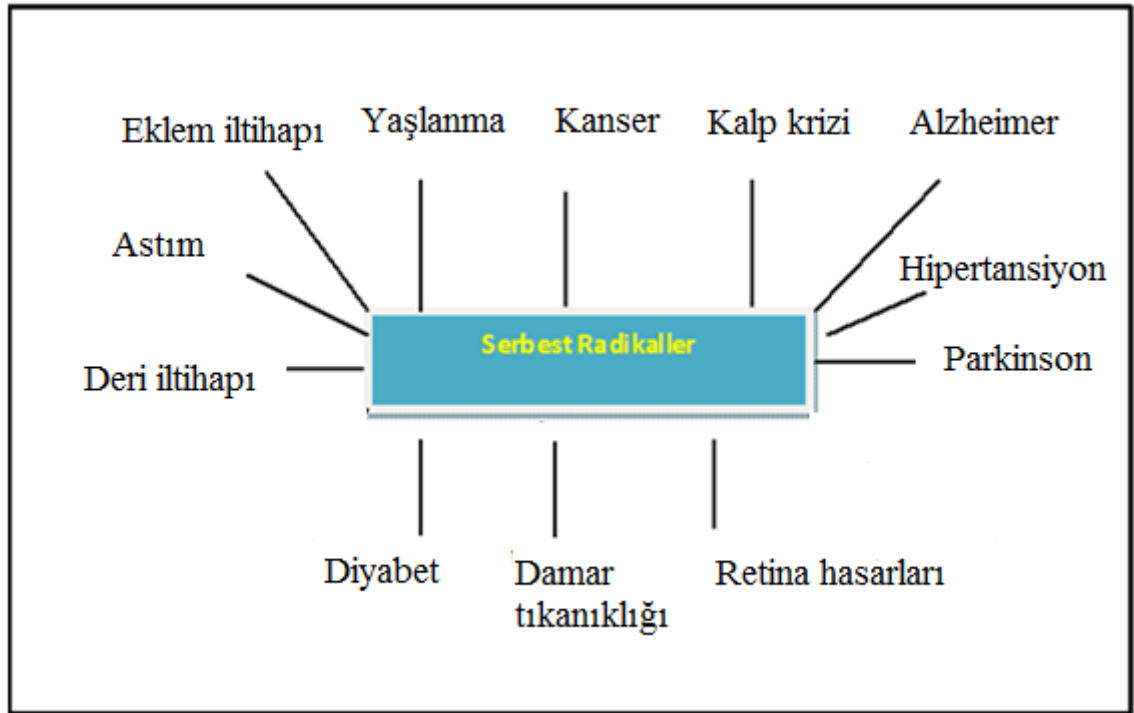
2) Bir molekülden bir elektron ayrılması ile



3) Bir molekülün bir atoma katılması ile



Yukarıdaki reaksiyonlardan da görüldüğü üzere serbest radikaller, katyon, anyon ve elektriksel olarak nötral olabilirler. Şekil 2.1'den de anlaşıldığı üzere metabolik işlevlerde temel oluşturmalarına rağmen, zincir reaksiyonu ile kontrolsüz çoğalırsa hücrede hasarıyla beraber birçok hastalığın oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar şematik olarak göstermektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Serbest radikallerin neden olduğu hastalıklar [29].

Reaktif oksijen türleri (ROT), aerobik canlılar tarafından moleküler oksijenden türetilen reaktif moleküllere denir. Bunlar, biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikalleri oluşturur. Bunun yanında, reaktif nitrojen türleri (RNT) de serbest radikaldır. Tablo 2.1 serbest radikal türlerini göstermektedir [30].

Tablo 2.1: Serbest radikal türleri.

Reaktif Oksijen Türleri	
Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($OH^{\bullet}$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Peroksil ($RO_2^{\bullet}$)	Hipobromöz asit ($HOBr$)
Alkoksil ($RO^{\bullet}$)	Ozon (O_3)
Hidroperoksil ($HO_2^{\bullet}$)	Singlet oksijen($O_2^1\Delta g$)
Reaktif Nitrojen Türleri	
Radikaller	Radikal olmayanlar
Nitrikoksit ($NO^{\bullet}$)	Nitröz asit (HNO_2)
Nitrojen dioksit ($NO_2^{\bullet}$)	Nikroksil anyonu (NO^-)
	Nikroksil katyonu (NO^+)
	Dinitrojen trioksit (N_2O_3)
	Dinitrojen tetraoksit (N_2O_4)
	Peroksinitrit ($ONOO^-$)
	Peroksinitrat (O_2NOO^-)
	Nitronyum katyonu (NO_2^+)
	Alkil peroksinitrit ($ROONO$)
	Alkil peroksinitrat (RO_2ONO)
	Nitril klorid (NO_2Cl)
	Peroksiasetil nitrat ($CH_3C(O)OONO_2$)

Hücrede oksijenin büyük çoğunluğu mitokondrilerde tüketilirken, %2'lik bir kısım serbest radikallere dönüşür. Serbest radikaller, steroid ve yaşlılık pigmenti gibi bazı maddelerin birikmesine, lipid peroksidasyonu ile hücre membran hasarına, tiyollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının değişmesine, proteinlerin tahrip olmasına, nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımına, deoksiribonükleik asidin tahrip olması gibi

Gıda endüstrisinde antioksidanlar en az dört sebepten dolayı önemlidir. Gıdaya ilave edilen antioksidanlar oksidatif hasara karşı gıdanın içindeki bileşimleri korur. Örneğin, zengin antioksidan kaynağı olarak bilinen baharatlar gıdanın depolama ve pişirme boyunca oksidatif bozunmasını engelleyici olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Butillendirilmiş hidroksi toluen (BHT), butillendirilmiş hidroksi anisol (BHA), propil gallat (PG) gibi sentetik antioksidanların mercek altına alınıp, sağlığa zararlı olduğu belirlenmiştir. Böylece, sentetik antioksidanlar yerine doğal antioksidanlar gıda endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bitkisel kaynaklı besinlerin antioksidan kaynağı fenollerdir. Bunlar zincir kırıcı görevi üstlenerek, onların —OH grubu sayesinde peroksil radikalleri gibi ($RO_2\bullet$) reaktif radikalleri süpürür.



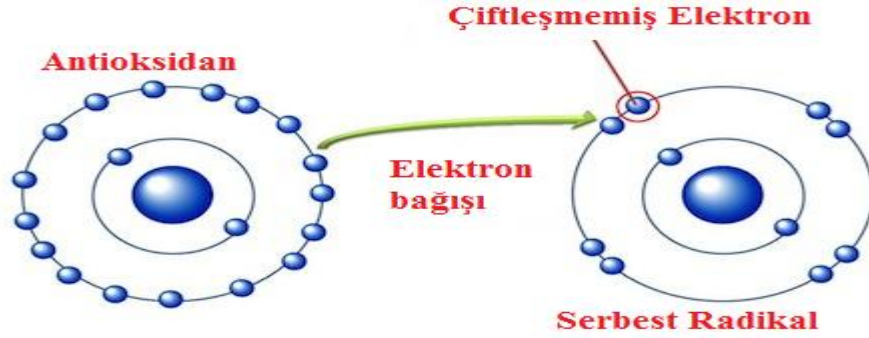
Fenoksil radikali ($R-O\bullet$) aromatik halkaya elektron delokalizasyonu yüzünden daha zayıf reaktif olma eğilimindedir, böylece reaktif $RO_2\bullet$ radikali sınırlandırılmış reaktivitenin biriyle yer değiştirilmektedir [35].

Kısaca antioksidanlar serbest radikalleri dört temel mekanizmayla etkisiz hale getirmektedir [36, 37];

1. Süpürme etkisi (Scavenging): Reaktif oksijen türlerini daha zayıf bir reaktif moleküle dönüştürerek etkisizleştirilir.
2. Söndürme etkisi (Quenching): Singlet oksijene bir hidrojen aktararak inaktif hale getirmesine denir.
3. Geçiş metallerini şelatlama (chelating): Geçiş metalleri ile şelat oluşturur.
4. Hasar görmüş biyomolekülleri onarırlar.

Besin kaynaklarından önemli doğal antioksidanlar vitamin C, vitamin E, polifenoller, biyoflavonoidler ve karotenoidlerdir. Antioksidan savunmada önemli olan diğer biyofaktörler lipoik asit, ko-enzim Q10 ve antioksidan enzim aktivitesi için gerekli olan selenyum, çinko, demir gibi birçok metallerdir. Vitamin E gibi polifenolik antioksidanlar serbest radikalleri gidermek için elektron vererek serbest radikal haline gelir. Yine de, çiftleşmemiş elektron aromatik halka boyunca rezonansla delokalize olur

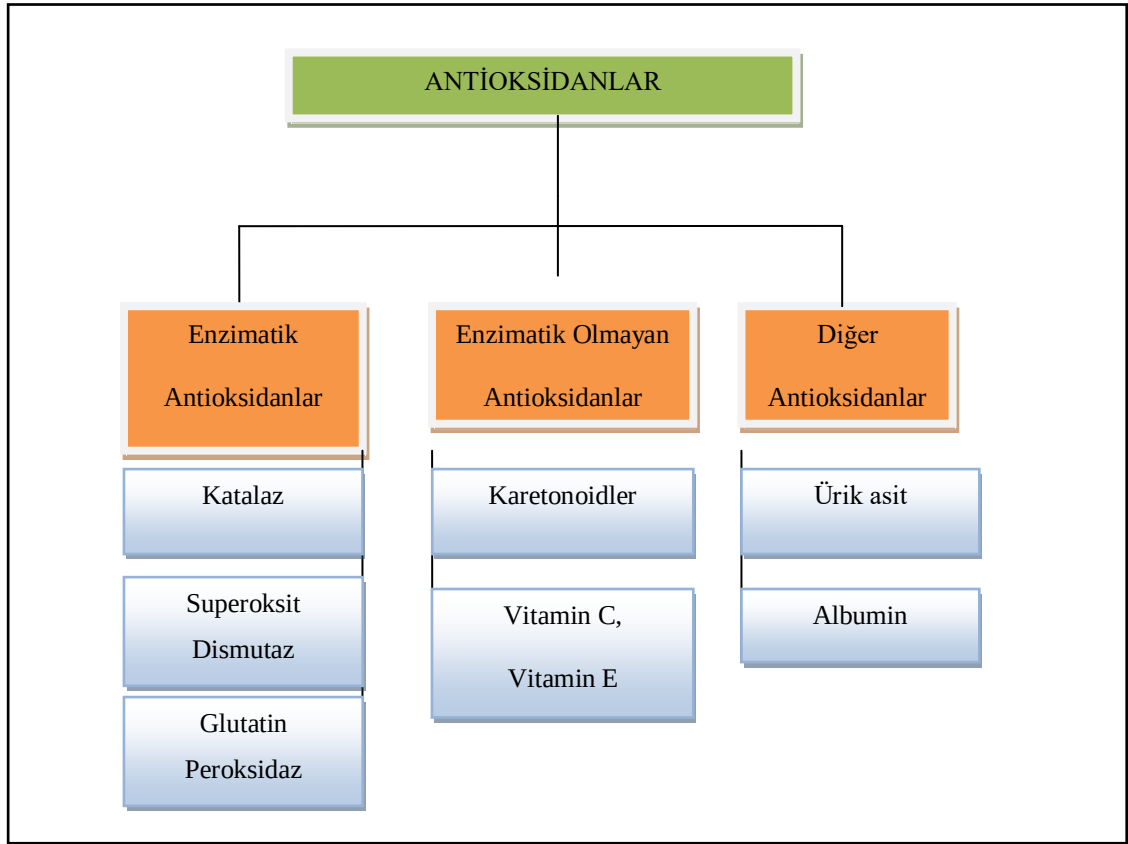
ve serbest radikallerden daha az zararlı olur. Antioksidan ve serbest radikal arasındaki elektron mekanizması Şekil 2.4 ile gösterilmektedir [38].



Şekil 2.4: Antioksidan ve serbest radikal arasındaki mekanizma.

Bitkilerdeki fenolik maddeler doğal antioksidanları içermektedir. Bu fenolik bileşikler insan metabolizmasında ve gıdalardaki savunmalarının yanı sıra bitkinin üzerinde antimikrobiyel, antiradyasyon gibi etkilere sahiptir. Doğal antioksidan kaynaklarını genel olarak bitki fenolik maddeleri oluşturmaktadır. Fenolik bileşikler H^+ ve e^- donörlerdir. Fenol halkasındaki artan -OH grubu sayısı ve meta -, orta -, para - sırası ile antioksidan etki artmaktadır [39].

Hayvansal ve bitkisel organizmalar içyapısında serbest radikallere karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlara sahiptir. Antioksidanların sistematik sınıflandırılması Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Tüm hayvansal ve bitkisel organizmalarda bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların rolü ve özellikleri Tablo 2.2'de özetlenmektedir [40].



Şekil 2.5: Antioksidanların sistematik sınıflandırılması [38].

Tablo 2.2: Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların rolü ve özellikleri.

Antioksidan Enzimler	Rolü	Özellikleri
Süperoksit dizmutaz (SOD)	$O_2^{\cdot -}$ 'i H_2O_2 'ye dönüştürür.	Manganez içerir (MnSOD) Bakır ve çinko içerir (CuZn.SOD) Mn ve Fe içerir (Fe.SOD) Ni içerir (Ni.SOD) Bakır içerir (Cu.SOD)
Katalaz (CAT)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Peroksizomlerde yer alan tetramerik bir proteindir.
Glutasyon peroksidaz (GPx)	H_2O_2 ve lipid peroksidlerini etkisizleştirir.	Selenoprotein (Se^{2+} içerir), daha çok sitozolde, az olarak mitokondride bulunur ve GSH kullanılır.

Tablo 2.2 (devam):

Antioksidan Vitaminler	Rolü	Özellikler
Alfa tokoferol	Lipit peoksidasyonunu kırar.	Yağda çözünür.
Beta karoten	Lipit peroksitlerini O_2^* ve OH^* 'i temizler. A vitamininin oksidasyonunu önler.	Yağda çözünür.
Askorbik asit	Direk olarak O_2^* , OH^* ve H_2O_2 'i temizler.	Suda çözünür.

2.3. FITOKİMYASALLAR

Makrobesinler dediğimiz yağlar, karbonhidratlar ve proteinler dışında, mikro besinlerden olan 17 mineralin (kalsiyum, demir, iyot, selenyum ve çinko vb.) ve 13 vitaminin (C, B6, E, A, folat, biotin vb.) enzim faaliyetleri için günlük belirli miktarlarda alınması gereklidir [41]. Ancak, bunların dışında fitokimyasal ya da biyoaktif bileşikler, bitki kaynaklı olup büyük bir kısmını polifenollerin ve doğal renk maddelerinin oluşturduğu sağlık için yararlı kaynaklardır. Serbest radikallerle elektron alışverişinde bulunarak hastalıkların oluşmasını engellemekte veya geciktirmektedirler. Böylece ilaç, kozmetik, gıda katkı maddesi araştırmalarında fitokimyasallar kullanılmakta ve sağlık üzerine etkileri hem in vivo (canlı üzerine) hem de in vitro (laboratuvar) olarak test edilmektedir. Fitokimyasalların sınıflandırılması Şekil 2.6'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6: Fitokimyasalların sınıflandırılması [42].

2.3.1. Polifenoller

Birincil metabolitlerden olan karbonhidratlar, yağlar, proteinler, nükleik asitler hücrenin büyümesi ve gelişmesi fonksiyonlarında görev alırken, ikincil metabolitlerin ise metabolizmada belirgin bir fonksiyonları görülmemektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda ise ikincil metabolitlerin, bitkilerde farklı koşullara adaptasyonuna, hastalıklara karşı koruma kalkanı ve diğer yararlı organizmaları çekicilik gibi önemli fonksiyonlarda bulunduğu görülmüştür. Üstelik, ikincil metabolitlerin yaprak, kök, çiçek, ve gövde öz suyu gibi belli yerlerinde depolanabildikleri de tespit edilmiştir [43].

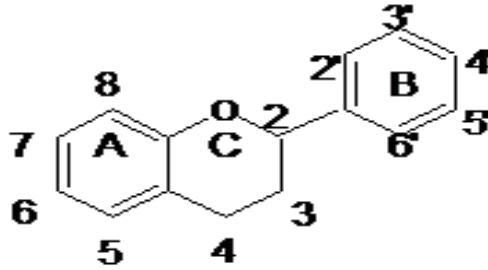
İkincil metabolizma ürünlerinden olan polifenoller bitkiler aleminde en yaygın bulunan ve doğal kaynaklı 8000'in üzerinde doğal polifenolik bileşiklere rastlanılmıştır [44]. Aromatik benzen halkasına bir ya da daha fazla hidroksil grupları (-OH) bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir. Polifenoller, flavonoid ve flavonoid olmayan bileşikler olarak iki sınıfa ayırmak mümkündür. Bunların 5000'den fazlasını bitkilerin doku ve değişik kısımlarındaki flavonoidler ve türevleri oluşturmaktadır [45]. Yapılan çalışmalarda, polifenollerin güçlü antioksidan oldukları ve vücutta oluşan serbest radikalleri nötralize edip, bir çok hastalığı engelleyip, yaşlanmayı geciktirdiği görülmüştür [45]. Bununla

beraber, aroma ve uçucu yağların biyosentezine de katkıda bulunduğu rapor edilmiştir [46].

Gıda komponenti olarak, renk, acı, tat, koku ve oksidatif stabilitesine etki etmektedir. Polifenoller, UV ışınlarına karşı cildi koruyucu ajanlar olarak görev alıp, fibroblast hücrelerin çoğalmasını artırır. Antioksidan özelliğinin yanında antimikrobiyal, antitümör, antiinflamatuvar, antialerjik, antihipertansif ve hipoglisemik özellikleri bilinmektedir [47].

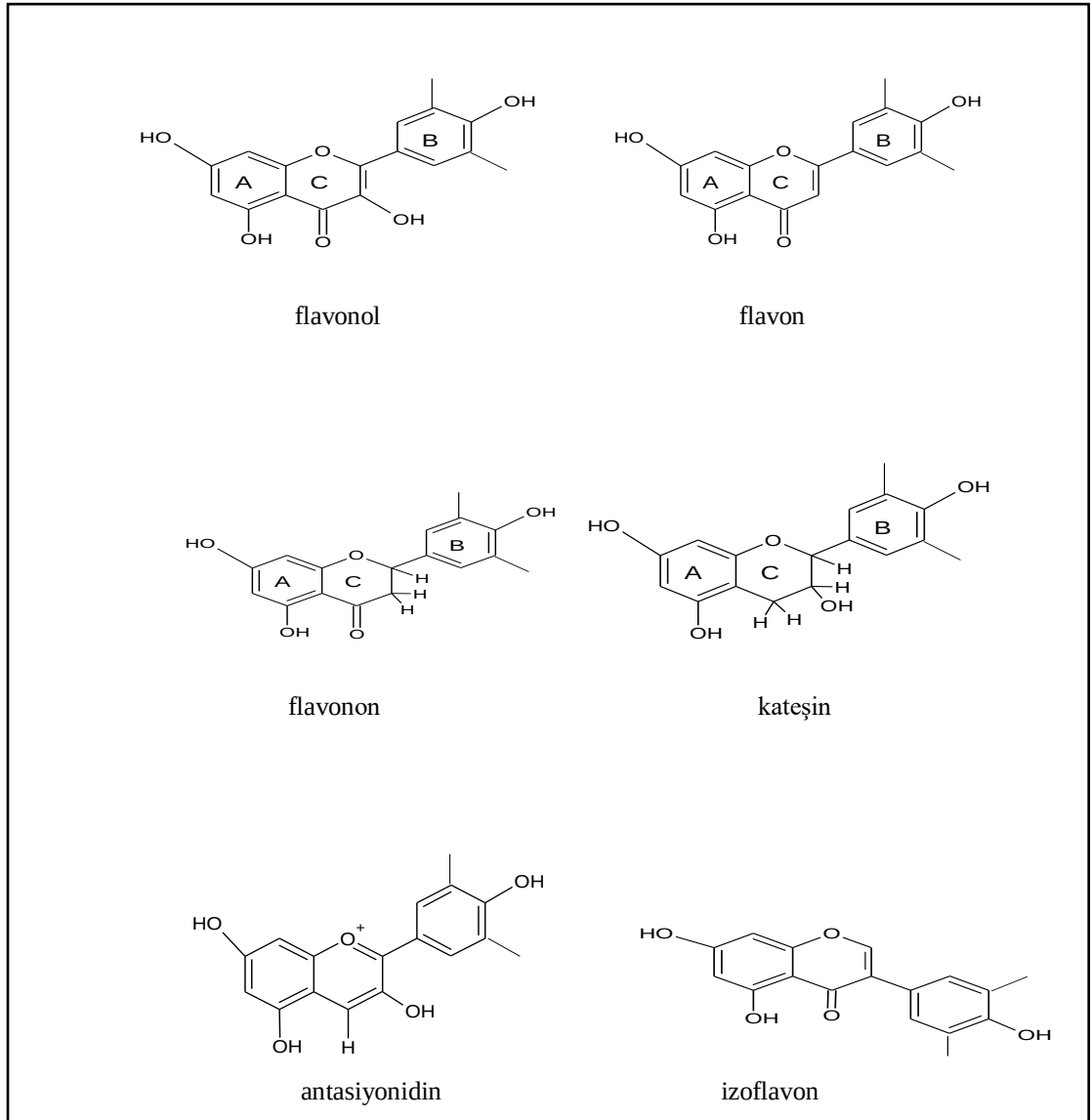
2.3.1.1. Flavonoidler

Flavonoidler düşük molekül ağırlığına sahip doğal polifenolik kimyasallar olup, fotosentez hücrelerinde birçok metabolik proseste önemli rol oynarlar [48]. Flavonoid bileşikler, $C_6-C_3-C_6$ karbon iskeletine sahip, fenil-benzo piron türevlerinden meydana gelen polifenollerdir [49]. Flavonoid iskeleti Şekil 2.7'de gösterildiği gibi 3 heterosiklik (C) bir halde bulunan 3 karbonlu bir zincirle bağlanmış iki fenolik (A, B) halkadan oluşur.



Şekil 2.7: Flavonoidlerin yapısı.

Moleküler yapılarına göre, flavonoidler 6 sınıfa ayrılırlar; flavonlar, flavanonlar, flavonoller, isoflavonlar, antosiyanidinler ve flavanoller (ya da kateşinler). Flavonoidlerin moleküler yapısı Şekil 2.8 ile gösterilmektedir [50].

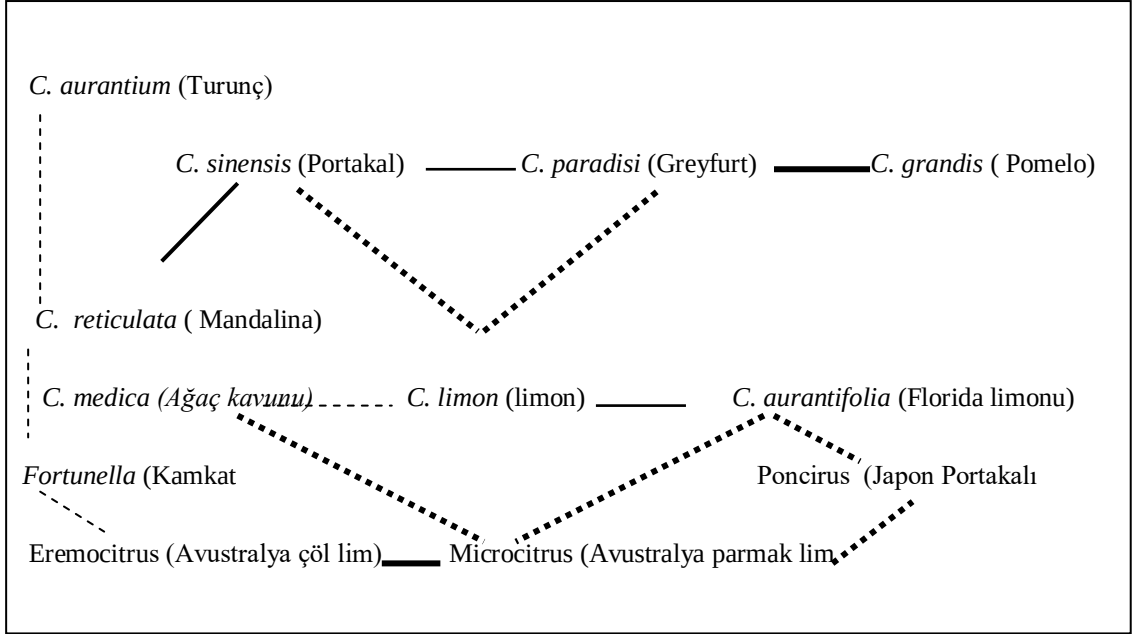


Şekil 2.8: Flavonoidlerin moleküler yapısı.

2.4. TURUNÇGILLER

Turunçgil meyve ağaçları, *Rutaceae* (Sedef otugiller) familyasının *Aurantioideae* alt familyasında ait olan *Citrus* cinsine ait mandalina, greyfurt, limon, turunç, portakal ve bergamot gibi türlerden oluşmaktadır. *Rutaceae* familyasındaki 7 alt familyadan biri *Aurantioideae* alt familyasıdır. Jones'un 1989 yılındaki sınıflandırmasına göre, *Rutaceae* *Aurantioideae* alt familyası *Citreae* ve *Clauseneae* olmak üzere 2 soy, 6 alt soy, 33 cins ve 203 türden oluşmaktadır. *Citrus* cinsi ise *Citreae* soyunun, *Citrinae* alt soyundaki 13 cinsten biridir [51]. Swingle [52] 1943 yılında *Citrus* cinsini *Eucitrus* ve *Papeda* 2 alt

cinse ayrılmaktadır. Portakal, limon, mandalina, greyfurt Eucitrus alt cinsi olarak sınıflandırılırken, *Papeda* alt cinsi ise yenilmeyen, tatları acı ve ekşi olan *Citrus* türlerini içermektedir. Şekil 2.9 *Citrus* türleri ve akrabalık ilişkilerini göstermektedir.



Şekil 2.9: Swingle (1943) [52] , Barrett ve Rhodes'e (1976) [53] göre bazı *Citrus* türlerini ve akrabalıkları arasındaki ilişkiyi göstermektedir. (— yakın ilişki , — orta ilişki, ... uzak ilişki , --- gruplar arasındaki ilişki).

2.4.1. Turunçgillerin Kökeni

Birçok turunçgil türünün coğrafik kökeninin saptanması tartışmalı ve karışık bir konu olmasına rağmen, taksonomistler özellikle Himalayalar bölgesi ve Çin'in güneyinde yer alan geniş alanı da içerdiğini ve esas ana vatanının Güneydoğu Asya olduğunu belirtmişlerdir. Webber'in (1967) [54] ve Chapot'un (1975) [55] turunçgil türlerinin kökenlerinin Güneydoğu Asya'nın, kuzeydoğu Hindistan'ın, Güney Çin'in tropikal ve subtropikal bölgelerde görüldüğünü ve sonradan diğer kıtalara yayıldığını göstermişlerdir. Turunçgillerin geçmişi 20 milyon yılı kapsamaktadır ve evrimi hala devam etmektedir.

Millattan önce dünyanın diğer yerlerine yayılmaya başlayan turunçgil cinsinin ilki ağaç kavunu (*Citrus medica* L.) olarak bilinmektedir. Ağaç kavunu, önce Persler tarafından İran'a ulaşmış, İskender'in orduları tarafından da Avrupa'ya ulaşmıştır. Kartaca'da M.S. 2.

yüzyıla ait olan mozaik resimlerden Turunç (*Citrus aurantium* L.) ve limonun (*Citrus limon* L.) Romalılarca Avrupa'ya ulaştırdıkları desteklenmiştir. Limonun coğrafik kökeni hakkında net bir bilgi olmamasıyla beraber, Çinli Fan Ch'eng-Ta ve Chou K'ü-Fei tarafından yazılan kaynaklardan bu türün isminin geçtiği ve 'li-mung' olarak telafuz edildiği belirtilmiştir. Araplar tarafından bu üç türde İspanya ve Kuzey Afrika'nın tamamına ulaşması 1150 yılına kadar sürmüştür. Bunun yanı sıra, portakal (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) türünün varlığının Avrupa'da yayıldığına dair 15. yüzyıla kadar herhangi bir belgeye rastlanılmamıştır. M.S. 13 yüzyılda Avrupa'da laym limon cinsine (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) rastlanılmaktadır. Mandarin cinsi (*Citrus reticulata* Blanco) ise 1805 yılında ilk olarak Çin'den İngiltere'ye, İngiltere'den de Malta'ya getirilerek, Avrupa'ya diğer türlere göre daha geç yayıldığı bilinmektedir. Ticaret yollarıyla uzakdoğudan gelen Şadok (*Citrus maxima* (L.) Osbeck), M.S. 12. yüzyılda Araplar vasıtasıyla İspanya'ya getirilmiştir. Tohumları Barbados adasına Kaptan Şadok tarafından getirilerek, Şadok olarak adlandırılarak yetiştirilmeye başlanmıştır [56].

Altıntop olarak da adlandırılan (*Citrus paradisi* Macf.) greyfurtun kökeni ise tam olarak bilinmemektedir. Sloane, 1696 yılında Jamaika'da ve 1707 yılında Barbados adasında yetişen Şadok cinsini tanımlamış, ancak "unutulan meyve" ya da greyfurtan hiç söz etmemiştir. Hughes (1750) altıntoptan ilk kez söz etmiş, Browne (1789) ise "unutulan meyve" ve "küçük şadok" isimleri altında Jamaikada yetiştiğini rapor etmiştir. Marloth (1952) turunçgil meyvelerinin kökenlerini ve dağılımlarından söz etmiş ve 1661'lerin öncesinde bazı greyfurtların Güney Afrika'da yetiştiğini belirtmiştir. Turunçgiller Amerika kıtasına 1493 yılından itibaren yayılmaya başlamıştır [56].

2.4.2. Greyfurt ve Çeşitleri

Yapılan çalışmalar, greyfurtun doğal bir portakal-şadok (pummelo) melezi olduğunu göstermiştir. Bir görüşe göre greyfurtun tadının üzüme benzemesinden dolayı "grapefruit" olarak adlandırıldığı, başka bir görüşe göre ise ağacın üzerinde salkım şeklinde meyve verdiği için bu isimle ifade edilmiştir.

En yüksek kalitedeki greyfurt meyvesi yüksek sıcaklığa ihtiyaç duyduğundan, tropik ve sıcak-nemli subtropik iklimlerde yetiştirilmektedir. Ülkemiz gibi Akdeniz iklimine sahip olan bölgelerde yetiştirilen greyfurt ise genelde asit içeriği fazla, kalın kabuklu ve

meyve suyu miktarı oldukça düşüktür. Beyaz ve renkli greyfurtlar olmak üzere meyve eti rengine göre 2'ye ayrılmaktadır. Beyaz etli olanlar, meyvenin dış ve et rengi sarımsı veya kahverengidir. Çekirdekli, çekirdeksiz ve az çekirdeksiz çeşitleri bulunmaktadır. Eti renkli olanlar ise, meyve etleri pembemsidir. Bunlarında çekirdekli, çekirdeksiz ve az çekirdekli tipleri vardır.

Duncan greyfurtu, geniş, sarımsı renkli Florida greyfurdu olarak bilinir. Beyaz etli çekirdeklidir. Meyvesinde 50-60 çekirdek bulunur. Meyvesinin sulu olmasından dolayı, genellikle meyve suyu endüstrisinde kullanılıp, sofralık olarak tercih edilmemektedir. İri meyveli, hafif yassı yuvarlak ve orta mevsimlik (Ocak-Şubat) bir çeşittir.

Marsh-seedless türü de Duncan çeşidi gibi beyaz etlidir ancak çekirdek sayısı meyve başına ortalama 4'tür. Duncan çeşidiyle karşılaştırıldığında hafif meyve iriliğinde ve basık olmasına rağmen, çekirdeksiz ve meyvesinin ağaç üzerinde uzun süre dayanıklı bir biçimde kalması onu popüler çeşit haline getirmiştir. Olgunlaşma devri kasım sonu mart başıdır.

Thompson türü ise Marsh-seedless türünün mutasyonu ile türemiştir. Meyve eti renkli ve çekirdeksiz olmasından dolayı Marsh-seedless türünden ayrılır. Marsh-seedless gibi sulu ve uzun süre dayanıklıdır. Kabukları ise daha incedir.

Redblush (Ruby Red) türü ise Teksas'ta meydana gelen Thompson çeşidinin göz mutasyonu ile oluşmuştur. Meyvesinin et rengi pembemsi ve meyvelerinin şekli pembemsidir. Meyve kalitesi oldukça yüksektir. Marsh Seedless'a göre olgunlaşma süresi daha erkendir (Ocak başı).

Ray Ruby ise, Thompson'dan tomurcuk mutasyonu ile meydana gelmiştir. Thomson türüyle benzerlik göstermesine rağmen et rengi koyu pembe ve kabukları renklidir.

Rio Red ise Teksas'ta meydana gelen Red Blush türünün göz mutasyonu ile oluşmuştur. Kabuğunun rengi Ray Ruby'e benzemektedir. Ağaç özellikleri ise Redblush ve Ray Ruby'e benzerlik göstermektedir. Ocak-Şubat ayları olgunlaşma dönemidir.

Henderson türü ise, 1973 yılında Everhard portakal çeşidinin göz mutasyonu ile Teksas'ta meydana gelmiştir. Red Blush türüne göre benzerlik göstermesine rağmen, kabuk rengi ve meyve eti daha koyu renktedir.

Hundson Foster türü ise çekirdekli ve meyvelerinin eti renklidir. Walter çeşidinin tomurcuk mutasyonu ile oluşmuş olmasına rağmen, olgunlaşması ona göre daha erkendir. Sofralık ve aynı zamanda meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır. Lezzeti iyi ve orta mevsim çeşitidir.

Star Ruby türü ise 1959 yılında Teksas'ta meydana gelen Hunson Foster türünün ışınlanmasıyla mutasyon edilmiştir. Meyve eti diğer türlere göre en koyudur. Doğal olarak kabuğu da koyu renktedir. Orta mevsim çeşidi ve çekirdeksizdir. Herbisitlere, kök çürüğüne karşı oldukça dayanıklı olmasına rağmen muhafaza edilmesi zordur.

Oroblanco türü ise Kaliforniya eyaletinde yetiştirilen asitsiz bir şadok ile beyaz çekirdekli bir greyfurdun melezlenmesiyle üretilmiştir. Marsh Seedless'e meyve şekli benzemesine rağmen kabuğu kalın ve meyvesi daha büyüktür. Çekirdeksiz bir türdür. Şeker oranı fazla ve asit miktarı düşük olması tatlı olmasına yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda şeker/asit oranının 9/1 olması onu diğer greyfurt türlerinin tadına göre daha tatlı yapmaktadır. Subtropik iklim özelliğine sahip bölgelerde yetiştirildiğinde daha kaliteli ürün vermektedir. İsrail'in ihracatında önemli bir yere sahiptir. Olgunlaşmadan önce kabuğu yeşil-sarımsı renk iken "Sweetie", olgunlaştıktan sonra ise kabuk sarımsı renk alır ve "Golden Sweetie" adını alarak pazara sunulmaktadır [56].

2.4.3. Turunçgillerin Yetiştirme Koşulları

Turunçgillerin üretimi ülkemizde ilk olarak Akdeniz ve Ege kıyılarında daha sonra Marmara ve Karadeniz kıyılarında yapılır hale gelmiştir [57].

Turunçgillerin gelişmesi 12-13 °C'de başlayıp, 25-31 °C sıcaklıklarda ise daha hızlı gelişen, daha yüksek sıcaklıklarda ise gelişmesi yavaşlayıp, 37-39 °C sıcaklıklara gelindiğinde ise gelişmesi durmaktadır. Meyve vermesi için optimum sıcaklık 21 °C'dir. Doğal olarak hava şartlarının (nem, rüzgar, sıcaklık) meyve rengi üzerine etkileri vardır. Örneğin, sıcak iklimde Red Blush türü greyfurt iyi renklenirken, daha serin bir iklimde ise ters sonuç vermektedir.

Rüzgarın şiddeti, süresi, dağılışı gibi etmenler turunçgil yetiştiriciliğini olumlu ya da olumsuz etkilemektedir. Sıcak esen rüzgarlar bitkide su kaybına ve buna bağlı olarak yaprakların ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca, su kaybı dokularda hasara ve

meyvelerin kabuklarında berelenmeye yol açmaktadır. Havadaki düşük nem ise bitkiyi olumsuz etkilemektedir.

Turunçgiller, çoğunlukla kumlu-tınlı, killi-tınlı toprakta, 1.5-2 m.'den daha düşük seviyede su tabanına sahip olup, su geçirgenliği iyi olan topraklarda yetiştirilmektedir. Toprağın pH'ının hafif asitlikte olması istenmektedir. İdeal pH 5.5-6'dır. Topraktaki kireç miktarı %5 'ten fazla olması P, Fe gibi elementlerin alınımını etkilemekte bu yüzden kireç oranı önemli bir faktördür. Bunun yanında, toprağın pH'ı 7'den yüksek olduğunda Fe, Mn, Zn gibi elementlerin eksikliğine rastlanır. Toprakta ne kadar organik madde varsa bitkinin o kadar su tutma kapasitesi vardır [58].

Dünyada 40° kuzey enlemleri ile 40° güney enlemleri arasında turunçgil yetiştiriciliği yapılmaktadır. Tropik bölge, semitropik bölge, subtropik bölge olmak üzere üç ana bölge vardır.

23° kuzey enlemi ile 23° güney enlemi arasında kalan bölge tropik bölgeyi, 23°-30° kuzey enlemi ile 23°-30° güney enlemi arasında kalan bölge semitropik bölgeyi, 30°-40° kuzey enlemi ile 30°-40° güney enlemi arasında kalan bölge ise subtropik bölgeyi içermektedir [57].

36°-42° kuzey enlemlerinde yer alan Türkiye, turunçgil yetiştirilebilmesi için en üst kuzey sınırında, subtropik bölgede yer almaktadır.

2.4.4. Turunçgillerin Dünya ve Türkiye Üzerindeki Dağılımı

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2012 yılı verilerine göre 131 milyon turunçgil üretimi 9 milyon hektar alanı kapsamakta ve en yüksek payı sırasıyla portakal, mandarin, limon ve greyfurt oluşturmaktadır. 2012 yılının Turunçgil türlerine göre dünyadaki üretimi Tablo 2.3'de gösterilmektedir [7].

Tablo 2.3: Turunçgil türlerine göre dünyadaki üretimi (2012).

Türler	Alan (ha)	Üretim (ton)	Payı (%)
Portakal	3,816,692	68,223,759	52
Mandarin	2,345,020	27,060,756	20.6
Limon	980,949	15,118,462	11.5
Greyfurt	289,126	8,040,038	6.1
Diğer	1,353,762	12,840,318	9.8
Toplam	8,785,549	131,283,333	100

FAO verilerine göre dünyadaki turunçgil üretiminin ilk üçünü sırasıyla Çin, Brezilya ve ABD oluşturmaktadır. Türkiye ise 9. sırada yer alıp, 3.6 milyon ton üretim yapmaktadır. 2012 yılına ait dünyada ülkelere göre turunçgil üretimi Tablo 2.4'te gösterilmektedir.

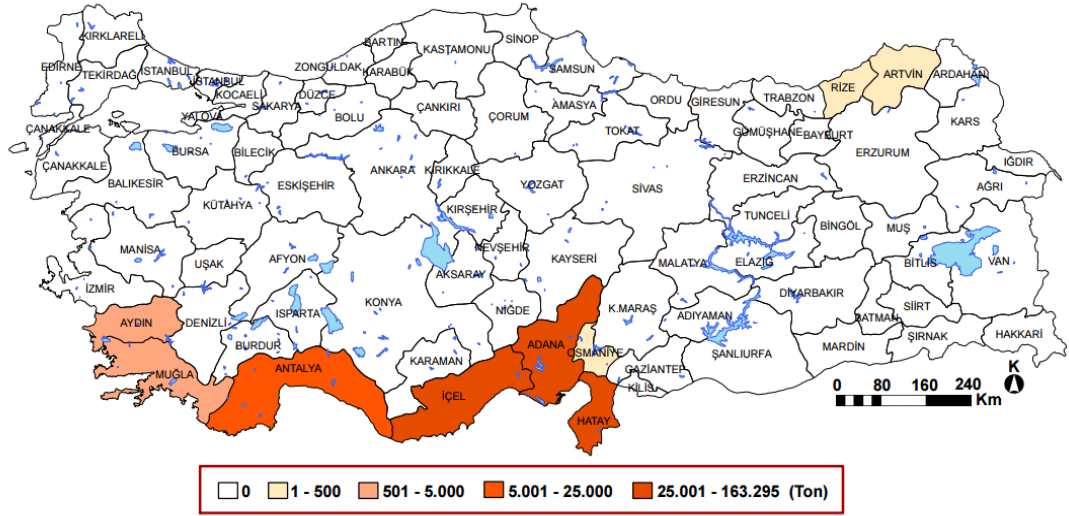
Tablo 2.4: Dünyada ülkelere göre turunçgil üretimi (2013).

Sıra	Ülkeler	Alan (ha)	Üretim (Bin ton)	Payı (%)
1	Çin	2,420,000	31,700,000	24.1
2	Brezilya	833,073	20,258,507	15.4
3	ABD	325,489	10,619,500	8.1
4	Hindistan	766,600	8,000,000	6.1
5	Meksika	553,260	6,750,161	5.1
6	İspanya	318,700	5,501,500	4.2
7	Mısır	175,139	3,980,151	3.0
8	Nijerya	800,000	3,900,000	3.0
9	Türkiye	104,239	3,556,407	2.7
10	İtalya	146,294	2,904,946	2.2
2012	Dünya Toplamı	8,785,549	131,283,333	100

TÜİK'in verilerine göre 2013 yılına ait Türkiye'de en fazla sırasıyla portakal, mandarin, limon ve greyfurt üretilmekte ve oranlar Tablo 2.5'de gösterilmektedir [59]. Türkiye'de illere göre greyfurt üretimi ise Şekil 2.10'da gösterilmektedir [60].

Tablo 2.5: Turunçgil türlerinin Türkiye'deki üretimi (2013).

Tür	Alan		Üretim	
	Hektar	Payı (%)	Ton	Payı (%)
Portakal	54,759	43.0	1,781,258	48.4
Mandarin	38,692	30.4	942,226	25.6
Limon	27,425	21.5	726,283	19.7
Altıntop	6,420	5.0	228,799	6.2
Diğer	47	0.0	2,592	0.1
Toplam	127,343	100	3,681,158	100



Şekil 2.10: Türkiye'de illere göre greyfurt üretimi.

Adana, Hatay, Mersin (İçel) greyfurt üretiminde ilk üç sırayı oluşturmaktadır. Antalya, Muğla, Artvin, Rize illeri takip etmektedir.

Dünya turunçgil ihracatı Tablo 2.6'da gösterilmektedir [60]. İspanya gibi ülkelerin daha kaliteli, iri ve çekirdeksiz turunçgil çeşitlerini pazara sunmasıyla, Türkiye'nin Batı Avrupadaki turunçgil ihracatı neredeyse %50'den %6'lara düşmüştür. Böylece, Türkiye Doğu Avrupa ve Orta Doğu ülkelerinde pazar yeri bularak, ihracatını sürdürmektedir.

Tablo 2.6: Dünya turunçgil ihracatı (Bin \$).

Sıra	Ülkeler	2010	2011	2012
1	Çin	3,386,693	3,461,032	3,494,619
2	Brezilya	954,114	1,059,397	1,039,474
3	ABD	615,797	726,457	971,902
4	Hindistan	896,913	944,199	901,874
5	Meksika	862,251	1,065,186	898,312
6	İspanya	630,859	604,169	670,002
7	Mısır	518,410	568,303	489,906
8	Nijerya	381,453	491,609	358,725
9	Türkiye	367,399	328,485	313,778
10	İtalya	258,806	290,302	289,717
	Dünya Toplamı	11,296,649	11,955,562	11,815,345

2013 yılındaki ihracatla 2012 yılındaki ihracat karşılaştırıldığında mandarin ve limon ihracatı 2013 yılında artmakta iken portakal ve greyfurt azalmaktadır. Tablo 2.7'de Türkiye'nin ürün bazında turunçgil ihracatını vermektedir [61].

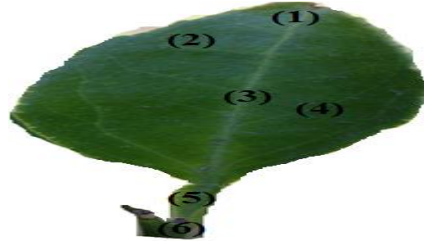
Tablo 2.7: 2012-2013 Yılına ait Türkiye'nin ürün bazında turunçgil ihracatı.

Türler	2012		2013	
	Ton	Bin \$	Ton	Bin \$
Mandalin	405,853	292,674	532,062	356,533
Limon	367,302	266,533	410,328	299,764
Portakal	326,663	229,925	281,474	184,353
Greyfurt	65,708	107,938	137,231	92,210
Genel Toplam	1,265,525	897,069	1,361,094	932,860

Bağımsız Devletler Topluluğu ve Ortadoğu ülkelerine gerçekleştirilen turunçgil ihracatımızın toplam ihracatımıza etkisi oldukça fazladır. Türkiye'nin ihracatında Rusya sektörün önemli bir pazarıdır ve ihracat yaptığımız ülkelere 297 milyon dolar ile ilk sırada yer almaktadır. Ukrayna'ya 157 milyon dolarlık ihracatla %57 oranında bir artış görülmektedir. Irak'a olan ihracatta ise %22 oranında düşüş görülmektedir.

2.5. TURUNÇGILLERİN YAPRAK VE KABUK YAPISI

Turunçgil yaprağının kısımları Şekil 2.11'de gösterilmektedir [62]. Yeni oluşan turunçgil yaprağı açık yeşil renkte olup, belli bir süre sonra koyu yeşil renge dönmektedir. Yaprığın dökülmesine kadar da aynı koyu renk devam etmektedir.



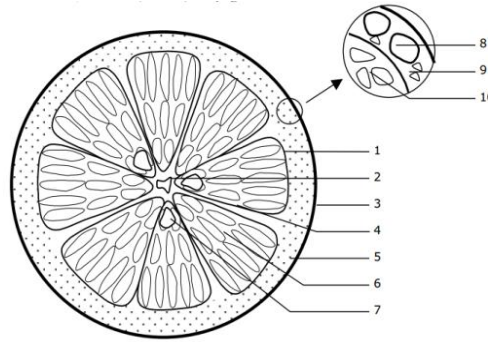
Şekil 2.11: Greyfurt yaprağının yapısı (1): Tepe, (2): Yaprak ayası, (3): Orta damar, (4): Yan damar, (5): Petiyol, (6):Gövde.

Çoğunlukla birleşik yapraklı olan turunçgillerin bazı türlerinde kanatçık ikinci yaprak olarak bulunur. Greyfurt büyük kanatlıdır. İki yılı geçen bir yaprak ömrüne sahiptirler. Yaşlı yapraklarda kuru madde miktarı, genç yapraklara göre fazladır. Kuru maddedeki kül miktarı %12-15'dir. Kül içindeki Ca miktarı yaşlı yapraklarda fazla iken, genç yapraklarda düşüktür. Genç yapraklarda ise K ve P miktarı fazladır. Turunçgil

yaprağının epidermis altında esans bezleri bulunur. Hidrokarbonlardan oluşan esanslardan en önemlileri terpen ve sesquiterpendir [63].

Turunçgil meyveleri "hesperidium" diye adlandırılmaktadır. Turunçgil meyveleri Şekil 2.12'de gösterildiği gibi perikarp yani kabuk kısmı ve endokarp meyve eti kısımları olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır [64].

Epikarp olarak adlandırılan kabuğun en üst kısmı, epikarpın altında da hipoderm olarak adlandırılan ve renk maddelerinin bulunduğu kısım vardır. Yağ bezleri ise hipodermin altında bulunmaktadır. Bu üç kısma birden ekzokarp yani flavedo denilirken, beyaz kısma ise mezokarp ya da albedo denilmektedir. Epikarp tek sıralı kromatofor hücrelerden oluşurken, hipoderm ise iki sıralı hücrelerden oluşmaktadır. Endokarp, meyve eti, segmentlerden meydana gelmiştir. Saptan meyveyi besleyen damarlar gelmekte ve damarlar dağılıp, segmentlere ulaşır, meyveye ve kabuğa kadar yayılmaktadır.



Şekil 2.12: Bir Turunçgilin enine kesiti (1: membran (septum); 2: meyve akısı, 3: flavedo ve yağ bezleri, 4: dilim zarı (segment membran), 5: albedo, 6: meyve suyu torbacıkları, 7: çekirdek (tohum), 8: yağ, 9: flavedo, 10: albedo) [64].

Turunçgil meyvelerinin su miktarı, %70-92'dir, kabukta ise bu oran düşmekte, meyve etinde ise %90'lara kadar çıkmaktadır. Asit olarak en çok sitrik asit bulunur. Bununla beraber, tartarik, oksalik ve malik asit de bulunabilir. Greyfurtta %2.5-3 arası sitrik asit bulunur. Şeker miktarı da oldukça fazladır.

Vitamin bakımından da turunçgiller oldukça zengindir. Vitamin C turunçgillerde en çok bulunan vitamindir. Vitamin C'nin büyük bir bölümü kabuğun flavedo tabakasında

bulunurken, çok az miktarı meyvenin suyunda bulunmaktadır. Bunun yanında, A (karoten), B, C, G, P, E ve D vitaminleri de içerir.

Kabuğun albedo kısmında en fazla pektin ihtiva eder. Glikozitler ise, soğuk algınlığına iyi gelen şekerlerin diğer bileşiklerle oluşturduğu maddelerdir. Flavonoidler, antosiyanin, flavon, flavononlar bu kısma girer. Her turunçgil çeşiti flavonoid yönünden farklılık gösterir.

Klorofil, ksantofil, karoten, kromatofor gibi renk maddeleri bulunmaktadır. Klorofil genç meyvede daha fazla bulunmakta iken, olgunlaşmaya başladığında ise karoten ve ksantofil maddeleri daha fazladır.

Çözünebilir durumda renk maddeleri bazı turunçgillerde bulunur. Antosiyanin kan portakalında kanlılığa neden olurken, likopen ise greyfurdun meyve etinin renkli olmasını sağlar [65].

2.6. TURUNÇGIL YAPRAK VE KABUKLARININ KİMYASAL İÇERİĞİ VE FARMAKOLOJİK ETKİLERİ

Gıdaların olası faydalı etkileri mikro besin (vitamin ve mineraller), fonksiyonel gıda maddeleri ve antioksidan nutrasötikleri içeren ve "fitokimyasal maddeler" olarak adlandırılan maddelerden kaynaklanmaktadır. Fitokimyasallar, kronik ve dejeneratif hastalıkları önlemek için insan metabolizmasını düzenleyen günlük alınması gereken yenilebilir meyve ve sebzelerde bulunan maddeler olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde, bir çok çalışma önemli fizyolojik etkilere sahip olabilen binlerce fitokimyasalları araştırmıştır. Hertog ve diğ. [66] ve Keys [67] artan meyve ve sebze tüketimiyle, Akdeniz Mutfığı gıdalarının kanser ve ateroskleroz gibi dejeneratif patolojilere karşı koruyabileceğini belirlemişlerdir. Epidemiyolojik çalışmalar, diyetle flavonoid alımı ve kalp-damar hastalıkları arasında ters ilişki olduğunu göstermiştir [68]. Fitokimyasallar arasında, turunçgiller oldukça fazla flavonoid içermektedir. Turunçgil meyveleri önemli besin kaynağıdır. Turunçgiller, kanser ve dejeneratif hastalıkları önleyen karotenoid, flavonoid gibi biyoaktif maddeleri, vitamin C ve folik asit içerirler [69]. Yapılan araştırmalar, vitamin C'nin yemek borusu ve rahim kanserine

karşı antikanserojen özellik gösterdiğini ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi olduğunu göstermiştir [70].

Lota ve diğ. [71] yaptığı bir çalışmada, farklı turunçgil türlerinin meyve ve yapraklarının uçucu yağlarının içeriği GC, GC-MS, Karbon-13 NMR kullanılarak analiz etmiş, kabuklarda limonen/ γ -terpiren, limonen/geranial/neral rastlanırken, yapraklarda ise sadece limonen/geranial/neral bileşenlerine rastlanılmıştır. Hosni ve diğ. [72] değişik turunçgil çeşitlerindeki uçucu yağları analiz ederek, yüksek seviyede monoterpen hidrokarbonların bulunduğunu ve bununla beraber limonen ve β -pinen önemli miktarda ihtiva ettiğini belirtmişlerdir. Oktanal, dekanal ve sinensal gibi aldehitler turunçgil yağlarında bulunmaktadır [73]. Ayrıca, tat ve kokuyu oluşturan ester, ketonlar, alkoller bulunmaktadır.

Triterpen türevi olan limonoidlerle beslenen farelerde daha az tümör görülmektedir [74]. Ayrıca, detoksifikasyonu sağlayan glutatyon-S-transferaz (GSP) enzimi limonoidler tarafından aktive edilmekte ve böylece limonoidlerin antikanserojen özelliği kanıtlanmış olmaktadır. Turunçgil meyvesinin ağırlığının yarısını oluşturan kabuğunda flavonoid miktarının en yüksek olduğu bilinmektedir [75]. Holowitz [76] yan ürünlerin önemli miktarda hesperidin, naringin, rutin gibi flavonoidler içerdiğini belirtmiştir. Turunçgiller, sinapik, kumarik, ferulik, kafeik asitler gibi fenolik asitler de ihtiva etmekte ve antioksidan özellik göstermektedir [77]. Antioksidan özellik gösteren bir diğer madde de antosiyaninlerdir. Birçok terapötik etkileri olan antosiyaninler, damar geçirgenliğini koruyup, iltihaplanma ve yaşlılıkla beraber gelen birçok nörolojik fonksiyonlardaki azalmaların önlenmesine etkili olduğu bilinmektedir [78].

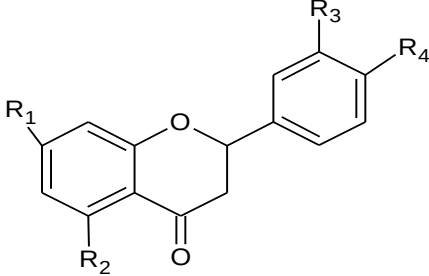
Karotenoidler, yağda çözünen pigmentler olup, 40 karbonlu geniş bir pigment grubunu içermektedir. A vitaminin ön maddesi olarak bilinen β -karoten süperoksit radikalleri kendine bağlayarak, antioksidan özellik göstermektedir. Böylece, karotenoidler, serbest radikallerin hücrede meydana getirdiği yıkıcı reaksiyonları önleyip, DNA'ya zarar verecek olan kanserin oluşmasını engeller. Bunun yanı sıra, β -karotenoidler, bağışıklık sisteminde oluşabilecek hasarları engelleyerek, prostaglandin vb. maddelerin salgılanması yardımcı olup, bağışıklık sistemini korurlar [79].

2.6.1. Turunçgil Yaprak ve Kabuklarında Bulunan Flavonoidler ve Farmakolojik Etkileri

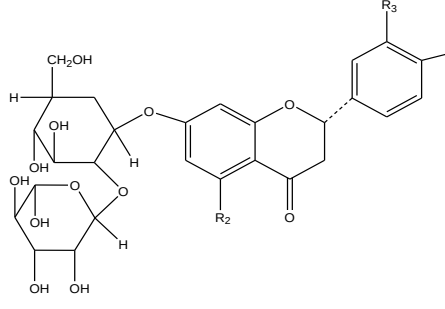
Turunçgil flavononlar glikozit ya da aglikon olarak bulunurlar. Aglikon ve glikon formunda turunçgil flavonoidlerinin moleküler ağırlığı ve yapısal karakteristiği Tablo 2.8'de verilmiştir [80]. Aglikon olarak bulunan naringin ve hesperetin en önemli flavanonlardır. Neohesperidositler ve rutinositler glikozitler arasında iki çeşit olarak sınıflandırılmaktadır.

Neohesperidositler, flavanonlar, naringin, neohesperidin, ve neohesperidoslu flavanonla oluşan neoeriositrindir ve tatları acıdır. Rutinositler ise (flavanonlar, hesperidin, narirutin ve didymin) flavanon ve disakkarit atıklardır ve tatsızdırlar. Flavanonlar genellikle diglikozit formda bulunur, turunçgil meyvelerine karakteristik tadı verirler.

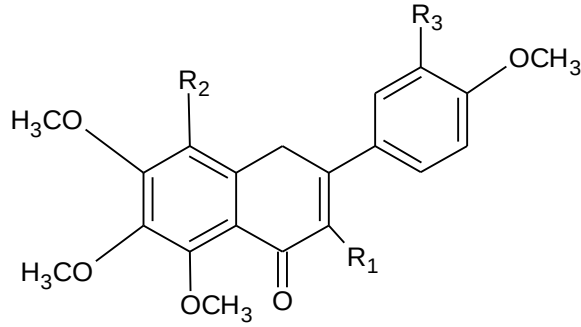
Tablo 2.8: Aglikon ve glikon formunda turunçgil flavonoidlerinin moleküler ağırlığı ve yapısal karakteristiği.

Bileşikler	Yapısal Formülü	Moleküler Ağırlık	Moleküler Formu
Flavanon aglikon formu			
Naringin	R ₁ :OH , R ₂ : OH, R ₃ :H, R ₄ :OH	271 Da	C ₁₅ O ₅ H ₁₁
Hesperedin	R ₁ :OH , R ₂ : OH, R ₃ :OH, R ₄ :OCH ₃	288 Da	C ₁₅ O ₆ H ₁₃
Isosakuranetin	R ₁ :OH , R ₂ : OH, R ₃ :H, R ₄ :OCH ₃	285 Da	C ₁₆ O ₅ H ₁₃
Heridictyol	R ₁ :OH , R ₂ : OH, R ₃ :OH, R ₄ :OH	287 Da	C ₁₅ O ₆ H ₁₁

Tablo 2.8 (devam):

Flavon Neohesperidosit Formlar			
Naringin	R ₂ : OH, R ₃ :H, R ₄ :OCH ₃	604 Da	C ₂₉ O ₁₄ H ₃₂
Neohesperidin	R ₂ : OH, R ₃ :OH, R ₄ :OCH ₃	634 Da	C ₃₀ O ₁₅ H ₃₄
Ponkirin	R ₂ : OH, R ₃ :H, R ₄ :OCH ₃	588 Da	C ₂₉ O ₁₃ H ₃₂
Neoeriositrin	R ₂ : OH, R ₃ :OH, R ₄ :OH	620 Da	C ₂₉ O ₁₅ H ₃₂

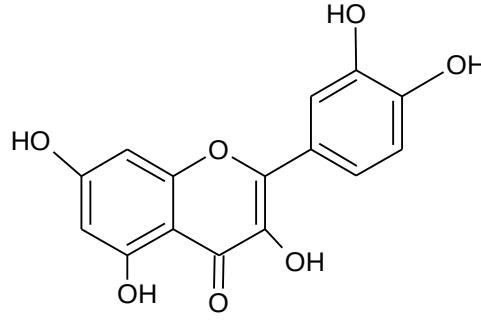
Bitkilerdeki fenolik bileşikler ve flavonoidler HPLC-MS cihazı ile belirlenmektedir. Bu bileşikler alıkonma zamanına göre iki gruba ayrılabilir. İlki seyreltilmiş flavanon glikozitler, diğeri ise polimetoksilat flavonlardır ve Şekil 2.13'de gösterilmiştir.



Şekil 2.13: Polimetoksilat flavonlar.

Flavonoidler arasında, antosiyaninler, yapısal olarak pıran ya da flavandan türetilen ve moleküle oksijen katkısı sağlayan yapılardır. Kateşinler, lökoantosiyaninler, proantosiyaninler tanin olarak adlandırılan flavan gruplarıdır. Monoflavan, diflavan, triflavanlar monomer, dimer ve polimer formda olabilirler.

Flavonoidler, bitkilerde pigment içeren gruplardan biri olup, çiçek ve meyvenin renklenmesinden sorumludurlar. Turunçgil kabuk ve tohumları, fenolik asit ve flavonoid gibi fenolik içeriklerce zengin maddeler içermektedir. Yusof ve diğ. [81] turunçgil kabuklardaki flavonoid miktarlarının tohumlardakinden daha zengin olduğunu ortaya koymuşlardır. Kroyer (1986) [82] ise bu yan ürünlerin doğal antioksidan özelliğe sahip olduğuna ve bu yüzden de onların değerlendirilmesi gerektiğini belirtmiştir. Turunçgil meyvesi, kabuk, tohum, yapraktaki bileşiklerin miktarları her zaman farklıdır. Örneğin, limon tohumu eriositrin ve hesperidin içerirken, kabuk neoeriositrin, naringin, neohesperidin içerir. Üstelik glikozit flavanonların konsantrasyonları farklı, kabuklardaki neoeriositrin ve naringin içeriği ise benzer konsantrasyonlara sahiptir. Bocco ve diğ. [83] kabuktaki eriositrin miktarı naringin miktarının neredeyse 40 katı daha fazla olduğunu belirtmiştir. Neohesperidin, naringin ve neoeriositrin kabuktan büyük miktarda özütlenabilir. Acı portakal önemli neohesperidin ve naringin kaynağıdır. Bergamotun tohumlarında glikozitli flavanonlar, naringin, neohesperidin varken, limon ise eriositrin ve hesperidince zengindir. Bütün turunçgil meyvelerinde glikozit naringine rastlanılmıştır. Meyve sularının tersine yaprak ve tohumlarda flavanon glikozil bileşiklerinin miktarı oldukça fazladır. Naringin, limon kabuğu, tohumu ve mandalina tohumunda bulunurken, meyve sularında bulunmamaktadır. Antosiyaninler ise çiçek ve meyvelerin renk veren kısımlarında bulunur, ancak bazen yapraklar ve köklerde de bulunur. Antosiyanin, portakalın hem epikarp hem de mezokarp kısmında bulunur. Flavonoidler, birçok serbest radikal türlerine hidrojen vererek, radikal temizleme görevi görürler. Siklooksigenaz, lipooksigenaz ve protein kinaz C enzimlerini inhibe ederek, geçiş metallerini şelatlarlar. Flavonoidlerde bulunan yapısal gruplar serbest radikalleri yakalayıp, temizlemektedir. Bu yapısal gruplar, radikal hedef yeri için gerekli, B halkasındaki o-dihidroksi (kateşol) grubu, elektron delokalizasyonu için gerekli, C halkasındaki 4-okso grubu ile 2-3 çift bağı, radikal yakalama ve metal şelatlama için gerekli 3 ve 5 hidroksil grupları bulundurur. Şekil 2.14'de gösterilen kuersetin molekülünde bu fonksiyonel grupların hepsi bulunmaktadır [84]. Dolayısıyla bu üç grubu birden barındıran moleküllerin aktiviteleri daha yüksektir.

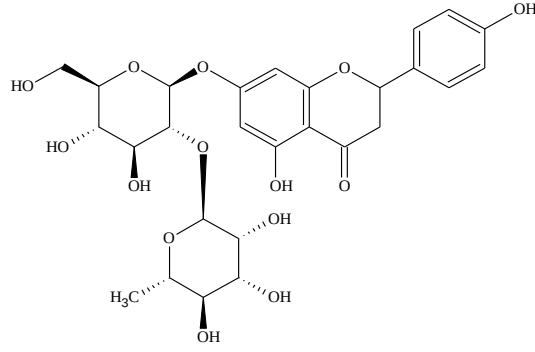


Şekil 2.14: Kuersetin molekülü.

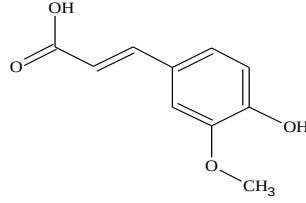
Flavonoidlerin, antioksidan özelliklerinin yanı sıra antitümör etkisi, antiviral etkisi, antirombotik etkisi, antiinflamatuvar etkisi, antialerjik etkisi, aterosklerosis ve kronik kalp hastalıklarına karşı koruma etkisi, vasodilasyon ve hücrel immünitenin sitümülasyonu etkisi olduğu bilinmektedir [85].

2.6.1.1 Greyfurt Yaprak ve Kabuklarında Bulunan Flavonoidler ve Farmakolojik Etkileri

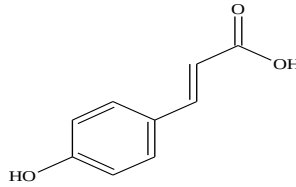
Greyfurt yapısında sağlık için son derece önemli fenolik asitler ve flavonoidler gibi önemli miktarda polifenolik maddeler içermektedir. Yapısındaki başlıca flavonoid ve fenolik asitleri naringin, ferulik asit ve kumarik asit oluşturmaktadır. Naringin, ferulik asit ve kumarik asitin yapıları Şekil 2.15 ile gösterilmektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 2.15: (a) naringin, (b) ferulik asit, (c) p-kumarik asit polifenollerin molekül yapıları.

Bu fenolik ve flavonoid asitler ile ilgili gerçekleştirilen in vivo ve in vitro çalışmalarında bu bileşiklerin antikanse, antioksidan, antikolestrol gibi özelliklere sahip olduğu belirtilmektedir.

Martin ve diğ. [14] naringin maddesinin mideyi koruyucu özelliğini fareler üzerinde test etmiş ve mide lezyonlarına pozitif etki gösterdiklerini yaptığı çalışmada belirtmiştir. Farelere ağız yoluyla verilen naringenin ülserle karşı yararlı olduğunu tespit etmişlerdir. Lee ve diğ. [13] turuncgillerde var olan biyoaktif maddelerden naringin ve naringenin

antiaterom (atardamarların duvarında oluşan normal olmayan yangısal makrofaj akyuvar kümelenmesi) özelliğini tavşanlar üzerinde denemişlerdir. Turunçgillerde bulunan polifenollerin antiaterom hususiyetini ve hepatik asil-CoA kolesterol asiltransferaz (ACAT: Hücre içinde kolesterol esterinin oluşumundan sorumlu enzim) aktivitesini düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Yüksek kolestrolle beslenen farelerle yapılan çalışmada ise naringinin antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Naringin ilave edildiğinde plazma vitamin E konsantrasyonunun arttığı görülmüştür. Bu flavonoidler, süperoksit dismutaz (SOD: süperoksidin hidrojen peroksite dönüşmesini katalize eden antioksidan bir enzim) ve katalaz (hidrojen peroksite (H_2O_2) degradesyonunu katalizleyen enzimlere verilen genel bir addır) enzimlerinin aktivitelerini artırarak, antioksidan özelliğe sahip olduğunu göstermişlerdir [86].

Pang ve diğ. yaptıkları bir çalışmada ise naringinin kemik yapısına etkisini incelenip, naringinin kemik yapısını geliştirdiği belirtmişlerdir [87].

Greyfurtta yüksek miktarda bulunan fenolik asitlerden biri de ferulik asittir. Ferulik asitin, antioksidan, antimikrobiyal, anti-tromboz ve antikanserojen aktiviteler gösterdiği literatürdeki çalışmalarda belirtilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı, kozmetik ve alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ferulik asitin kolesterol düşürücü, koroner hastalıklara karşı koruyucu özellikte olduğu belirtilmiştir [88].

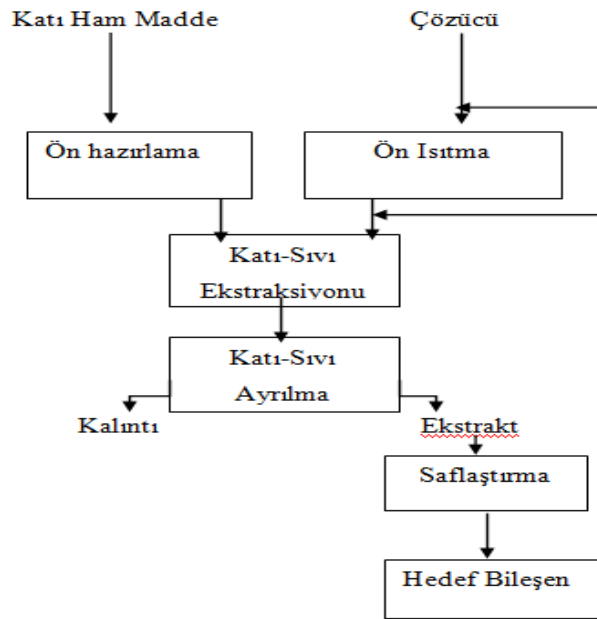
Greyfurtta yüksek miktarda bulunan diğer bir flavonoid madde ise p-kumarik asittir. Abdel-Wahab ve diğ. [89] yaptıkları çalışmada p-kumarik asitin antimikrobiyel, antikanserojen etkilerini göstermişlerdir. Fareler üzerinde gerçekleştirilen in vivo testlerde, antitümör tedavisinde kullanılan kardio-toksisite etkisi bulunan Doksorubisin adlı antibiyotiğin, kardio toksisite etkisini azaltmak için p-kumarik asitle beraber farelere verilerek, p- kumarik asitin kardio koruyucu etkisi rapor edilerek, böylece doksorubisin kardio-toksisite etkisi azaltılmıştır.

2.7. KATI-SIVI EKSTRAKSİYON

Katı-sıvı ekstraksiyon, bitkilerden biyoaktif maddeleri elde etmek için kullanılan en eski proseslerden biridir. Milattan önce 3500 yıllarında Mezopotamya'daki kazı bulgularında

tıbbi ve kozmetik uygulamalarında kullanılan bitki ekstraktlarına rastlanılmıştır. Katı-sıvı ekstraksiyon, ayırma işlemlerinde en çok uygulanan prosestir. Katı-sıvı ekstraksiyonunda, kullanılan çözücü yardımıyla katıdan istenilen maddenin özütlenmesi işlemidir. Diğer ayırma işlemlerinin aksine, kompleks birden çok bileşenli karışımlar katı-sıvı ekstraksiyon proseslerinden elde edilir. Bir ya da daha fazla saflaştırma adımları zenginleştirilmiş bitki ekstraktlarını ya da saf maddeyi elde etmek için gereklidir. Katı-sıvı ekstraksiyonun basitleştirilmiş blok şeması Şekil 2.16'da gösterilmiştir [90]. Katı hammadde çözücü ile karıştırılır ve ekstrakte edilir. Ardından, katı ve sıvı fazlar ayrılır ve farklı saflaştırma adımları uygulanıp, istenilen bileşim elde edilir.

Katı-sıvı ekstraksiyon kinetiği çözücü türü, pH, katı-sıvı oranı, partikül boyutu ve sıcaklık gibi birçok parametreden etkilenir. Doğru çözücü seçimi hedef bileşen üzerine seçimliliği doğru yönde etkilemektedir. Böylece, çözücü polaritesi ve pH, ekstrakte edilen maddenin yüksek verimliliği için oldukça önemlidir. Katı-sıvı ekstraksiyon işlemi, şifalı bitkilerden eczane ve nutrasötikler gibi şeker kamışı ve şeker pancarından şeker, otlardan uçucu yağlar, yağlı tohumlardan yağların ekstraksiyonu gibi birçok değişik prosesleri kapsamaktadır.



Şekil 2.16: Katı-sıvı ekstraksiyonun basitleştirilmiş blok şeması [90].

Yüksek performansta ekstraksiyon işlemi için, kısa sürede ve yüksek ekstrakt verimi elde etmek için hedef maddenin seçilen çözücüde yüksek çözünürlükte olması gerekmektedir. Ekstraksiyon prosesinde verimi etkileyen en önemli etkenlerden birisi kullanılan çözücünün türünün viskozite ve akış hızı gibi özellikleridir. Doğal matristen ekstraksiyon için çözücü karakterisasyonu Tablo 2.9'da gösterilmektedir [91].

Kütle transferine önemli etkisi olan katı-sıvı oranı ve partikül boyutu da ekstrakt verimini etkileyen önemli parametrelerden sayılmaktadır. Küçük partiküllerin yüzey alanı fazla olduğundan, katı ve sıvı arasındaki temas fazla olup, yüzeye ulaşan difüzyon yolu ortadan kalkıp, hızlı ekstraksiyon hızıyla sonuçlanır. Katı-sıvı ekstraksiyonunda diğer parametreler ise, sıcaklık, katının hazırlanması, malzemenin nemliliği gibi parametrelerdir.

Tablo 2.9: Doğal matristen ekstraksiyon için çözücü karakterisasyonu.

Özellikler	Prosesteki Etkisi
Seçimlilik	Çözücü seçimliliği ekstrakt edilmesi istenilen bileşenle çözündürür.
Çözünürlük için Uygunluk	Ayrırmak istenilen bileşenle çözücü reaksiyona girmemelidir.
Kimyasal ve Isıl Kararlılık	İşletme koşullarında çözücünün kararlılığı nihai özütü değiştirmediğine emin olunmalıdır.
Düşük Viskozite	Düşük viskozite difüzyon katsayısını yükseltmek için gereklidir.
Kolay Gerikazanım	Ekonomik koşullar dikkate alınmalıdır. Düşük kaynama noktasına sahip çözücüler kolay geri kazanılıp yeniden kullanılırlar.
Düşük Tutuşabilirlik	Tutuşabilir çözücülerden kaçınılmalıdır.
Düşük Toksisite	Doğal ürünlerin eldesinde toksisitesi düşük çözücüler kullanılmalıdır.
Düzenleyici Konular	Eczacılık ve gıda endüstrisine göre, çevre kuralları dikkate alınmalıdır.
Tüketici Kabulü	Tüketiciler kullanılan çözücüyü kabul etmelidir.
Düşük Maliyet	Ekonomik açıdan nihai ürün kalitesine katkıda bulunabilir.

Katı-sıvı ekstraksiyonu işleminde kullanılan gıda materyelinin ekstraksiyon işlemi için hazırlanması önemlidir. Çözünen, hücre yüzeyinde olmasına rağmen, birçok durumda hücre içi boşluklarda depolanmaktadır. Çözücü ekstraksiyonunda katı malzemenin öğütücülerden ya da ufaltıcı gibi ön işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Çözücü ekstraksiyonu işleminden önce öğütme işleminden geçirilen malzeme sıvı ve katı matriksi arasında temas alanının artmasını hızlandırır. Hücrenin farklı kısımları, porları, hücre yapısının kompleksi yüzünden, biyolojik malzemenin difüzivitesi etkili difüzyon sağlanabilmesi açısından önemlidir. Etkili difüzivite katı malzemedeki çözünenin bileşimine bağlıdır. Normalde, ekstraksiyon prosesinin verimliliği açısından yüksek sıcaklık gereklidir. Yüksek sıcaklığın, çözültideki çözünenin çözünürlüğü artırıcı etkisi bulunmaktadır. Çözücü kütlesindeki artan çözünen difüzyon hızı yüksek kütle transfer hızına neden olur. Yine de gıda endüstrisinde, artan sıcaklıkla ısıya duyarlı bileşenlerin degradasyonu gibi istenmeyen reaksiyonlar oluşabilir.

Ekstraksiyon işleminde çözücü seçimi çözücünün fizikokimyasal özelliklerine, maliyetine ve toksisitesine bağlıdır. Çözücü seçimi, arayüzey gerilimi, viskozite, stabilite, reaktivite, maliyet gibi özelliklerinin yanı sıra seçimlilik ve çözünen malzemenin çözünürlüğüne bağlıdır. Bazı organik çözültülerin toksisiteleri yüzünden, gıda endüstrisinde kullanımında bazı sınırlar getirilmiştir. İyi üretim uygulamalarına (GMP) göre, bazı çözücüler insanların tüketmeleri açısından, aseton, etanol, etilasetat, 1-propanol, 2-propanol, ve propilasetatın küçük miktarda yüzdelere kadar kullanımı kabul edilebilir. Gıda ve İlaç Dairesine (FDA) göre, bu çözültüler üçüncü sınıfa girerken, asetonitril, kloroform, hekzan, metanol, toluen, etil metil keton ve diklorometan, kozmetik ve gıdada toksisiteleri yüzünden ikinci sınıfa girmektedir. İkinci sınıfa giren çözücülerin konsantrasyonları 50 ile 3880 ppm arasında değişiklik göstermektedir. Birinci sınıf çözücüler ise çevreyi tahrip eden ve aşırı toksisitesi olan benzen, karbon tetraklorür, 1,2-dikloroetan, 1,1-dikloroetan sayılabilir [92].

Günlük hayatta, sıcak su çözücü olarak kullanılarak, öğütülmüş hammaddeden kahve ve çay yapımı katı-sıvı ekstraksiyon işlemine örnek olarak verilebilir. Birçok alanda bu prosesler kullanılmasına rağmen, ekstrakt verimi ve ekonomi açısından ekstraksiyon prosesinin optimize edilmesi gerekmektedir. Literatür incelendiğinde, bitki temelli ekstraksiyon prosesleri için ekipmanların modellenip tasarlanması gerekmektedir.

Patentler dikkate alındığında ise genelde maserasyon yöntemi kullanıldığı görülmüştür. Son zamanlardaki literatür çalışmaları incelendiğinde, hem maliyet hem de uygulanabilirliği açısından MDE, UDE ve SAE yöntemleri kullanılmıştır.

Katı malzemenin içindeki su, çözünen malzemenin çözünmesi için ekstraksiyon çözücüsü ile yarışabilmektedir. Diğer yandan bu nemlilik, çözünenin taşınımına izin vermektedir. Yine de, malzemenin degradasyonuna neden olmayan koşullar altında malzeme kurutulmalıdır.

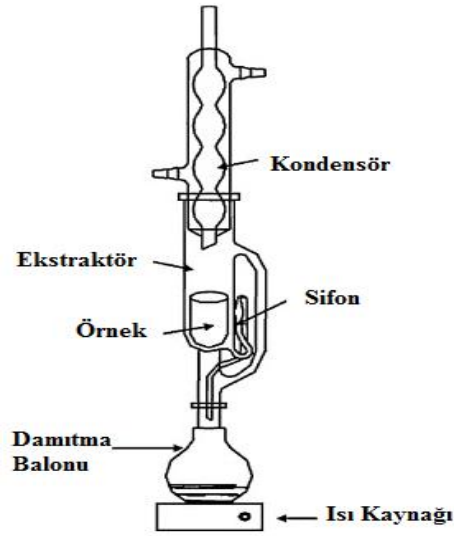
2.7.1. Maserasyon Ekstraksiyonu

Bitki esaslı çözücü ekstraksiyonu için en yaygın ve eski yöntem maserasyondur ki, sıcaklığı kontrol edilen sürekli karıştırılmış bir kap içinde yürütülen bir işlemdir. Katı-sıvı ekstraksiyonda, difüzyon ve kütle transfer katsayıları belli bir zamanda dengeye ulaşır ve sabit kalır.

Çözeltiyle karıştırılan hammadde ekstraksiyon boyunca, istenilen konsantrasyona ulaşana kadar karıştırıcılar yardımıyla karıştırılır ve ardından sıvı alınır. Tankta katı kalır ve eğer gerekliyse farklı ekstraksiyon adımı eklenebilir. Günümüzdeki maserasyon ekstraktörlerinin çalışma kapasitesi 6000 L kadardır [93].

2.7.2. Soxhlet Ekstraksiyonu

Alman kimyacı Franz Ritter von Soxhlet, Soxhlet ekstraktörüyle alakalı, süt yağının belirlenmesi ile alakalı ilk makaleyi 1879 yılında çıkarmıştır. Soxhlet ekstraksiyonu, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden biridir ve geniş ölçüde kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktör sistemi, selüloz soxhlet kartuşu, balon, bir sıvı akış borusu (sifon), yoğunlaştırıcı ve ısıtma sisteminden meydana gelmektedir. Soxhlet ekstraktör sistemi Şekil 2.17'de gösterilmektedir [94].



Şekil 2.17: Soxhlet ekstraktör sistemi [94].

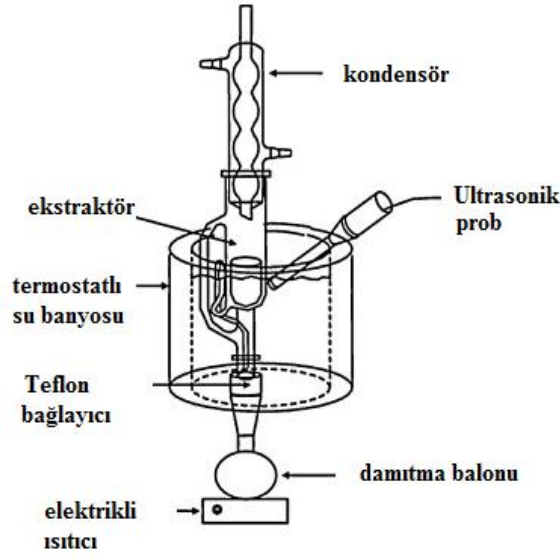
Katı örnek, selüloz ekstraktör kartuşu içine yerleştirilir. Kartuş Şekil 2.17'deki gibi ekstraktörün içine konulur. Damıtma balonuna kaynama taşı atılır ve çözücü damıtma balonuna eklenir. Ekstraktörün üst kısmına ise soğutucu konulur. Isıtıcının sıcaklığı çözücünün kaynama sıcaklığı üzerine getirilir. Kaynayan çözücünden gelen buharlar yoğunlaşmanın olduğu kondansatöre hareket ederek yoğunlaşır ve kartuşun içindeki numuneye damlar. Örnek çözücü ile ıslanır ve çözücü seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, çözücü tüm örnek bölmesini boşaltarak, çözücü balonuna geri akmaya başlar. Bu işleme sifon yapma denir ve sıcak çözücü birkaç kere örnek içerisinde sirküle olur. Soxhlet işleminde, kesikli sistem gibi görünmesine rağmen, işlem süresince ekstrakt yeniden sirküle olduğu için sistem sürekli proses gibi davranır.

Çözücü balonunda ektrakte edilen analitler kalırken, sadece temiz çözücü buharlaştığından, her sirkülasyonda taze çözücü kullanılmaktadır. Sifon sayısı ve ekstraksiyon süresi Soxhlet işleminde ekstrak verimi açısından önemlidir. Ekstraksiyon süresi 6 ile 24 saat arasında değişmekle beraber çözelti hacimleri ise 100-500 mL arasında değişmektedir. Soxhlet cihazının maliyeti oldukça düşüktür. Yöntemin avantajlarından birisi de örnek sürekli olarak taze çözücü ile temas içindedir. Bu durum, bitki matriksinden analitin uzaklaşmasını artırır. Destilasyon balonunun ısıtılmasıyla, ekstraksiyon kavitesine ulaşır, sistemin sıcaklığı oda sıcaklığından fazla olur. Sistemin ikinci avantajı ise, diğer ekstraksiyon yöntemlerinde filtrasyona gerek varken, Soxhlet

ekstraksiyonunda ise gerek yoktur. Yeni ekstraksiyon yöntemlerine göre, daha çok miktarda özüt elde edilebilir. Dezavantajları arasında ise organik çözücü miktarının çok fazla olması ve ekstraksiyon süresinin çok uzun olmasıdır. Aşırı miktarda çözücü kullanılması çevresel problemlere neden olmakta aynı zamanda maliyeti artırmaktadır. Ayrıca uzun süre çözücünün kaynatılmasıyla ısı olarak kararsız olan özütlerin bozulmasına neden olmaktadır. Soxhlet ekstraksiyonunda çözücü seçiciliği ile sınırlıdır. Geleneksel Soxhlet ekstraksiyonu dışında, basınçlı Soxhlet ekstraksiyonu, otomatikleşmiş Soxhlet ekstraksiyonu, mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu ve ultrases destekli Soxhlet ekstraksiyonu yöntemleri de bulunmaktadır.

Geleneksel Soxhlet ekstraksiyon yöntemi modifiye edilerek, numune kartuşuna uygulanan basınç artırılarak, çözücü katı örnekle daha kolay temas etmektedir. Böylece hem ekstraksiyon süresi hem de çözücü hacmi düşmektedir. Ancak çalışma şartları yüksek basınç olduğundan, deneysel zorluk yaratmaktadır. Otomatikleştirilmiş Soxhlet ekstraksiyonunda ise, hem ekstraksiyon süresi kısalmakta, hem de çözücü hacmi azalmakta ve birden fazla numunenin eş zamanlı ekstrakte edilmesini sağlamaktadır. Yüksek basınç altında Soxhlet ekstraksiyonu, silindirik paslanmaz çelik otoklav ekstraktörlerde ya da ticari ya da laboratuvar yapımı süperkritik akışkan Soxhlet ekstraktörlerde gerçekleştirilmektedir. Yüksek basınçlı Soxhlet ekstraksiyonunda özütler süperkritik koşullara varmamaktadır. Örnek olarak, normal basınç ve sıcaklık altında düşük kaynayan çözücüler ve gazlar gösterilebilir. Yüksek basınçlı Soxhlet ekstraksiyonu 1000-1500 psi basınçta gerçekleştirilir. Yüksek basınçlı Soxhlet ekstraksiyonu, organoklorür pestisitleri izole edilmesinde, patates, havuç, zeytinyağı ve liyoflize edilmiş balık doku örneklerinin belirlenmesinden önce poliklorlü bifeniller (PCBler) izole edilmesinde kullanılmaktadır. Bu uygulamalarda, karbondioksit bu ekstraktant ortamı olarak kullanılmaktadır. Ekstraktantın yoğunlaşması için, ekstraksiyon seti pompa sistemiyle termostatl banyoya daldırılır.

Ultrases etkisinin avantajı dikkate alınarak, Ultrases Destekli Soxhlet aparatı geliştirilmiştir. Soya fasülyesi, ayçiçek yağı gibi yağlı tohumlarından toplam yağın ekstraksiyonunda bu ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Ultrases Destekli Soxhlet (UDS) aparatı Şekil 2.18'de gösterilmektedir [95].



Şekil 2.18: Ultrases-destekli Soxhlet ekstraksiyonu [95].

Soxhlet ekstraksiyon performansını geliştirmek için, mikrodalgayla kullanımı sağlanmış ve birçok uygulamada kullanılmıştır. Mikrodalga destekli Soxhlet ekstraksiyonu (MDSE), mikrodalga destekli ekstraksiyon tekniklerinden dört bakımdan farklılık gösterir. Ekstraksiyon yapılan ortam açıktır ve genelde normal basınç altında çalışır. Mikrodalga ışıması örnek bölümüne nüfuz eder. Ekstraksiyon adımı kısmen ya da tümüyle geleneksel Soxhlet tekniği gibi çalışır. Sonradan filtre etmeye gerek yoktur. Bu ekstraksiyon tekniğinde gerekli kısıtlamaların üstesinden gelinmekte geleneksel Soxhlet ekstraksiyonunun avantajları sabit kalmaktadır [96].

2.7.3. Ultrases Destekli Ekstraksiyon (UDE)

20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler meydana getiren ve ses dalgaları oluşturan ekstraksiyon yöntemine ultrasonik destekli sıvı ekstraksiyon yöntemi denir. Ultrasonik enerji kavitasyon (boşluk oluşumu) olarak bilinen etkiye neden olup, sıvı içinde birçok ufak kabarcıklar üretilerek, partiküllerin kopmasını içeren katının mekanik erozyonuna neden olur. Sonokimya, analitin geri kazanılması için katı ve çözücü arasında verimli bir temas sağlar. Hem katı hem de sıvı hazırlarken, ses dalgaları kullanılmaktadır. Ses dalgaları katı ekstraksiyon için kullanılırken çamur oluşumunu

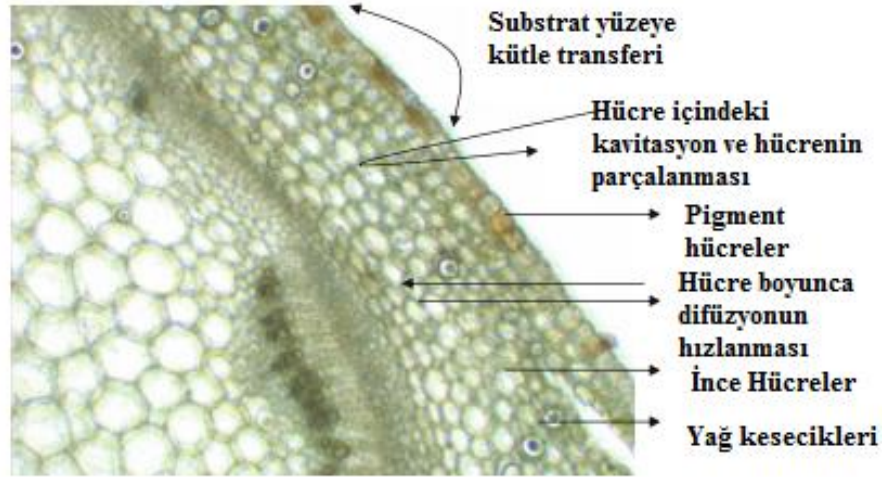
sağlarken, sıvılar için ise homojenizasyon veya emülsiyon işlevinde kullanılmaktadır. Ultrasonik su banyosu ya da prob (ultrasonik cihazın ucuna takılan hareketli kısım) gibi ekipmanların kullanılmasıyla bu işlem gerçekleşir. Maliyeti düşük ve yaygın olarak kullanılan ultrases kaynağı ultrasonik banyodur. Katı ile sıvının daha etkili teması için silindirik bir prob kullanılmıştır. Prob katı ve sıvının temasını artırdığından dolayı, ekstraksiyon süresi azalmış olmaktadır. Bunun yanısıra prob kullanılarak daha etkili bir homojenizasyon sağlanır. Ancak, ultrasonik prob uçları belli bir zaman sonra aşınır ve yenisine ihtiyaç duyulur. Bu özellikler ultrasonik prob ile çalışmanın maliyetini getirir. Ultrasonik cihazla çalışırken, diğer ekstraksiyon yöntemlerinde de ekstrakt verimini etkileyen ekstraksiyon süresi, örnek miktarı, örnek partikül miktarı, çözücü türü, ultrasonik genliği, gücü, prob çapı, sıcaklık gibi ekstraksiyonu etkileyen parametrelerin optimizasyonuna gerek duyulmaktadır. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda, sonikasyon döngüsünün (pulsu ya da sürekli çalışmak) ekstraksiyon verimine etkili olduğu gösterilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sisteminde, ses dalgalarının etkisiyle ortam sıcaklığında artma görülmektedir. Bunu için ekstraktörün soğutulması gerekmektedir [97].

Normal ses dalgaları gibi ultrases dalgaları da içlerinden geçtikleri moleküler ortamlarda bir seri sıkışma ve genişleme basınç dalgalarıyla iletilir. Ultraste titreşim enerji kaynağı transdüserdir. Ultrasonik transdüserler, hem mekanik enerjiyi, hem de elektrik enerjisini yüksek frekansta sese dönüştürmek için tasarlanmıştır. Ultrasonik prob gibi sonik sistemlerde yaygın olarak piezoelektrik transdüserler kullanılır. Laboratuvarlarda kullanılan şiddetli ultrases kaynağı direkt batırılmış ultrasonik kornodur. Korno sistemlerinde, ultrasonik dalga yayan korno, çözücü ve materyal içeren ortama daldırılır. Ultrasonik cihazın kontrol ünitesi sayesinde zaman, güç, sıcaklık, dalga genliği istenilen seviyeye ayarlanabilir. Oluşan ultrases sayesinde, çözücü içindeki bitki hücresi parçalanmış olur.

Dinamik ultrases destekli ekstraksiyon sistemi veya statik ultrases destekli ekstraksiyon sistem tipleri mevcuttur. Dinamik ekstraksiyon sisteminde, analitler bitki matriksinden çözücüye transfer olduktan sonra uzaklaşır. Böyle sistemlerde, taze çözücü ile katı matriks sürekli olarak beslenmektedir.

Ultrasound, günümüzde elektrokimya, gıda teknolojileri, yüzey temizleme, arıtma, nanoteknolojik gibi uygulama alanlarında kullanılmaktadır. Bitki ekstraktlarının eldesinde 1950'lerden beri ultrasound destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Cocito ve diğ. [98] ultrasound destekli ekstraksiyon ve diğer ekstraksiyon yöntemlerinin özüt verimine etkisini incelemişler ve ultrasound destekli ekstraksiyon yönteminin diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha etkili olduğunu göstermişlerdir.

Ultrasound ekstraksiyonunda sonikasyon bitki hücrelerini parçalayıp, difüzyon ve ozmotik prosesi hızlandırdığı belirlenmiştir. Bu olay, hem ekstraksiyon hızını arttırmakla beraber ekstraksiyon verimini de artırmaktadır. Sonikasyon işlemi boyunca önce çözücü bitki hücrelerine difüzlenerak hücreyi şişirir, sonra hücre duvarı yırtılarak, hücre içindeki bileşimler çözücüye geçer [99]. Hücre duvarının önce şişip, sonra kavitasyon ile hücre duvarının parçalanması ve çözücünün hücre içine nüfuz etmesi Şekil 2.19'da gösterilmektedir.



Şekil 2.19: Hücre duvarının kavitasyon ile parçalanması ve çözücünün hücre yapısı üzerine nüfuzu [99].

2.7.4. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi (MDE)

Mikrodalgalar, dalga boyları 1.0 m ile 1.0 mm arasında olup, frekansı 300 MHz ve 300 GHz arasında değişen elektromanyetik ışımalardır. Elektromanyetik radyasyonun bir

çeşidi olan mikrodalgalar, elektromanyetik spektrumda kızıl ötesi (infrared) dalgaları ile radyo dalgaları arasında yer alırlar. Mikrodalgalar, dipolar veya iyonik parçacıkların hareketi veya göçü ile moleküler bir harekete sebep olup, moleküllerin ısınmasına yol açarlar. Isıtma prosesi 2450 MHz frekansında oluşur. Mikrodalgalar saniyede 4.9×10^4 kez elektrik komponenti değişimi vardır. Maddenin dielektriksel özelliği 3 türdür. Elektriksel alanla etkileşim gösteren dielektrik özelliğine bağlı geçirgenlik (permittivity, ϵ), manyetik alanla etkileşim gösterilmesine permeability, resistivity ise maddenin elektriksel akıma karşı direnç gösterme özelliğidir. Permittivity yani bağlı geçirgenlik özelliği önemlidir [100].

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda kullanılan bazı çözeltiler için fiziksel sabitler ve dağılma faktörleri Tablo 2.10'da verilmiştir [101].

Tablo 2.10: MDE kullanılan bazı çözeltiler için fiziksel sabitler ve dağılma faktörleri.

Çözücü	Dielektrik Sabiti ϵ' (20 °C)	Dipol Moment (25 °C)	Dağılma Faktörü ($\tan \delta (x10^{-4})$)	Kaynama Noktası (°C) 101.4 kPa	Kapalı-kap Sıcaklığı (°C) 1207 kPa
Aseton	20.7			56	164
Asetonitril	37.5			82	194
Etanol	24.3	1.96	2500	78	164
Hekzan	1.89			69	*
Metanol	32.6	2.87	6400	65	151
2-propanol	19.9	1.66	6700	82	145
Su	78.3	2.3	1570	100	
Hekzan-Aseton (1:1)				52	156

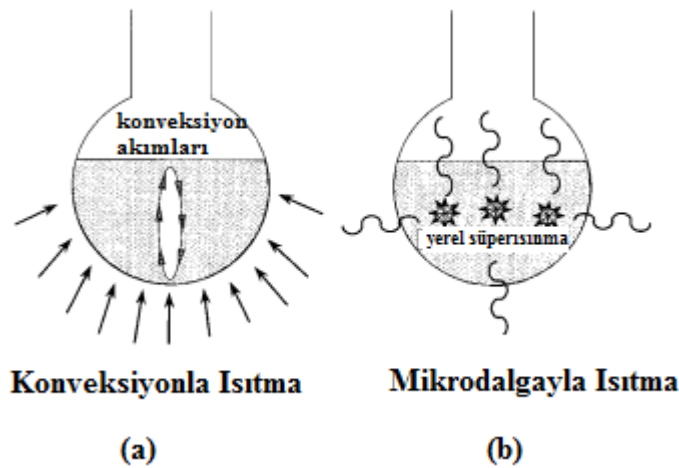
Permittivity özelliği Denklem (2.5) ile gösterilmektedir. Bir malzemenin enerjiyi depolama özelliğinin göstergesidir.

$$\epsilon = \epsilon' - j\epsilon'' \quad (2.5)$$

Denklem gerçek kısım (dielektrik sabiti, ϵ') ve sanal kısımdan (dielektrik kayıp faktörü, ϵ'') oluşmaktadır. Maddenin elektriksel alanda veya elektrik enerjisiyle polarize olma yeteneği dielektrik sabiti olarak adlandırılırken, kayıp faktörü ise mikrodalgaya gönderilen enerjinin bir miktarının madde üzerinde ısı enerjisi olarak verip, kayıp olarak adlandırılmaktadır. Elektromanyetik enerjinin belirli bir sıcaklık ve frekansta ısıya çevrilme ölçüsü olan bu faktör, malzemenin “kayıp” faktörünün ya da dielektrik

kaybının (ϵ'') dielektrik sabitine (ϵ') oranı [$\tan\delta=(\epsilon'')/(\epsilon')$] olarak belirtilmekte ve $\tan\delta$, maddenin mikrodalga enerjisinin ısı enerjisine dönüştürebilme faktörünün bir ölçüsü olarak belirtilmektedir. Mikrodalga dielektrik ısıtma prosesi, $\tan\delta$ değerine bağlıdır. Yüksek $\tan\delta=(\epsilon'')$ değeri olan maddeler mikrodalga enerjisini absorplar ve ısınır. Asetonitril gibi dipol momenti yüksek olan ama $\tan\delta$ değeri düşük olan maddeler mikrodalga enerjisini absorplayamaz. Mikrodalgada kullanacağımız çözücünün $\tan\delta$ yüksek olmalı ya da reaksiyon karışımı iyonik olmalıdır. Çözücülerin özellikleri, frekans, sıcaklık, basınç ve moleküler yapıya göre çözücülerin dielektrik özellikleri değişmektedir. Mikrodalgalar genel olarak 2450 MHz frekansta çalıştığı için frekans dielektrik özelliğini değiştiremez [102].

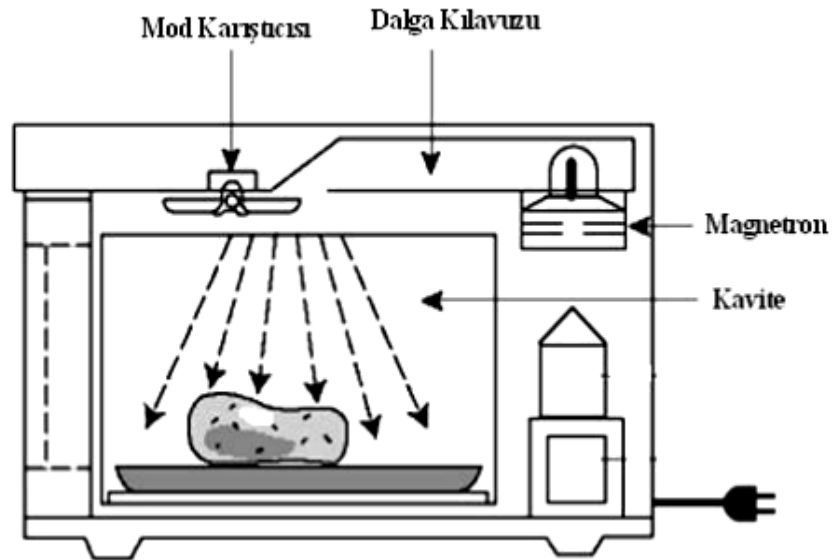
Kondüksiyonla ısıtmada, malzeme ısınırken ısı dışarıdan içeriye yavaş yavaş hareket eder. Isı, molekülden moleküle geçerek içe doğru hareket etmektedir. Malzemenin içerisinde ısıtılması oldukça zaman almaktadır. Böylece, maddenin iç ve dıştaki sıcaklığı homojen olmamaktadır. Mikrodalga ısıtma, kondüksiyonla ısıtmanın tersine moleküllere miknatıs etkisi yaratıp, elektromanyetik dalga sinyallerinin enerjilerini kullanır. Moleküller dönerken üretilen enerji ısıya dönüşmektedir. Böylece madde ısınmış olur. Mikrodalganın dalma derinliği (penetrasyon) sayesinde madde dıştan ısınmaz. Mikrodalga ısıtma prosesi ile termal ısıtma prosesi Şekil 2.20 ile gösterilmektedir [103].



Şekil 2.20: Konveksiyonla ısıtma ve mikrodalgayla ısıtma prosesleri [103].

Mikrodalga ekstraksiyon bileşkesi 4 önemli bileşenden oluşur. Magnetron olarak adlandırılan mikrodalga üreticisi mikrodalgaların üretilmesinden sorumludur. Dalga yönlendiricisi, magnetronca üretilen mikrodalga yayılımının mikrodalga haznesine yönlendirilmesini sağlar. Üçüncü bileşen olan aplikatöre numune yerleştirilir. Dolaşım sağlayıcı (sirkülasyon sağlayıcı) bileşeni ise mikrodalgaların sadece ileri doğru yayılımını düzenler. Çoklu mod sistemlerde aplikatör, rastgele mikrodalga yayılımının etkilediği kapalı hazne olarak yer alır [104]. Işın reflektörleri veya döner tablolar, numune yerleşiminden bağımsız olarak mikrodalga enerjisinin hazne içerisinde düzenli olarak dağılmasına yardımcı olur. Odaklanmış mikrodalga sistemlerinde, dolaşım sağlayıcı aplikatör olarak işlev görür ve ekstaksiyon kabı doğrudan hazne içerisine yerleştirilir. Kabın sadece birkaç santimetrelilik kısmı mikrodalgalara maruz kalır ve camın mikrodalgalara transparan olması nedeniyle kabın üst kısmı soğuk kalır. Bundan dolayı mikrodalgaanın dizaynının bir sonucu olarak etkili yoğunlaşma sağlanmış olur.

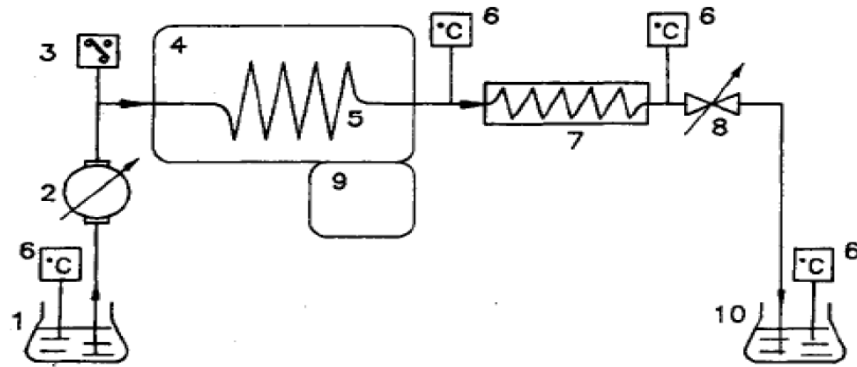
Mikrodalga ekstraksiyon işlemine tabi tutulacak yer kavite diye adlandırılır. Mikrodalgalar mod karıştırıcı tarafından dalga klavuzundan geçerek düzgün enerji dağılımı ile kaviteye gelirler. Mikrodalga enerji seviyesi her noktada eşit olmalıdır. Mikrodalga ekipmanının kısımları Şekil 2.21'de gösterilmektedir [105].



Şekil 2.21: Mikrodalga ekipmanının kısımları [105].

Mikrodalga'nın ön cam kapağı, Faraday Kafesi olarak adlandırılan yüksek elektrik iletkenliğine sahip metalden yapılmıştır. Mikrodalga'nın dışarıya geçmemesi için ve koruma sağlama açısından yapılan bu petekli Faraday Kafesi mikrodalgaların dalga boyundan küçük olmalıdır ki mikrodalga kaçağı önlenmiş olur. Faraday Kafesi buluşu 1836 tarihinde İngiliz fizikçi Michael Faraday tarafından bulunmuştur. İletken malzemeleri oluşturan atomların en dış yörüngedeki valens elektronları, atomlardan kolay bir şekilde ayrılarak hareket etme yeteneğine sahip olması Faraday kafesinin çalışma prensibini açıklamaktadır. Elektrik alanı içerisine yerleştirilen kapalı bir yüzeye sahip olan iletken bir cisimdeki elektronlar, iletkenin içerisindeki elektrik alan sıfırlanmaya kadar hareket eder ve tekrar dağılıma uğrarlar. Hareket etmeleri, elektrik alanın sıfırlanmasıyla ortadan kalkar. Kısaca, Faraday kafesinin elektrik alana karşı bir koruyucu görevi vardır. Kafesin çalışması açısından iletkenlerin iyi topraklanması gerekmektedir [106].

Çalışma prensiplerine göre mikrodalga reaktörler kesikli ve sürekli diye iki kısma ayrılır. Sürekli mikrodalga reaktörleri, Gebye ve Giguere tarafından 1986 yılında ilk üretimi yapılmıştır. Sürekli çalışan mikrodalgalar, Şekil 2.22'de gösterilmektedir [107].

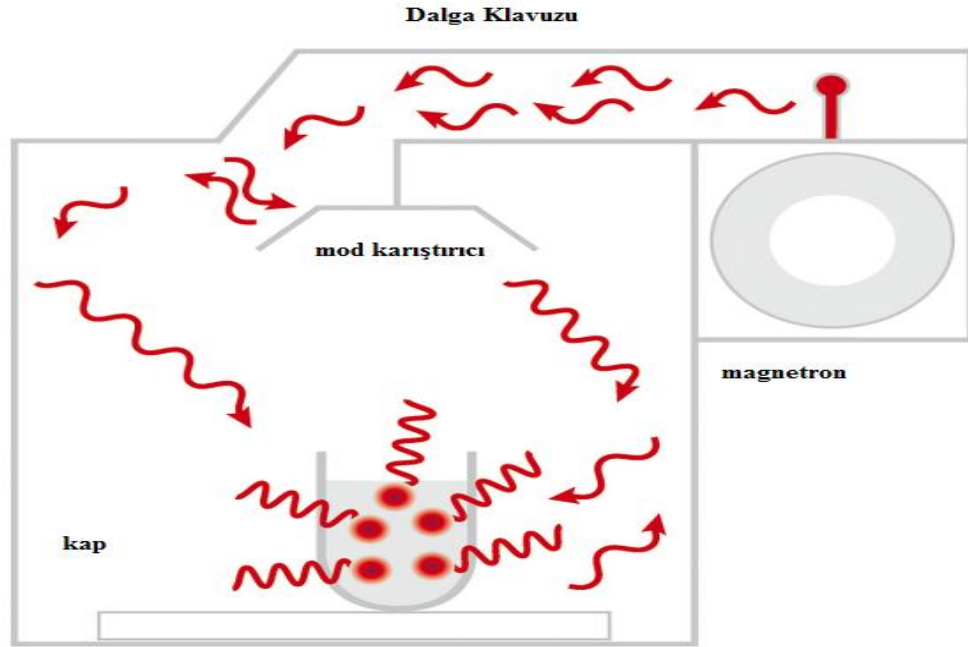


Şekil 2.22: Sürekli mikrodalga reaktörü (1:Reaksiyon karışımının olduğu reaksiyon kabı, 2: Pompa, 3:Basınç dönüştürücü, 4:Mikrodalga kavite, 5: Reaksiyon kanalı, 6:Sıcaklık, 7:Isı değiştirici, 8: Basınç kontrol valfi, 9: Kontrol paneli, 10: Ürün).

Kinetik ya da sentez çalışmalarında kesikli mikrodalga reaktörler kullanılmaktadır. Bu reaktör tipinde mikrodalga sıcaklığını, gücünün kontrolünü yapan bilgisayarlı bir kontrol sistemi bulunmaktadır. Kesikli mikrodalga reaktörleri sürekli reaktörlerden farkı

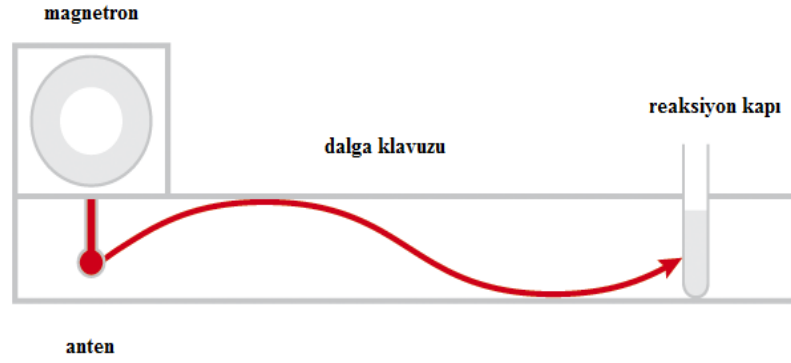
atmosferik şartlarda çalışması ve arge çalışmaları için küçük ölçekli çalışmaya imkan vermesidir. Kesikli reaktörlerde daha çok sentez çalışmalarının yanısıra çözündürme, sindirme (digestion) gibi işlemlerde yapılabilir.

Bunun yanısıra, mikrodalganın reaksiyon karışımı içine gelmesine göre çok modlu ve tek modlu reaktörler olmasına göre 2'ye ayrılır. Çok modlu reaktörlerde, mikrodalga enerjisi kavitenin her tarafına homojen yayılmıştır. Kavitenin boyunun dalga boyu ile orantılı olduğu sistemlerdir. Her fazdaki mikrodalgalar bir mod karıştırıcı yardımıyla kaviteye gönderilir. Şekil 2.23'de çok modlu mikrodalga reaktör sistemi gösterilmiştir [108].



Şekil 2.23: Çok modlu mikrodalga reaktör sistemi.

Tek modlu mikrodalgalar ise çok modlulardaki gibi bir mod karıştırıcı bulunmamaktadır. Numune, reaktörün merkezine, maksimum enerji alacak şekilde yerleştirildiği sistemlerdir. Bir sensör yardımıyla örnek üzerine mikrodalganın tepe noktasına gelmesi sağlanır. Bu reaktörlerde kavite uzunluğu mikrodalga boyunun yarısı kadardır [109]. Şekil 2.24'de tek modlu mikrodalga reaktör sistemi gösterilmektedir.



Şekil 2.24: Tek modlu mikrodalga reaktör sistemi.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon ve geleneksel ekstraksiyon teknikleriyle elde edilen ısıya karşı hassas vitamin C, tiamin, riboflavin seviyelerindeki farklılıklar belirlenmiştir. Materyaldeki vitamin C, tiamin, riboflavin pişirme sırasında geleneksel metotla pişirme suyuna geçmekte ve ısıya maruz kalarak çok kolay bir şekilde parçalanmaktadır. Elektromanyetik ışıma maruz kalan numunede ise, işlemin çok az zaman alması sebebiyle düşük vitamin kayıpları belirlenmiştir. Bunun yanında bir takım sebzelerin elektromanyetik ışıma ile çözücüsüz pişirilmesi sonucu, daha az vitamin kayıpları olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, elektromanyetik dalgalar ile ısıya maruz kalan gıdasal malzemelerin madensel madde ve minerallerinde de çok düşük seviyede etkilendiği gözlemlenmiştir. Endüstride soğan-sarımsak tozu, baharatlar, un, hazır çorbalar, antep fıstığı, ceviz, fındık ve ürünleri, süt, bebek mamaları ve aseptik ambalajlanmış hazır yemekler mikrodalga uygulamasıyla ısıl işleme tabi tutulmaktadır.

Sonuç olarak, mikrodalga destekli ekstraksiyonun diğer ekstraksiyon tekniklerine göre daha az çözücü kullanıp, çevreye daha az hasar vermesi, kısa sürede prosesin tamamlanması ve diğer tekniklere göre özütün daha fazla miktarda olması araştırmacıların mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini tercih etmelerine yol açmıştır.

2.7.5. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon

Basınç ve sıcaklığın değiştirilmesi ile kimyasal yapılarında değişiklik olmayıp, ancak yoğunluk, dielektrik sabiti gibi fizikokimyasal özellikleri gaz ile sıvı arasında değişen akışkanlara süperkritik akışkanlar denir.

Her maddenin bir kritik sıcaklığı (T_k) ve kritik basıncı (P_k) vardır. Maddenin gaz ve sıvı fazlarının bir arada bulunabildiği en yüksek sıcaklık ve basınca kritik sıcaklık ve basınç denir. Madde, kritik sıcaklık ve basıncından büyük veya eşitse, o madde süperkritik akışkan olarak tanımlanır [110]. Süperkritik akışkanlara ait özellikler Tablo 2.11'de verilmiştir.

Tablo 2.11: Süperkritik akışkanlara ait özellikler.

Çözücü	T_k (K)	P_k (MPa)	ρ_k (g/cm ³)
Metan	190.6	4.6	0.162
Etilen	282.4	5.03	0.218
Klortriflor metan	302.0	3.92	0.579
Karbondioksit	304.2	7.38	0.468
Etan	305.4	4.88	0.203
Propilen	365.0	4.62	0.233
Propan	369.8	4.24	0.217
Amonyak	405.6	11.3	0.235
Dietil eter	467.7	3.64	0.265
n-pentan	469.6	3.37	0.237
Aseton	508.1	4.70	0.278
Metanol	512.6	8.09	0.272
Benzen	562.1	4.89	0.302
Toluen	591.7	4.11	0.292
Pridin	620.0	5.63	0.312
Su	647.3	22.0	0.322

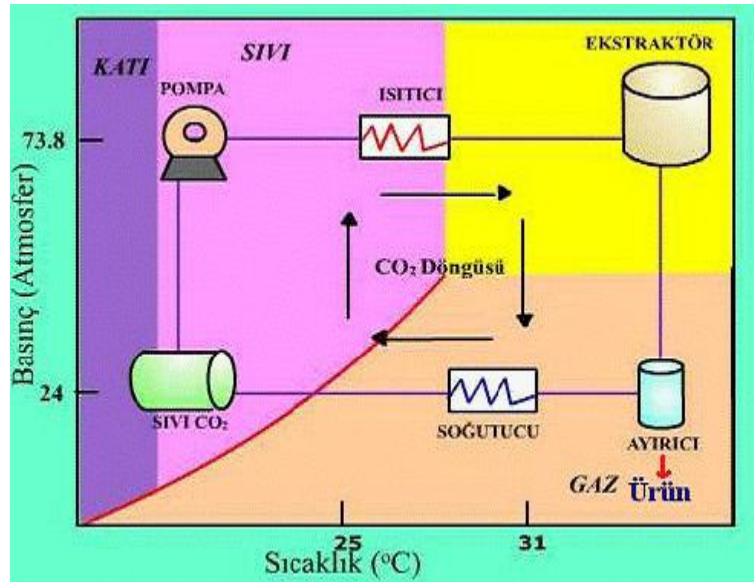
Ayrıca, Tablo 2.12'de akışkanların fizikokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması verilmiştir [111].

Tablo 2.12: Akışkanların fizikokimyasal özelliklerinin karşılaştırılması.

Özellik	Sıvı	Süperkritik Akışkan	Gaz
Yoğunluk (kg/m ³)	600-1600	200-1000	1
Viskozite (kg/m.s)	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-4}	1.0×10^{-5}
Difüzyon Katsayısı (m ² /s)	1.0×10^{-9}	1.0×10^{-7}	1.0×10^{-4}

Yüksek difüzyon katsayısı, düşük viskozite ve düşük yüzey gerilimi özellikleri sayesinde süperkritik akışkanın sıvıya göre kütle transferi daha iyidir [112]. Isıya duyarlı bileşikler için etkili ve organik çözücü tüketimi açısından da avantajlı bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde hidroliz, oksidasyon ve bozunma tepkimesi oluşmamaktadır. Yüksek basınç gerektirdiği için yüksek maliyet ve yüksek enerji gereksinimi dezavantajlarından sayılır. CO₂ tüpleri içerisinde %1-2'lik oksijen içerdiğinden, oksijene hassas olan antioksidanlar gibi maddelerle reaksiyona girip düşük miktarda bile bozunabilmeleridir.

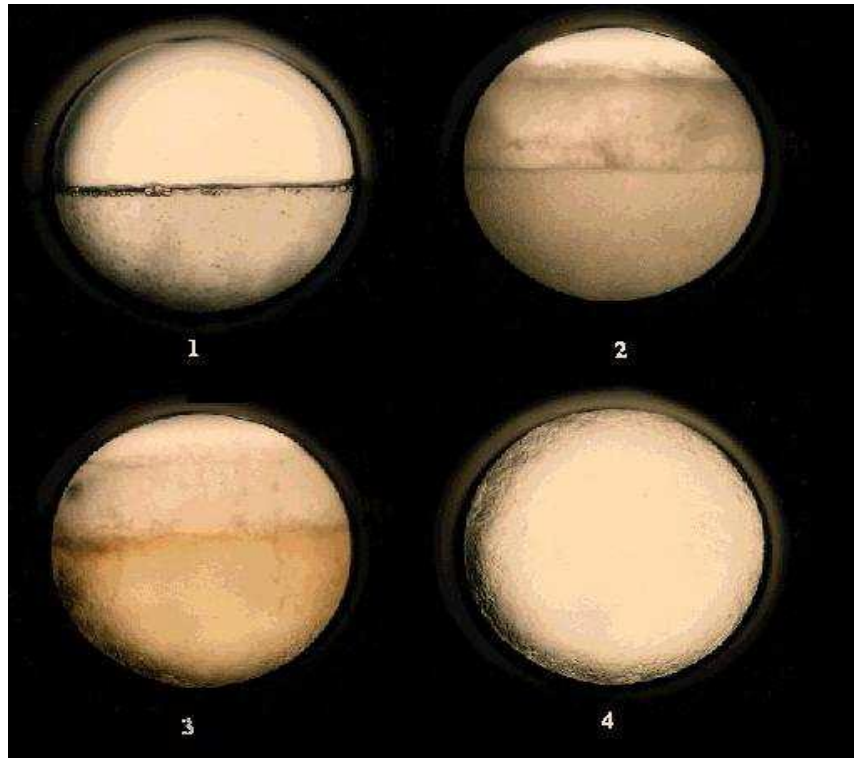
Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda süperkritik CO₂ toksisitesi düşük, maliyeti ucuz, inert oluşu sebebiyle ekstraksiyon ajanı olarak kullanılmaktadır. Uçucu organik kimyasal maddelerden çoğu çevreye zararlı olmasına rağmen CO₂ zararsızdır. Sadece U.S. Occupational Safety and Health Administration (OSHA) tarafından CO₂ tehlikeli kabul edilmiştir. Kritik sıcaklığı ($T_k=304.3$ K) ve kritik basıncı ($P_k=7.4$ MPa) düşük olması diğer çözücülere göre avantaj sağlamıştır. Ayrıca, fermentasyon işlemi ve amonyak sentezinde yan ürün olarak CO₂ üretilmektedir. Süperkritik CO₂ ait ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi Şekil 2.25'te verilmektedir.



Şekil 2.25: Süperkritik CO₂ ait ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi [113].

Şekil 2.25 görüldüğü gibi istenilen basınç değeri için sıvı CO₂ pompa yardımı ile ayarlanır. İstenilen sıcaklık değeri için akışkan ısıtıcıya gönderilir. Daha sonra, akışkan ekstraktöre gönderilir. Ekstraktördeki madde ile temas ettikten sonra, karışım ayırıcıya alınarak, CO₂ gazının geri soğutucudan geçip yeniden resirküle etmesi gerekmektedir. Özütler, ayırıcının altında toplanmaktadır. CO₂ gazı, oda sıcaklığında gaz haline geçtiğinden özütten kolayca ayrılır, böylece ekstraksiyon sonrası CO₂ gazının ayrılması için herhangi bir ayırma işlemine gerek kalmamaktadır.

Şekil 2.26, karbondioksitin süperkritik akışkan haline alırken geçirdiği faz değişimini göstermektedir. 1. kısımda, önce CO₂'in sıvı ve gaz fazları net bir şekilde ayırt edilmektedir. 2. kısımda ise arayüzey oluştuğu görülmektedir. 3. kısımda ise sıvı ve gaz yoğunlukları birbirine yakın olduğundan, sıcaklığın artmasıyla, arayüzey farkedilmemektedir. 4. kısımda ise süperkritik akışkana ulaşıldığından ara yüzey tamamen ortadan kalkmaktadır [114].



Şekil 2.26: Karbondioksitin süperkritik akışkan halini alırken geçirdiği faz değişimi [114].

Maalesef, karbondioksit polar numuneler için iyi bir çözücü değildir. Karbondioksit çözücü yeteneğine rağmen, bitki hücresiyle etkileşimi oldukça zordur, bu yüzden ekstraksiyonun geri kazanımı düşüktür çünkü bitki matriksindeki aktif gruplar için hedef analitle karbondioksitin iyi çözünme yeteneği yoktur. Bu olumsuz özellik yüzünden polar analitlerden olan fenolik maddelerin özütü için yardımcı çözücülere ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece, hem ekstraksiyon verimi hem de ekstraksiyon zamanı azaltılabilmektedir.

Süperkritik ekstraksiyon yöntemlerinde proses statik ve dinamik olmak üzere ikiye ayrılır. Dinamik (akışlı) yöntemde, örnekten sürekli olarak süperkritik akışkan geçer ve akışkan-örnek arasında anlık denge olduğu varsayılır. Statik yöntemde ise, süperkritik fazda numune örnek çözününceye kadar sıcaklık ve fazda ayarlamalar yapılır [115].

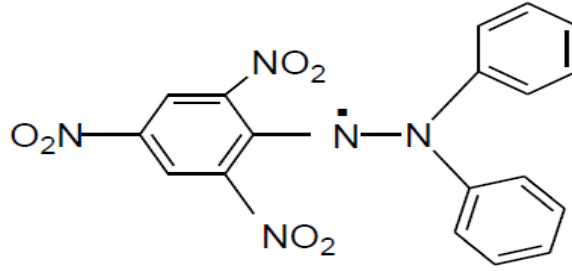
2.8.ANTİOKSIDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN BAZI YÖNTEMLER

2.8.1. Folin-Ciocalteu (FC) Metodu: Toplam Fenolik Madde Tayini Metodu

Toplam fenolik madde miktarını belirlemek için Folin-Ciocalteu (FC) metodu kullanılmaktadır. Bu yöntem, bitki özütünde bulunan hidroksil grupları hakkında bilgi verir. Reaksiyon oksidasyon tepkimeleriyle oluşmaktadır. Özütteki fenolik bileşenler, Folin-Ciocalteu reaktifi ile etkileşerek okside olup, belirli bir süre sonra tepkimenin gerçekleşmesiyle mavi renkli karışım oluşur. Oluşan karışım 745-765 nm de UV-Vis cihazının Vis bölgesinde 765 nm okunur [116]. FC metodu, sadece fenolik bileşenler için belirleyici değildir. Aynı zamanda, keton, aldehit, şeker gibi bileşenler tarafından indirgenmektedir. Bu yöntemde, sodyum karbonat ortamın pH'ını 10'a ayarlamak için kullanılmaktadır. Fenolat anyonları fenolik bileşiklerin protonlanması ile oluşurlar ve böylece Folin-Ciocalteu reaktifini indirgerler [117]. Reaksiyonda ortamın pH'ı oldukça önemlidir ve düşük pH'larda reaksiyon yavaş gerçekleşmektedir. Özütün içinde proteinlerde bulunuyorsa, yöntem proteinleri de tayin ettiği için dezavantajdır. Gallik asit referans standart olarak kullanılmaktadır.

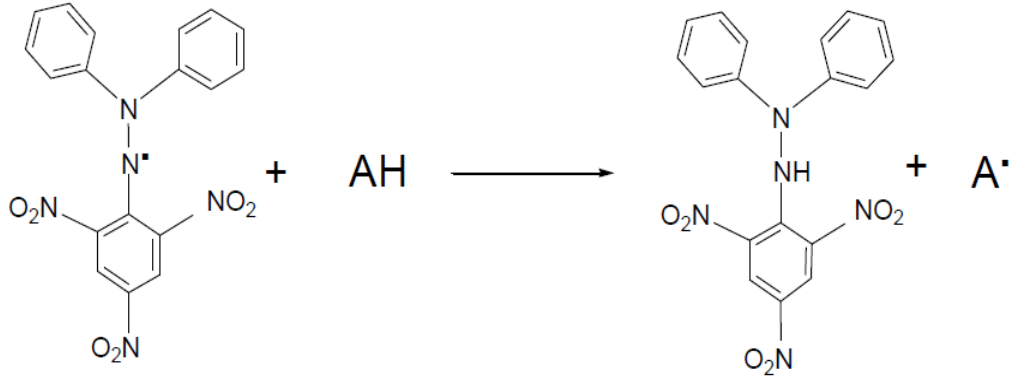
2.8.2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi

DPPH, antioksidanların radikal süpürmesini belirleyen, uygulanabilirliği son derece basit ve oldukça yaygın olarak kullanılan yöntemdir. DPPH radikalının yapısı Şekil 2.27'de gösterilmektedir.



Şekil 2.27: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalının yapısı.

DPPH radikalının antioksidanla tepkime mekanizması ise Şekil 2.28'deki gibidir.



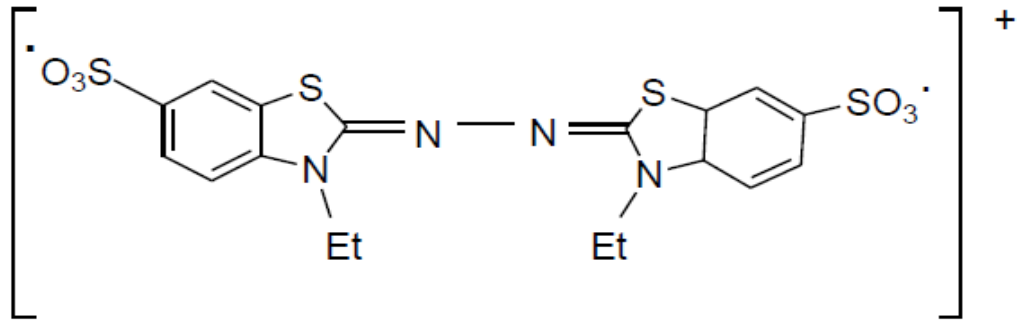
Şekil 2.28: Antioksidan DPPH radikali tepkimesi.

DPPH radikali, mor renklidir. Bu radikal şekilde de gözüktüğü üzere antioksidandan bir proton (H^+) kopararak indirgenir ve α, α -difenil- β -pikrilhidrazil molekülüne dönüşür. Özütteki antioksidan miktarı fazla olduğunda, inkübasyon işlemi sonucunda mor renkli karışım açık sarı renge döner. Karışımın absorbansı bu yöntemde 515 nm'de okunur

[118]. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) referans standardı olarak kullanılmaktadır.

2.8.3. ABTS Yöntemi / TEAK (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi)

DPPH yöntemi gibi ABTS yöntemi de ekstraktların antioksidan aktivitesini ölçmede kullanılır. Bu yöntemde de Trolox referans standardı olarak kullanılmaktadır. Radikal , olarak, (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kationunun, antioksidandan bir proton (H^+) kopararak indirgenmesine dayanır. Yeşil renkte olan ABTS radikali, ekstrakta ilave edilip, 10 dakika inkübasyon sonunda çözeltide renk açılması meydana gelir. Bu yöntemde karışımın absorbansı 734 nm'de okunur [119]. Şekil 2.29'da ABTS radikali gösterilmiştir.

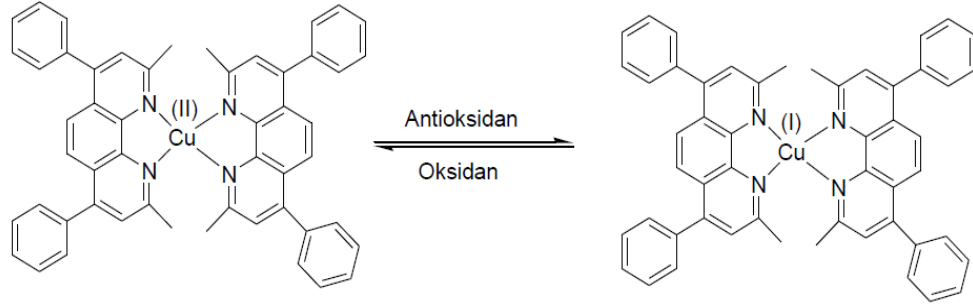


Şekil 2.29: ABTS radikali.

2.8.4. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgen Antioksidan Kapasite) Kapasitesi

Apak ve diğ. [120] geliştirdiği CUPRAC metodu da diğer ABTS ve DPPH metodu gibi örneklerin antioksidan aktivitesini ölçmede kullanılmaktadır. 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin) Cu (II) ile oluşturduğu bakır (II)- neocuproin kompleksi (Cu(II)-Nc), bakır(I)-neocuproin [Cu(I)-Nc]'e indirgenmektedir ve oluşan tepkimenin absorbansı 450 nm'de okunmaktadır. Neocuproin çözeltisi etanolde hazırlanmaktadır. Cu(II) klorür sulu çözeltisine sırasıyla neocuproin, daha sonra da amonyum asetat sulu çözeltisi eklendikten sonra belli bir hacimde ekstrakt ve su ilave edilip, karışım 30 dakika inkübe edildikten sonra 450 nm şahit çözeltiliye karşı absorbansı okunmaktadır.

Trolox referans çözeltisine göre okunmaktadır. Şekil 2.30'da Cu(II)'nin antioksidan madde ile Cu(I)'e indirgenmesi gösterilmektedir.



Şekil 2.30: Cu (II)'nin antioksidan madde ile Cu(I)'e indirgenmesi.

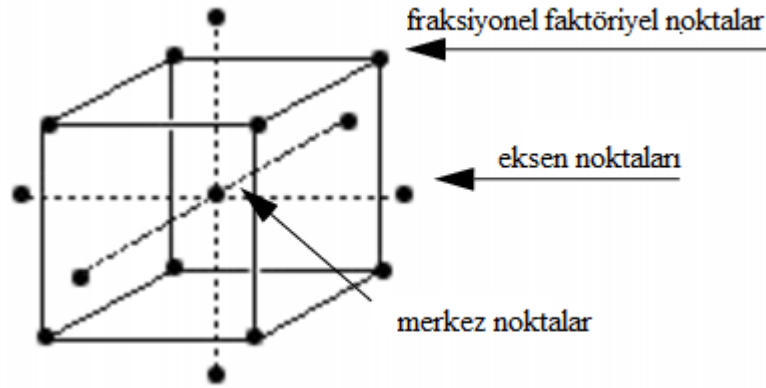
2.9. YANIT YÜZEY METODU (YYM)

Deneyisel çalışmalarda sürdürülen proses parametrelerinin düzgün şekilde belirlenip, doğru deney sonuçlarına ulaşılması için deney tasarımına ihtiyaç duyulmaktadır. Ekstraksiyon işleminde, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, malzeme boyutu, katı/sıvı oranı, pH başlıca proses parametrelerindendir. Ekstrakt verimi ise proses çıktısıdır. Bu proses parametreleri bağımsız parametre olarak bilinmekte ve bağımlı değişken olarak adlandırılan proses çıktısını (yanıt) etkilemektedir. Literatürde, klasik metodolojisi (One-factor-at-a-time-(OFAT)) ve yanıt yüzey metodolojisi (YYM) kullanılarak yapılan deney tasarımlarına rastlanılmaktadır. Klasik metodolojide, her seferinde bir bağımsız parametre değiştirilip, diğer parametreler sabit tutulur. Bu metodoloji, değiştirilen parametrenin bağımlı değişken üzerine etkisini inceleyerek optimizasyon yapmaktadır. Bütün parametrelerin yanıt üzerine etkilerinin eş zamanlı olarak incelenememesi ve deney sayısının fazla olması gibi dezavantajlar, OFAT yöntemini pahalı, zaman alıcı ve yanıltıcı yapmaktadır. İstatistiksel deney tasarımı yukarıda söz edilen klasik deney tasarımının yetersizliğini gidermiştir. Yanıt yüzey metodolojisi istatistiksel deney tasarımıdır. YYM, bağımlı değişkenler ve yanıtlar arasındaki etkileşimleri varyans analizi (ANOVA) ve regresyon analizi kullanarak belirler. Böylece, bağımlı değişkenlerin ve bağımsız değişkenlerin optimizasyonunu matematiksel ve istatistiksel teknikler kullanarak sağlar [121]. YYM ile birlikte

deneylerin tasarlamasına katkıda bulunan farklı deneysel tasarım modelleri vardır. Tam faktöriyel, kesirli faktöriyel, Box-Behnken ve merkezi kompozit tasarımı, D-optimal tasarım en çok bilinen tasarım modelleri arasındadır.

2.9.1. Yüzey Merkezli Merkezi Kompozit Tasarımı

Bu modellerden, literatürde en çok kullanılan merkezi kompozit deney tasarımıdır [122]. Merkezi kompozit tasarım, faktöriyel tasarım ve çok-boyutlu tek değişkenli tasarımın birleşmesiyle oluşmuştur. Şekil 2.31'de üç değişken ve üç seviyeli merkezi kompozit tasarımın kübik şekli gösterilmektedir.



Şekil 2.31: Üç değişkenli üç seviyeli merkezi kompozit tasarımın kübik şekli.

Merkezi kompozit tasarım fraksiyonel faktöriyel üç bölümden oluşur:

- i) köşe noktaları, fraksiyonel faktöriyel noktalarını içerir.
- ii) merkez noktaları
- iii) yıldız noktalar (ya da eksen noktalar) ve α ise merkez noktalarla eksen noktaları arasındaki uzaklıktır. Genelde α değeri 1, 1.68 veya 2 alınabilir.

Merkezi kompozit tasarımında, faktöriyel tasarım seçilmeli, yıldız noktalar için α değeri belirlenmeli ve merkez noktaların sayısı kararlaştırılmalıdır. Deney tasarımında değişkenlerin değerleri minimum, maksimum ve orta seviyelerden oluşur. Örnek olarak

sıcaklığın min değeri 40, maksimum değeri 80 ise orta seviye ikisinin toplamının yarısıdır. Örneğin 3 faktöriyel ve 3 seviyeli merkezi kompozit deney tasarımı ($\alpha=1$ seçilecek olursa) uygulandığında yapılacak deney sayısı fraksiyonel tasarım ($2^3=8$) sayısı, yıldız noktaların ilavesi ($2 \times 3=6$) ve orta noktaların deney tekrar sayısının eklenmesinden oluşur.

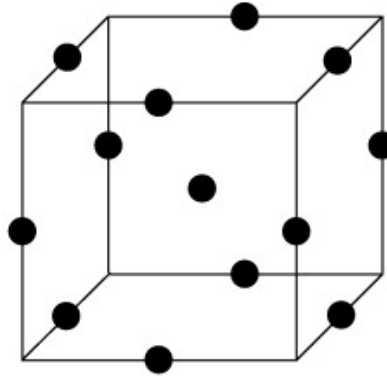
YYM çalışmalarında 2. dereceden en çok kullanılan tasarımlar kullanılmaktadır. YYM ile sunulan ikinci dereceden modelin Denklem (2.6) gibi gösterilmektedir.

$$Y=b_0+\sum_{i=1}^3 b_i X_i+\sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2+\sum_{ij} b_{ij} X_i X_j+e \quad (2.6)$$

Denklemde Y yanıt, e hata, b_0 sabit bir katsayı olan denklemin kesim noktası, b_i lineer, b_{ii} ikinci derece, b_{ij} ikili etkileşim katsayılarıdır [123].

2.9.2. Box-Behnken Tasarımı

Box-Behnken tasarımı (1960) her bir faktör için (-1, 0, +1) üç seviyeyi kullanmaktadır. Faktörlerden ikisi 0 seviyesinde sabit tutulmuşken, diğer kalan faktörler +1 ve -1 seviyesinde bulunurlar. Bu proses farklı gruplar için tekrarlanır [124].



Şekil 2.32: Box-Behnken tasarımının kübik şekli.

Box-Behnken tasarımı için geliştirilen deney sayısı Denklem (2.7) ile ifade edilmiştir.

$$N=2k(k-1)+C_0 \quad (2.7)$$

Burada k faktör sayısı iken, C_0 ise merkez noktaların sayısı olarak ifade edilmektedir.

2.9.3. D-optimal Deneysel Tasarım

D-optimal deneysel tasarım, deneyleri tasarlamada, varyans analizinde ve deneysel modellemede kullanılan yanıt yüzey temelli metodolojidir. Bu metot, diğer yanıt yüzey metotlarına göre daha avantajlıdır. Bu deney tasarımı hem kategorik faktörleri (sayısal olmayan) içerir hem de daha az deney sayısı belirler [125]. D-optimal tasarım, bilgisayar algoritmasıyla sağlanan tasarımlardan biridir. Bu tip tasarımlar, özellikle klasik tasarımların uygulanamadığı durumlarda yararlıdır. Faktöriyel ve fraksiyonel faktöriyel gibi standart klasik tasarımlarından farklı olarak, D-optimal tasarım matrisleri genellikle dik değildir.

D-optimum tasarımlar, seçilmiş en iyi kriter ve uygun modele dayalı optimizasyonlardır. Oluşturulan D-optimal tasarımlarda kullanılan en iyi kriterlerden biri maksimize $|X'X|$, diğeri de belirleyici bilgi matrisidir $X'X$.

Bu en iyi kriter önceden belirlenmiş model için parametre tahminlerinin genelleştirilmiş varyansını azaltmaya neden olur. Sonuç olarak, verilen bir D-optimum tasarımda optimum modele bağlıdır. Yani, belirli kombinasyonları üreten bilgisayardan önce, araştırmacı tasarım için bir model belirler. Bir deney ve belirli bir model için verilen toplam deney sayısı, göz önüne alındığında, bilgisayar algoritması bütün olası tasarım aday kümelerinden optimal kümeyi seçer. Bu aday küme, deneyde kullanmak üzere istenilen çeşitli faktörlerin ve seviyelerinin tüm olası kombinasyonlarını içerir [126]. D-optimal tasarım prosedürleri seviye belirlemeyi, model uyumunun seçimini, ve seçilen tasarım noktalarını kapsar. Aday noktalar kümesinden seçilen tasarım noktaları seçilmiş modele bağlıdır [127].

Deneysel tasarım için kullanılan tasarımların çoğunda ikinci dereceden model kullanılır. Çünkü ikinci dereceden denklem, hem bütün faktörlerin etkileşimlerinin yanıt üzerine etkisini inceler, hem de yanıtın optimal değerlerinin olduğu bölgeyi gösterir.

Genelde, istenilen yanıtın (Y) matris formu Denklem (2.8) gibi ifade edilir:

$$Y=X\alpha+\epsilon \quad (2.8)$$

Burada X , veri noktalarında değerlendirilen model terimlerin matrisi, ε ise hata faktörüdür. En küçük kareler metodu kullanılarak, regresyon katsayı vektörü α 'nın tarafsız tahmin edicisi (unbiased estimator) Denklem (2.9) gibi ifade edilir [128].

$$\alpha = (X^T X)^{-1} X^T Y \quad (2.9)$$

X^T ise X matrisinin transpozesidir.

2.10: REGRESYON ANALİZİ, VARYANS ANALİZİ

Bilimsel olarak yapılan deneylerin güvenilirliği için bir takım istatistiksel belirteçler vardır. Bu istatistiksel belirteçler standart sapma, varyans, korelasyon katsayısı, regresyon analizi, varyans analizidir.

Standart sapma (σ), deneysel hatayı tanımlayan istatistiksel bir büyüklüktür ve aşağıdaki Denklem (2.10) gibi hesaplanır. Denklemdaki (n) hata sayısıdır.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2 + \varepsilon_3^2}{n-1}} \quad (2.10)$$

Varyans ise standart sapmanın karesidir. (σ^2)

İki değişken arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığını gösteren katsayıya korelasyon katsayısı denir. Özetle, değişkenlerde meydana gelen değişikliklerin birbirini etkileyip etkilemediklerini gösterir. Regresyon analizi ise, iki ya da daha fazla değişkenlerin arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığının ve doğrusal ilişkinin bir doğrusal denklemle nasıl ifade edildiğinin göstergesidir.

İstatistiksel olarak kullanılan bir diğer ifade ise "p" değeri yani olasılık (probability) terimidir. Deneyler %95 güven aralığında yapılır yani, %5 hatayı kabul ederek karşılaştırma yapıldığında, $p < 0.05$ faktörlerin istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. İstatistiksel olarak bazı belirteçler Tablo 2.13'de gösterilmektedir [129].

Tablo 2.13: İstatistiksel olarak bazı belirteçler.

İstatistiksel İndikatörler	Matematiksel Formülü
Determinasyon Katsayısı	$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_{m,i} - y_{d,i})}{\sum_{i=1}^N (y_{m,i} - y_d)}$
Ortalama Mutlak Hata	$OMH = N^{-1} \sum_{i=1}^N y_{m,i} - y_{d,i} $
Ortalama Kare Hata	$OKH = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_{m,i} - y_{d,i})^2$
Ortalama Mutlak Yüzde Hata	$OMYH = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left \frac{y_d - y_m}{y_d} \right * 100$

3.MALZEME VE YÖNTEM

Greyfurt meyve kabuğu ve yapraklarına yeni ayırma yöntemlerden UDE, MDE ve SAE kullanılarak, yanıt yüzey metodu (YYM) ile beraber farklı model teknikleri uygulanıp elde edilen özütlerin toplam fenolik miktarları, antioksidan tayin yöntemleri UV-Vis cihazıyla analiz edilmiştir. Greyfurt kabuk ve yaprağındaki optimum naringin miktarı ise HPLC cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Ayrıca, geleneksel yöntemlerden Soxhlet ekstraktörü de kullanılarak, yeni ve geleneksel ekstraksiyon yöntemleri de kıyaslanmıştır. Bununla beraber, enerji hesaplamasına gidilip, her bir yöntem için ne kadar kW-h elektrik enerjisi harcandığı da tespit edilmiştir.

Bu bölümde, deneyde kullanılan kimyasallar, deney düzeneğinin kurulumu ve deneyde kullanılan cihazların özellikleri ve çalışma koşulları hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Farklı cins greyfurt yaprakları (Ray Rubby, Star Rubby, March Seedless) (*Citrus paradisi* Macf.) 2013 yılının Ekim ayında hasat zamanı Türkiye'nin Antalya ilinde olan Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (BATEM) tarafından temin edilmiştir. Yapraklar, vakum altında 30 °C vakum etüvünde (VOS-30A Model) kurutulmuştur. Ekstraksiyonda, bitki matrisi ile çözücü arasındaki etkileşimin artırılması özüt verimi açısından önemli olduğundan, bitki materyali mutfak robotundan (Moulinex masterchef 750 duotronic) geçirilerek, tanecik boyutu küçültülüp, yüzey alanı artırıldı. Daha sonra, materyal 2000-1000 mm aralığındaki elekten (Armfield) geçirilerek malzemenin boyut analizi yapıldı.

Aynı şekilde greyfurt meyveleri de (*Citrus paradisi* Macf.) 2013 yılı ekim ayında BATEM tarafından temin edilmiştir. Ekstraksiyon işlemine kadar greyfurt meyveleri derin dondurucuda saklanmıştır. Ekstraksiyon işleminden önce, yapraklarla aynı şekilde meyve kabukları da mutfak robotundan (Moulinex masterchef 750 duotronic) geçirilerek, tanecik boyutu küçültülüp, yaş olarak analiz edilmiştir.

3.2. KİMYASALLAR VE REAKTİFLER

Etanol (>%99.5), metanol (>%99.8), potasyum persülfat, sodyum nitrit, alüminyum klorür Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)(ABTS), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2- karboksilik asit (TROLOX), 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin), Folin-Ciocalteu reaktifi, sodyum karbonat, gallik asit, naringin Sigma Aldrich (Steinheim, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Millipore, Milli-Q saf su sistemleri kullanılarak, bidistile su ve ultra saf su (18 Ω ohm) temin edilmiştir.

3.3. DENEY DÜZENİNDE KULLANILAN EKİPMANLAR VE CİHAZLAR

- Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu Cihazı (Applied Separations SFE-2)
- Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Cihazı (Milestone, Neos-GR)
- Ultrases Destekli Ekstraksiyon Cihazı (Vibra Cell, Model VCX 750, CT, USA, 20 kHz ve 125 Watt)
- Elektromag Mantolu Ceketli Balon Isıtıcı
- UV-Vis Spektrofotometresi (UV-Vis Lambda 35)
- HPLC (Agilent 1200, USA)
- Santrifüj (Nüve, CN180)
- Hassas terazi (Mettler Toledo, MS204S)
- Soxhlet Ektraktör Aparatı
- Enerji Ölçer Priz Wattmetre

3.4. EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİ

3.4.1. Soxhlet Ekstraksiyon Yöntemi

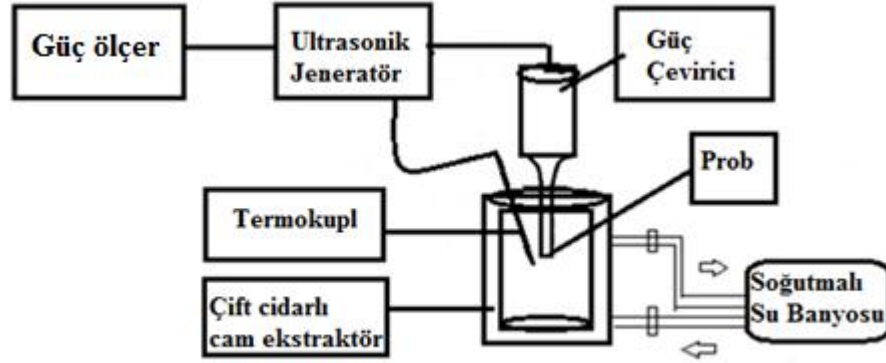
Greyfurt yapraklarından 10 g tartıldıktan sonra Soxhlet kartuşuna konuldu. Daha sonra, kartuş Soxhlet ekstraktörü içerisine yerleştirildi. Kaynama taşı bulunan balonun içine 300 mL çözücü ilave edildikten sonra kullanılan çözücülerin kaynama noktası sıcaklığından biraz daha düşük sıcaklıkta mantolu ceketli ısıtıcının sıcaklığı ayarlandı. Soxhlet ekstraksiyon işlemi 24 saat boyunca devam ettirilip, çözücünün akış borusundan geçirilip, 3 kez sifon işlemi yapması sağlandı. Ekstraksiyon işlemi

bitiminde balondaki çözücünün oda sıcaklığında soğutulması sağlandı. Balondaki karışımdan analiz için belirli mL alınıp, eppendorf tüplere konulup, numuneler -20°C derin dondurucuda saklandı. Aynı prosedür greyfurt kabuklarına da uygulanıp, Soxhlet ekstraksiyonu yönteminde ekstrakt verimini etkileyen en uygun çözücü belirlendi. Sonuçlar, gram kuru yaprak başına analiz için kullanılacak standart cinsinden ve naringin miktarları şeklinde ifade edilmiştir ($\text{mg-NMg}^{-1}\text{-KY}$).

3.4.2. Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

3.4.2.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

UDE yönteminde, prob çapları 13, 19, 25 mm olan ultrasonik homojenizatör (Vibra Cell, Model VCX 750, CT, USA, 20 kHz ve 125 Watt) kullanıldı. Ultrases-destekli ekstraksiyonda, sıcaklığı istenilen derecede tutmak için ceketli ekstraktör (300 mL) kullanıldı. İstenilen ekstraksiyon sıcaklık değerleri için ceketli ekstraktör 13 Ldk^{-1} pompa kapasitesine sahip olan sirkülasyonlu soğutmalı su banyosuna (JSR Model) bağlandı. Su banyosuna monoetilen glikol-su karışımları (2:1 v/v) olarak konularak, istenilen sıcaklık değerlerine ayarlandı. Ön denemelerle, ultrasesin puls aralığı 5/10 (5 s aç/ 5 s kapa) olarak alınıp, prob dalma derinliği ise ekstraktör derinliğinin tam ortası olarak belirlendi. Böylece, ultrases destekli ekstraksiyonda probun dalma derinliği ve puls oranı sabit tutuldu. Tartımları alınan örnekler ekstraktöre konularak, hazırlanan 250 mL farklı etanol konsantrasyonlarına (% 0-40 (v/v)) sahip çözeltiler ekstraktöre ilave edildi. Ultrases 20 kHz de çalıştırıldı. Ayrıca ultrases gücü (kWL^{-1}), kalorimetrik deneylerle tespit edildi. Deneylerde, üç farklı greyfurt yaprağı (Ray Rubby, Star Rubby, March Seedless), farklı etanol konsantrasyonlarına (% 0-40 (v/v)) sahip çözeltiler, farklı katı/sıvı oranı ($8\text{-}20\text{ g L}^{-1}$), ekstraksiyon zamanı (30-75 dk.), ekstraksiyon sıcaklık aralığı ($10\text{-}40^{\circ}\text{C}$) ve ultrasesin farklı kalorimetrik enerji yoğunluğu ($0.037\text{-}0.103\text{ kW L}^{-1}$) değiştirilerek, sabit pulsta (5 s açık/ 5 s kapalı) ve sabit dalma derinliğinde (5 cm ekstraktörün iç derinliği) ve 20 kHz frekansta üç farklı prob ucuyla çalıştırıldı. Karışım, santrifüje alınıp, 4000 rpm ve 20 dakika boyunca çalıştırıldı. Santrifüjden sonra, karışım $0.45\text{ }\mu\text{m}$ filtreden geçirilip, -20°C 'de derin dondurucuda analiz için saklandı. Ultrases-destekli ekstraksiyon yöntemine ait deney düzeneği Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1: Ultrases destekli ekstraksiyon deney düzeneği.

Ultrasonik sistemlerde, kayıplar yüzünden jeneratörden güç çeviriciye toplam nominal çıkış gücünün tamamı ortama yansıtılmaz [130]. Proseste ultrasonik yoğunluğunun etkisini belirlemek için ortama transfer edilen gerçek ultrasonik enerjiyi ölçmek gerekmektedir. Gerçek ultrasonik yoğunluğunu belirlemek için kalorimetrik, dozimetrik gibi farklı metotlar kullanılmaktadır. Kalorimetrik metot basit, ekonomik ve oldukça güvenilirdir [131]. Kalorimetrik deneylerde farklı genlik seviyelerinde (% 30-70), üç farklı prob ucunda ve % 50 pulsta (5s açık/5s kapalı) çalışıldı. Bu amaçla, 20 °C'de 250 mL distile su termal olarak izole edilmiş çift cidarlı 300 mL ekstraktöre boşaltılmıştır. Suyun sıcaklığını ölçmek için çözeltiye termokupl yerleştirilmiştir. Çözeltiye aktarılan ultrasonik güç Denklem (3.1) gibi hesaplanmıştır.

$$W_{US} = (C_s \cdot M_s + C_e \cdot M_e) \cdot \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad (3.1)$$

Denklemde C_s , suyun ısı kapasitesi ($4.2 \text{ J g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$), M_s ise suyun ağırlığı (250 g), C_e ise ekstraktör ısı kapasitesi ($\text{J } ^\circ\text{C}^{-1}$), M_e ise ekstraktörün ağırlığı ve (dT/dt) ise birim saniyedeki sıcaklık artışıdır ($^\circ\text{C s}^{-1}$).

Kalorimetrik verim hesabında global verimin bulunabilmesi için de şehir şebekesinden harcanan elektrik gücü, güç ölçer kullanılarak ölçüldü. Örnek bir hesaplama aşağıdaki Denklem (3.2) gibi verilmiştir.

$$\sum M \cdot C_p = (M_s C_{p,s} + M_e C_{p,e}) \quad (3.2)$$

$$M_s = 250 \text{ g} , C_{p,s} = 4.18 \text{ J/g } ^\circ\text{C}$$

$$M_e = 422 \text{ gr } C_{p,e} = 0.78 \text{ J/g } ^\circ\text{C}$$

Örnek hesaplamada,

$$\sum M.C_p = (M_s C_{p,s} + M_e C_{p,e}) = 250 \cdot 4.18 + 422 \cdot 0.78 = 942,6 \text{ J / } ^\circ\text{C} = 1374.16$$

$$\frac{dT}{dt} = 0.008667 \text{ alınıp, denklemde yerine yerleştirildiğinde;}$$

$$\sum M.C_p \frac{dT}{dt} = 11.90939 \text{ W} = 0.047638 \text{ kW/dm}^3$$

Şehir şebekesinden harcanan elektrik gücünde aktif bileşen hesaplamalarda Denklem (3.3) kullanılmış, reaktif bileşen ihmal edilmiştir.

$$W = V.A.\cos\phi \quad (3.3)$$

Yapraklara uygulanan ekstraksiyon prosesinde birçok metotlar arasından, D-optimal metotun seçilmesindeki amaç, YYM ile beraber uygulandığında diğer metotlara göre deney sayısını azalttığındandır. Bununla beraber, birçok faktörü içeren prostedeki gerekli olan deney sayısı pahalıdır ve hepsinin test edilmesi uygun değildir [132]. Buna ek olarak, belirlenen model katsayılarının tahminine ilgili varyansı minimize ederek uygun planda deneysel noktaları seçer. Özetlersek, D-optimal tasarım kaynakları ve zamanın miktarlarını azaltması bakımından genel-optimal tasarımlara göre daha popülerdir. Yanıt yüzey temelli D-optimal tasarımı, ekstraksiyon prosesinin çalışma koşullarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Üstelik, hem nümerik hem de kategorik faktörleri içeren genel-optimal-tasarım seçeneğine alternatif olarak D-optimal tasarımı kullanılmıştır. Tablo 3.1'de, çözücü konsantrasyonu, ekstraksiyon zamanı, ekstraksiyon sıcaklığı, katı/sıvı oranı, ultrases güç yoğunluğu, beş seviyeli, beş nümerik faktör olarak ele alınmıştır, diğer iki kategorik faktör ise üç çeşit greyfurt yaprağı ve üç farklı prob ucudur.

Tablo 3.1: Greyfurt yapraklarına D-optimal deney tasarımında kullanılan parametreler ve seviyeleri.

Parametreler	Kodlar	Nümerik Kategorik	Seviyeler				
			1	2	3	4	5
			-2 1	-1 2	0 3	+1	+2
Et-H ₂ O (% v/v)	A		0	13.33	20	26.66	40
Zaman (dk.)	B		30	45	52	60	75
Sıcaklık (°C)	C		10	20	25	30	40
Katı/Sıvı Oranı (g L ⁻¹)	D		8	12	14	16	20
US Güç Yoğunluğu (kW L ⁻¹)	E		0.037	0.07	0.103		
Yaprak Çeşidi	F		Ray Ruby	Star Ruby	Marsch Seedless		
Prob tipleri	G		İnce	Orta	Kalın		

Bağımsız faktörlerin bütün etkilerini içeren ikinci dereceden polinom model tercih edildi. Bağımlı değişkenin (cevap) ikinci-dereceden polinom regresyon modeli aşağıdaki Denklem (3.4) gibidir:

$$Y=b_0+\sum_{i=1}^7b_iX_i+\sum_{i=1}^7b_{ii}X_i^2+\sum_{ij}b_{ij}X_iX_j \quad (3.4)$$

Denklemde, b_0 sabittir, b_i , b_{ii} , b_{ij} ise lineer, ikinci dereceden, faktörlerin ikili etkileşim terimlerini sırasıyla ifade etmektedir. Bu çalışmada, ikinci-derece polinom model tüm faktörlerin bağımlı değişkene etkisini incelemek hem de üç boyutlu (3-D) grafiklerle optimal değere yakın bağımlı değişkenlerin olduğu bölgeyi belirlemek için kullanıldı. Çalışmada, Design Expert (Trial version 9.0, Stat-Ease, USA) istatistiksel paket programı deneyleri planlamak için ve varyans analizinde (ANOVA) deneysel verileri analiz etmek için kullanıldı. D-optimal tasarım yapılarak, bir nokta değişim algoritması tercih edilmiştir. En küçük belirlenmiş değerle optimal tasarımı seçmek için maksimum çevrim sayısı programda 30 olarak girilmiştir. Aday noktaları 32 köşe , kenarları 80 merkez , 10 kısıtlama düzlem merkezler, 32 eksenel kontrol noktaları, 90 iç noktalar ve kategorik faktörün her seviye için 1 toplam merkezden oluşur. Deneysel hatayı tahmin etmek için ise, bir deney iki kez tekrar edilip programa girilmiştir.

Nümerik ve kategorik faktörlerden oluşan deneysel tasarım matrisinin oluşturduğu 51 deneye ait deney planı Tablo 3.2'de verilmiştir. Değişkenlerin en uygun gruplarını kurmak için adım adım (stepwise) regresyon uygulandı. Regresyon analizi boyunca verilen alfa seviyeleri ($\alpha=0.1$) içinde değişkenler test edilip, değerlendirildi. Bununla beraber geri adım (backward) ve ileri adım (forward) teknikleri de kullanıldı. Standardize edilmiş en yüksek değerli ($p<0.05$) bağımsız parametreler belirlenip, tespit edildi.

Tablo 3.2: Greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yönteminin D-optimal deney tasarımı.

Deney No	EtOH% (v/v)	Zaman (dk)	Sıcaklık (°C)	Katı/Sıvı (g L ⁻¹)	US Güç Yoğunluğu (kW L ⁻¹)	Yaprak Cinsi	Prob Çeşidi*
1	0	30	10	8	0.103	Marsh Seedless	K
2	40	30	40	8	0.103	Ray Ruby	K
3	40	30	40	20	0.103	Star Ruby	İ
4	0	75	10	8	0.103	Marsh Seedless	İ
5	40	75	40	20	0.103	Ray Ruby	O
6	0	30	40	20	0.103	Marsh Seedless	K
7	0	75	40	8	0.037	Ray Ruby	O
8	40	30	10	20	0.037	Star Ruby	İ
9	40	30	10	20	0.037	Ray Ruby	O
10	40	75	10	8	0.103	Ray Ruby	İ
11	40	30	10	20	0.103	Ray Ruby	K
12	40	75	40	8	0.103	Star Ruby	İ
13	0	75	10	20	0.103	Marsh Seedless	K
14	0	75	10	8	0.103	Star Ruby	O
15	0	52	40	20	0.103	Ray Ruby	İ
16	40	75	40	8	0.07	Star Ruby	O
17	20	30	10	20	0.037	Marsh Seedless	K
18	0	30	40	20	0.037	Marsh Seedless	İ
19	0	75	40	8	0.037	Star Ruby	K
20	40	75	40	20	0.037	Marsh Seedless	İ
21	40	30	40	20	0.103	Marsh Seedless	O
22	40	30	40	14	0.037	Ray Ruby	İ
23	0	30	10	8	0.037	Ray Ruby	İ
24	40	30	10	8	0.103	Ray Ruby	O
25	40	30	40	8	0.103	Marsh Seedless	İ
26	40	75	25	8	0.037	Marsh Seedless	O

Tablo 3.2 (devam):

27	40	75	40	20	0.037	Ray Ruby	K
28	40	60	10	20	0.07	Marsh Seedless	O
29	0	45	20	20	0.037	Star Ruby	O
30	26.67	60	10	8	0.037	Ray Ruby	K
31	20	75	40	20	0.037	Marsh Seedless	O
32	40	30	40	8	0.037	Star Ruby	K
33	0	30	40	8	0.037	Marsh Seedless	O
34	0	75	10	16	0.07	Ray Ruby	K
35	0	30	10	20	0.103	Ray Ruby	O
36	13.33	30	30	8	0.103	Star Ruby	İ
37	0	30	10	20	0.037	Star Ruby	K
38	0	75	30	20	0.07	Star Ruby	İ
39	0	45	10	16	0.103	Star Ruby	İ
40	0	30	25	8	0.037	Ray Ruby	K
41	20	75	10	20	0.037	Ray Ruby	İ
42	13.33	30	10	12	0.037	Star Ruby	O
43	40	75	10	8	0.103	Marsh Seedless	K
44	0	75	30	16	0.103	Marsh Seedless	O
45	26.67	60	40	20	0.103	Star Ruby	K
46	40	75	10	14	0.037	Star Ruby	K
47	40	30	10	20	0.103	Star Ruby	O
48	0	75	20	8	0.07	Marsh Seedless	K
49	40	30	10	8	0.037	Marsh Seedless	İ
50	40	30	40	20	0.103	Star Ruby	İ
51	40	75	40	20	0.103	Ray Ruby	O

*İ:ince, O:orta, K:kalin

Bu deneylerin sonuçları göz önünde bulundurularak Ray Ruby yaprak ve 2 çeşit prob kullanılarak, 50 mL ekstraktörde gerçekleşen ultrases destekli ekstraksiyon yöntemiyle beraber yeni bir D-optimal deneysel tasarım oluşturulmuştur. Ray Ruby yaprağa uygulanan UDE yönteminin D-optimal deney tasarımı Tablo 3.3 ile gösterilmektedir.

Tablo 3.3: Ray Ruby yaprağına uygulanan UDE yönteminin D-optimal deneysel tasarımı.

Deney No	EtOH% (v/v)	Zaman (dk)	Sıcaklık (°C)	Katı/Sıvı (g L ⁻¹)	US Güç Yoğunluğu (kW L ⁻¹)	Prob Çeşidi*
1	50	15	37.5	100	0.25	ince
2	0	37.5	25	100	0.5	ince
3	12.5	37.5	37.5	75	0.375	orta
4	50	60	25	100	0.5	orta
5	0	15	25	50	0.25	orta
6	50	37.5	37.5	75	0.375	orta
7	0	37.5	50	100	0.25	ince
8	0	15	37.5	50	0.5	ince
9	0	15	25	100	0.375	ince
10	50	37.5	50	100	0.25	orta
11	0	15	25	100	0.375	ince
12	50	15	25	50	0.25	ince
13	50	60	25	100	0.25	ince
14	25	15	50	50	0.25	ince
15	50	15	50	100	0.5	ince
16	0	60	50	50	0.5	ince
17	0	60	25	75	0.25	ince
18	0	60	50	50	0.25	orta
19	0	60	25	100	0.25	orta
20	0	60	25	50	0.5	orta
21	50	60	25	50	0.5	ince
22	0	15	25	75	0.5	orta
23	0	60	37.5	100	0.5	ince
24	0	15	50	100	0.5	orta
25	50	15	25	100	0.5	ince
26	0	15	50	75	0.25	orta
27	25	15	25	100	0.25	orta
28	50	15	25	50	0.5	orta
29	50	60	50	75	0.25	ince
30	25	60	50	100	0.5	orta
31	0	60	25	75	0.25	ince
32	50	60	25	50	0.25	orta
33	50	37.5	50	50	0.25	orta
34	50	37.5	50	50	0.5	orta

3.4.2.2. Greyfurt Kabuklarına Uygulanan Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

Greyfurt kabuklarından Ray Rubby kullanılarak, 13 mm çapındaki prob (Vibra Cell, Model VCX 750, CT, USA, 20 kHz ve 125 Watt) kullanıldı. UDE yönteminin ön deneylerinde, ultrasesin puls aralığı 5/10 (5 s aç/ 5 s kapa) olarak alınıp, prob dalma

derinliği ise ekstraktör derinliğinin tam ortası olarak belirlendi. Ayrıca kabuklara uygulanan güç yoğunluğu da 0.103 kW L^{-1} olarak sabit tutulmuştur. Tartımları alınan örnekler ekstraktöre konuldu. Deneylerde, farklı katı/sıvı oranı ($12.5\text{-}37.5 \text{ g L}^{-1}$), ekstraksiyon zamanı (30-60 dk.), ekstraksiyon sıcaklığı ($30\text{-}50 \text{ }^{\circ}\text{C}$) ve 250 mL hacimde farklı etanol konsantrasyonlarına (% 0-50 (v/v)) sahip çözelti ekstraktöre ilave edilip, ultrases 20 kHz de çalıştırıldı. Karışım, santrifüje alınıp, 4000 rpm ve 20 dakika boyunca çalıştırıldı. Santrifüjden sonra, karışım $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ filtreden geçirildi ve $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda analiz için saklandı.

Greyfurt kabuklarına uygulanan UDE yönteminin deney tasarımında kategorik faktör kullanılmadığından literatürde en çok kullanılan yüzey merkezli kompozit deney tasarımı seçilmiştir. Üç seviyeli, dört faktörlü merkezi deney tasarımı Tablo 3.4'de gösterilmektedir.

Tablo 3.4: Greyfurt kabuklarına yüzey merkezli merkezi kompozit deney tasarımında kullanılan parametreler ve seviyeleri.

Parametreler	Seviyeler		
	(-1)	(0)	(1)
EtOH-H ₂ O (% v/v)	0	25	50
Süre (dk.)	30	45	60
Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	20	35	50
Katı/Sıvı Oranı (g L^{-1})	12.5	25	37.5

Kabuklara da uygulanan model denklemi olarak, bağımsız faktörlerin bütün etkilerini içeren ikinci dereceden polinom model tercih edildi. Bağımlı değişkenin (cevap) ikinci-dereceden polinom regresyon modeli aşağıdaki Denklem (3.5) gibidir:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{ij} b_{ij} X_i X_j \quad (3.5)$$

3.4.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

3.4.3.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

Mikrodalga destekli ekstraksiyon prosesi Mikrodalga fırını (Milestone srl, NEOS-GR Bergamo, Italy) kullanılarak yapıldı. 2.45 GHz mikrodalga frekansına sahip, atmosferik basınçta çalışan ve maksimum çıkış gücü 900 W olan pilot ölçekli mikrodalga fırını kullanıldı. Cihazın sıcaklık, zaman ve güç gibi özellikleri cihazın spesifik yazılımı

sayesinde kontrol edildi. Ayrıca, cihazın kamera donanımı sayesinde ekstraksiyon işlemi izlenebilmektedir. Şekil 3.2'de MDE yöntemi kullanılmaktadır.



Şekil 3.2: MDE yönteminin deney düzeneği.

Ayrıca, MDE yöntemine ilave olarak cihazın solventsiz mikrodalga destekli ekstraksiyon ünitesi (SMDE) karşılaştırılmak için kullanıldı. SMDE için yapraklar birkaç dakika nemlendirilmek üzere bidistile suyun içine bırakıldı. Daha sonra teflon süzgece konulmuş ve belirli güç ve zamanda ekstraksiyon işlemi sürdürülmüştür. Hem MDE hem de SMDE yönteminde mikrodalga ışıma kavitasyonunu oda sıcaklığına getirmek için yoğunlaştırıcı kullanılmıştır. SMDE yönteminde, ekstraktlar yer çekimi ivmesi sayesinde aşağıdaki balonda toplanmaktadır. Daha sonra toplanan ekstraktlar, analiz için 0.45 μm rejenere selüloz filtreden geçirilmiştir. Şekil 3.3 SMDE deney düzeneğini göstermektedir.



Şekil 3.3: SMDE deney düzeneği.

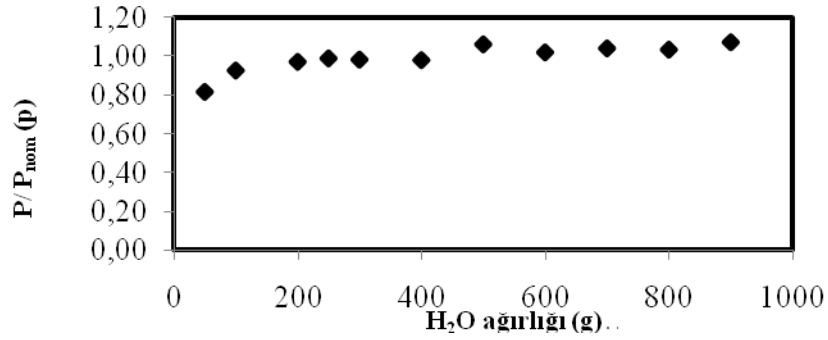
Mikrodalga güç kalibrasyon testi, standart metot (IEC/EN 60705) uygulanarak yapılmıştır [133, 134]. Bu metoda göre, boş cam bolonun ağırlığı tartılmış ve 900 g bidistile su ile doldurulup ağırlığı yeniden tartılmıştır. Balona doldurulan suyun ilk sıcaklığı 10 ± 0.5 °C olacak şekildedir. Balon mikrodalga fırınının kavitasyonuna yerleştirilmiştir. Mikrodalga gücü 900 W ve 60 sn sürecek şekilde ayarlanmıştır. Süre dolduktan sonra, suyun nihai sıcaklığı termokupl ile ölçülmüştür. Güç çıkışı aşağıdaki Denklem (3.6) ile hesaplanmaktadır.

$$P = \frac{c_{p,s} m_s (T_2 - T_1) + c_{p,e} m_e (T_2 - T_0)}{t} \quad (3.6)$$

Bu denklemde m_s suyun ağırlığı (g), m_e ise ekstraktörün (cam balonun) ağırlığı, $c_{p,s}$ suyun spesifik ısısı 4.187 (J/ g °C), $c_{p,e}$ ekstraktörün spesifik ısısı 0.55 (J/ g °C). T_0 , ortamın sıcaklığı (°C), T_1 suyun ilk sıcaklığı (°C). T_2 suyun son sıcaklığıdır; t ise ısıtma süresidir (sn). Mikrodalga güç kalibrasyon testi 50-900 mL aralığında su ile test edilmiştir. Uygulanan nominal güç (P_{nom}) ısı kayıplarını minimize etmek için suyun son sıcaklığı ortam sıcaklığı olacak şekilde ayarlanmıştır. Absorbe edilen güç değerleri ile nominal güç değerleri arasındaki farklar Denklem (3.7) ile gösterilmektedir.

$$p = \frac{P}{P_{nom}} \quad (3.7)$$

Denklemde p korelasyon faktörüdür. Şekil 3.4 yüklenen suya karşı korelasyon faktörünü (p) göstermektedir.



Şekil 3.4: Yüklenen su miktarına karşılık korelasyon faktörü (p).

Yürütülen mikrodalga ekstraksiyon prosesinde kullanılan cam balona aktarılan 250 g su için p değeri 0.991 olarak hesaplanmıştır.

Önce farklı çözücülerle ön deneyler yapıp çözücü olarak su seçilmiştir. Deneysel tasarım için katı/sıvı oranı 8-20 (g L⁻¹) alınıp, mikrodalga ışınlama güç yoğunluğu 0.2-1.4 (kW L⁻¹), ve ısıtma zamanı 30-240 (sn) olarak alınmıştır. Faktörlerin bağımlı değişkene etkilerini belirlemek için yüzey merkezli merkezi kompozit tasarımı kullanılarak değerlendirme yapıldı. Bağımsız değişkenler katı/sıvı oranı 8-20 (g L⁻¹), mikrodalga ışınlama güç yoğunluğu 0.2-1.4 (kW L⁻¹), ve ısıtma zamanı 30-240 (sn) olarak seçildi. Toplam fenolik miktarı (TFM) ve toplam fenolik miktarının üretim hızı (TFM-ÜH) yanıt olarak seçilmiştir. Ayrıca optimum çalışma koşulları belirlenip, HPLC cihazında naringin miktarı (NM) analiz edildi. Deneysel hataları da belirlemek için orta noktalar 6 kez tekrar edilip, toplam 20 deney yapıldı. Bütün regresyon teknikleri kullanılarak, en uygun regresyon sonucu belirlendi. Bütün parametrelerin etkisini görebilmek için Denklem (3.8) ikinci dereceden polinom denkleme uyan model seçilerek, istatistiksel olarak varyans (ANOVA) analizi yapıldı.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{ij}^3 b_{ij} X_i X_j + e \quad (3.8)$$

Deneysel tasarıma ait 20 nümerik faktörlere ait deney planı Tablo 3.5'de gösterilmektedir.

Tablo 3.5: Greyfurt yapraklarına uygulanan MDE yönteminin deney planı.

Deney No	Mikrodalga Güç Yoğunluğu (X_1) (kW L ⁻¹)	Katı/Sıvı (X_2) (g L ⁻¹)	Ekstaksiyon Süresi (X_3) (sn)
5	0.2	8	30
2	1.4	8	30
4	0.2	20	30
8	1.4	20	30
1	0.2	8	240
16	1.4	8	240
17	0.2	20	240
7	1.4	20	240
19	0.2	14	135
14	1.4	14	135
18	0.8	8	135
11	0.8	20	135
3	0.8	14	30
10	0.8	14	240
15	0.8	14	135
12	0.8	14	135
20	0.8	14	135
9	0.8	14	135
13	0.8	14	135
6	0.8	14	135

3.4.3.2. Greyfurt Kabuklarına Uygulanan Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

OFAT yöntemine göre ön denemeler yapıp, deneysel tasarım için yine katı/sıvı oranı 8-20 (g L⁻¹) alınıp, mikrodalga ışınlama güç yoğunluğu 1.2-2.8 (kW L⁻¹), ve ısıtma zamanı 60-120 (sn) olarak bağımsız değişken olarak alındı. Kabuklar yaş olarak tartıldı. Toplam fenolik miktarı (TFM), toplam fenolik miktarının üretim hızı (TFM-ÜH) bağımlı faktörler olarak alınmıştır. Ayrıca optimum çalışma koşulları belirlenip, HPLC cihazında naringin miktarı (NM) analiz edildi. Tablo 3.5'da kabuklara uygulanan MDE deney planı verilmiştir.

Tablo 3.6: Greyfurt kabuklarına uygulanan MDE yönteminin yüzey merkezli merkez kompozit tasarımına ait deney planı.

Deney No	Mikrodalga Güç Yoğunluğu (X_1) (kW L ⁻¹)	Katı/Sıvı (X_2) (g L ⁻¹)	Ekstaksiyon Süresi (X_3) (sn)
5	0.3	8	60
2	0.3	8	120
4	0.7	8	60
8	0.7	8	120

Tablo 3.6 (devam):

1	0.3	20	60
16	0.3	20	120
17	0.7	20	60
7	0.7	20	120
19	0.5	14	60
14	0.5	14	120
18	0.3	14	90
11	0.7	14	90
3	0.5	8	90
10	0.5	20	90
15	0.5	14	90
12	0.5	14	90
20	0.5	14	90
9	0.5	14	90
13	0.5	14	90
6	0.5	14	90

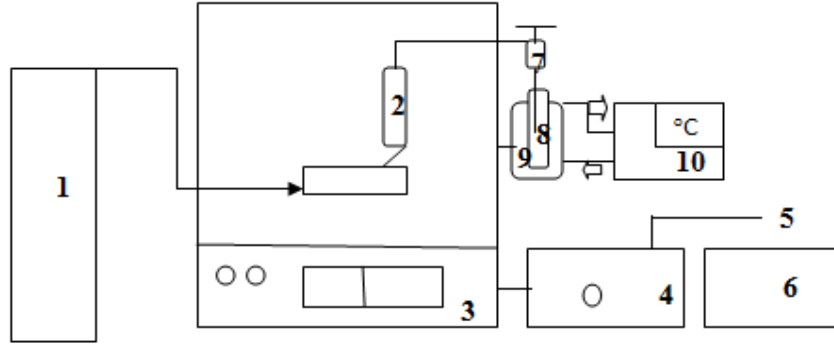
Greyfurt yapraklarına ait deneysel tasarım yöntemi ve regresyon modeli kullanılarak varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır.

3.4.4. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi

Greyfurt yapraklarının SAE yönteminde deney planı uygulanmadan önce yardımcı çözücü kullanılmadan, CO₂ akışkan tek başına kullanıldı. Tek başına CO₂ polar çözüçüler için uygun olmayıp, daha yüksek ekstrakt verimi için H₂O ve farklı konsantrasyonlarda EtOH çözeltileri yardımcı çözücü olarak kullanıldı. Yalnız başına H₂O yardımcı çözücü olarak kullanımı, proseste tıkanıklıklara yol açtığından dolayı, farklı EtOH konsantrasyonlarıyla çalışıldı. Şekil 3.5'te SAE deney düzeneği gösterilmektedir. Applied Separations firmasından satın alınan Speed SFE-2 7070 model süperkritik ekstraksiyon cihazı kullanıldı. Cihazın maksimum çıkacağı sıcaklık, basınç ve CO₂ akış hızları sırasıyla 240 °C, 680 Bar ve 400 mLdk⁻¹'dir. Ekstraktör olarak, paslanmaz çelikten imal edilen ve 25 mL hacme sahip bir hücre kullanılmaktadır.

Ekstraktörün alt kısmına önce polipropilen frit, üzerine polipropilen yün, onun üzerine bir miktar ise nem alıcı granül matriks yerleştirilip, tartılan 5 g greyfurt yaprağı

ekstraktöre konuldu. Daha sonra üzerine 10 mL farklı konsantrasyonlarda EtOH çözeltisi ilave edilip, nem tutucu matriks, polipropilen yün ve polipropilen frit sırasıyla ilave edilip, hem ince hem de kalın conta ile ekstraktörün kapaklarına takılıp, ekstraktörde herhangi bir kaçak olmasın diye kapak teflon conta ile sıkıştırılmıştır. Soğutma sirkülatörünün (PolyScience marka, PN: 082551-AS model) sıcaklığı 10 °C'de sabit tutularak, sirkülatörden geçirilen CO₂ sisteme girişi sağlandı. Cihazın kontrol panellerine girilen istenilen sıcaklık ve basınç değerleri girilip, cihazın PID kontrolü sabit tutuldu. Karbondioksit çıkış vanası açılarak ve mikro-ölçüm vanası ile akışkanın debisi ayarlanılarak, akışkanın sistemden akması sağlandı. Bir elektrik motoru (3 kW gücünde "Gamak MSD 100 L2" model) ile çalışan "Yiğitsan" marka 10 Bar basınç ve 400 L hacimli kompresör ile sistemin çalışması için gerekli olan sıkıştırılmış havanın basılması sağlandı. Ekstraksiyon süresinde sisteme 200 mL dk⁻¹ debi ile 30 dk. CO₂ gazı geçirilip, 30 dk. çıkış boyunca geçirilmesi sağlandı. Ekstraksiyon bitiminde, sistemin basıncı hava basınç regülatörü sayesinde düşürüldü. Fırın sıcaklığı kapatılıp, ekstraktörün sıcaklığının oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Giriş vanası karbondioksit gazının akışını kesmek için kapatılarak, boşaltma vanası ise ekstraksiyon kabının basıncını düşürmek için açıldı. Basıncın tamamen düşmesiyle boşaltma vanası kapatıldı. Daha sonra monoetilen glikol:su karışımında soğutma sistemine daldırılan numune toplama kabı alınıp, içindeki ekstrakt ependorf tüplerine yerleştirilip, analiz için -20 °C'de derin dondurucuya konuldu.



Şekil 3.5: Süperkritik akışkan ekstraksiyondeney düzeneği (1:CO₂ tüpü, 2: Ekstraktör, 3: Sıcaklık-basınç kontrol sistemi, 4: Hava basınç regülatörü, 5: Kompresör 6: Soğutmalı su sürkületörü, 7:Mikro-ölçüm vanası, 8: Ekstraktör toplama kabı, 9:Monoetilen glikol:Su karışımı soğutma banyosu, 10: Soğutmalı su banyosu).

5 g tartılan greyfurt yaprağı, CO₂ (g) akış hızı 200 mLdk⁻¹ sabit tutularak, 100-300 bar basınç aralığı, 32-52 °C ekstraksiyon sıcaklığı, farklı EtOH konsantrasyonları (%20-100 (v/v)) bağımsız değişken olarak alınıp, ekstraksiyon süresi 60 dk. boyunca gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik miktarı (TFM), toplam fenolik miktarının üretim hızı (TFM-ÜH) bağımlı faktörler olarak seçilmiştir. Ayrıca optimum çalışma koşulları belirlenip, HPLC cihazında naringin miktarı (NM) analiz edildi.

Süperkritik deneysel tasarımında, diğer tasarımlara göre daha az deney sayısı veren Box-Behnken tasarım seçildi. Deneysel hataları da belirlemek için orta noktalar 5 kez tekrar edilip, toplam 17 deney planı çıkarıldı. Bütün regresyon teknikleri kullanılarak, en uygun regresyon sonucu belirlendi. Bütün parametrelerin etkisini görebilmek için ikinci dereceden polinom denkleme uyan model seçilerek, istatistiksel olarak varyans (ANOVA) analizi yapıldı.

SAE için Box-Behnken modeli kullanılarak oluşturulan deney planı Tablo 3.7'de gösterilmektedir.

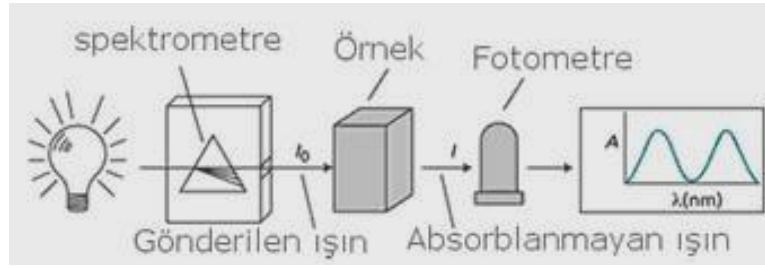
Tablo 3.7: Greyfurt yapraklarına uygulanan SAE yönteminin Box-Behnken deney planı.

Deney No	Basınç (Bar)	Sıcaklık (°C)	%EtOH (v/v)
1	100	32	60
2	300	32	60
3	100	52	60
4	300	52	60
5	100	42	20
6	300	42	20
7	100	42	100
8	300	42	100
9	200	32	20
10	200	52	20
11	200	32	30
12	300	52	50
13	200	42	40
14	200	42	40
15	200	42	40
16	200	42	40
17	200	42	40

3.5. ANALİZDE KULLANILAN CİHAZLAR VE YÖNTEMLER

3.5.1. UV-Vis Spektrofotometre

Çözelti içerisinde maddelerin miktarlarının kantitatif olarak belirlenmesini sağlayan cihazlardan biri de spektrofotometredir. Spektrofotometrenin çalışma prensibinde; konsantrasyonu bilinmeyen çözeltiye belirli spektrumda ışın geçirilir ve çözelti tarafından ışının ne kadarının absorplandığı bulunur. Analiz edilen madde miktarı karışımda oldukça fazlaysa daha çok ışın karışım sayesinde soğurulur. Spektrofotometre kullanılarak, karışımın içerisinde geçebilen karışım tarafından absorplanmayan ışığın intensivitesi tespit edilerek karışım içerisindeki tespit edilmeye çalışılan madde nitel olarak tespit edilir. Spektrofotometrenin içerdiği başlıca iki unsur vardır. Birincisi spektrometre ve diğeri ise fotometredir.



Şekil 3.6: Uv-Vis Spektrofotometre.

Analiz yapılacak numune, spektrometre ve fotometre arasına genellikle kuvarzdan yapılan ve küvet olarak adlandırılan tüp içine yerleştirilir. Her madde, ışını farklı dalga boylarında absorpladığı için, belli dalga boylarında analiz yapılacak örneğe ışın gönderilir ve ışını en fazla absorpladığı dalga boyu bulunur. Gönderilen ışın küvetin içinden geçtikten sonra fotometreye ulaşır. Spektrofotometreden gönderilen ışın ile fotometreye ulaşan ışın arasındaki fark absorplanma miktarını verir. Absorplanma birimi absorbanstır ve Lambert-Beer yasasından Denklem (3.9) gibi hesaplanır.

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I_1} \quad (3.9)$$

Denklemde A absorbanstır; I_0 spektrometreden gönderilen ışının yoğunluğu, I_1 ise küvetten geçtikten sonraki ışının yoğunluğunu tespit eder.

Derişim-absorbans grafiğinin çizilmesi referans çözelti hazırlanır. Numunede su, belirteç ve varsa tampon karışım içermelidir. Spektrofotometrenin ölçeceği şahit ile sıfırlanır. Daha sonra hazırlanan örnek çözelti ile absorbansa karşı konsantrasyon kalibrasyon eğrisi çizilir. Konsantrasyon değerlerine karşılık gelen maksimum absorbans değerleri 1.5-2 alınarak kalibrasyon tablosu çizilir [135].

3.5.2. Uv-Vis Spektrofotometre ile Yapılan Analizler

Fenolik bileşenleri içeren sebze ve meyvelerin özütlerinin doğrudan toplam antioksidan kapasitesi doğrulanmış yöntemlerle ölçülebilmektedir. Antioksidan kapasite belirlemek için kullanılan metotlar, elektron transfer (ET) ve hidrojen atom transfer (HAT) olarak iki gruba ayrılmaktadır. HAT'ın büyük bir bölümü azo bileşiklerinin bozulması boyunca

ısı ile üretilen peroksil radikalleri için substrakt ve antioksidanların yarıştığı rekabetçi reaksiyon şemalarını içerir. ET-temelli analiz metotları ise indirgenme ile renk değiştiren yükseltgenin indirgenmesi ile antioksidan kapasitesini ölçer. ET analizleri, redoks reaksiyonuyla renk değiştiren reaktifler kullanılır. Bu analiz yöntemleri, ABTS/TEAK, CUPRAC, DPPH, Folin-Ciocalteu yöntemleridir [136].

3.5.2.1. Toplam Fenolik Miktarı

Toplam polifenol analizi kolorimetrik bir yöntem olan Folin-Ciocalteu yöntemine [116] göre yapıldı. Standart olarak gallik asit kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisinin denkleminde yararlanılarak, numunelerin polifenolik içerikleri hesaplanıp, mg-gallik asit eşdeğer (GAE) g^{-1} -kuru yaprak (KY) olarak ifade edildi. Greyfurt kabukları ise mg-GAE g^{-1} -yaş kabuk (YK) olarak ifade edildi. Bu yöntemde, 40 μ L örnek alınıp, 360 μ L saf su ilave edildi. Ardından, 2 mL Folin-Ciocalteu (1:10 seyreltilmiş) reaktifi ile karıştırıldı. Daha sonra, karışıma 1600 μ L, % 7.5'lik doymuş sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek vorteks yardımıyla iyice çalkalanmıştır.

Çözelti yarım saat karanlıkta inkübe edildeikten sonra rengin maviye dönmesiyle numunenin absorbanşı şahite karşı spektrofotometrede 765 nm'de okundu.

3.5.2.2. CUPRAC Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Apak ve diğ. [120] yılında belirlediği Cuprac Metodu, toplam antioksidan aktivite tayininde kullanılan bir metottur. Bu yöntemde UV-Vis plastik küvet içerisine sırasıyla bakır (II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan 1'er mL eklendi. Üzerine 0.1 mL örnek ilave edilip çalkalandı ve son hacim 4.1 mL olacak şekilde 1 mL su eklendikten sonra iyice çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda numunelerin, şahit numuneye karşı 450 nm dalgaboyunda absorbanş değerleri ölçüldü. Absorbanş ile referans olarak alınan trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak bilinmeyen konsantrasyonlar hesaplandı. Sonuçlar gram kuru yaprak başına mg troloks eş değeri antioksidan kapasite (mg-TEAK g^{-1} -KY) olarak ifade edildi.

3.5.2.3. DPPH Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Yu ve diğ. [137] geliştirmiş olduğu yöntem biraz modifiye edildi. Metanol ile hazırlanmış olan 500 μ M DPPH radikali çözeltisi 100 μ M'a seyreltildi. Numuneler bu

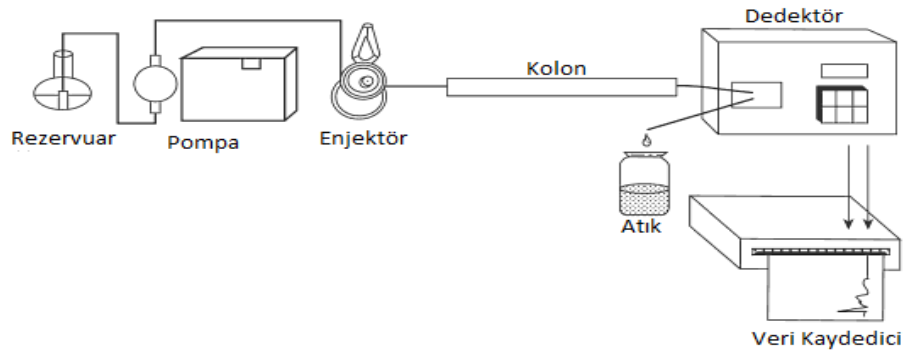
karişıma ilave edildikten sonra iyice kariştırılıp 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Karişımın absorbansı şahit numuneye kariş 517 nm’de ölçüldü. Standart olarak alınan trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Sonuçlar gram kuru yaprak başına mg trolox eř değeri antioksidan kapasite (mg-TEAK g⁻¹-KY) olarak ifade edildi.

3.5.2.4. ABTS Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Re ve diğ. [138] ABTS yöntemi biraz modifiye edildikten sonra 30 µL numuneye, 300 µL ABTS çözeltisi ilave edildi. Altı dakika sonra çözeltilerin absorbansı 734 nm’de okundu. Absorbans ile standart olarak alınan trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak bilinmeyen konsantrasyonlar hesaplandı. Sonuçlar gram kuru yaprak başına mg trolox eř değeri antioksidan kapasite (mg-TEAK g⁻¹-KY) olarak ifade edildi.

3.5.3. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC)

Karişımdaki komponentleri ayırmak ve/veya miktarlarını belirlemek için analitik kimya ve biyokimyada kullanılan sıvı kromatografi tekniğidir. En basit haliyle HPLC sistemi yüksek basınçlı solvent pompası, enjektör, kolon, detektör ve veri kaydediciden oluşur [139].



Şekil 3.7: HPLC şeması.

Rezervuardaki mobil faz pompa yardımıyla kolona, enjektör kısmından verilen numune ise kolonda mobil faz ile birleşir ve numune kolon içinde ilerler. Numune, hareketli faz

ve sabit faz (kolonun içindeki dolgu maddesi) arasında dağılarak komponentlerine ayrılır. Komponentlerine ayrılan numune, detektör akış hücresine geçer. Detektör sinyal gerilimindeki değişiklikleri konsantrasyon değişiklikleri olarak okur ve veri kaydediciye gönderir.

3.5.3.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Naringin Miktarı (NM) Tayini

Greyfurt yapraklardaki ve kabuklarındaki naringin miktarı Agilent 1260 kromatografik sistemi (Agilent, Waldbronn, USA) kullanılarak yapıldı. Agilent 1260 kromatografik sistem pompa, degazör, manuel enjektör, kolon ve diode-array detektörden (DAD) oluşmaktadır.

Eclipse Plus C18 RRHD 18 marka kolon (3.0 mm × 5.0 mm id, 1.8 µm partikül boyutu) ekstraktaki naringini ayırmak için kullanıldı. Kolon sıcaklığı 40 °C'de sabit tutuldu. Gradient fazdaki A'nın su içinde % 0.1 formik asit içerirken, B mobil fazı ise asetronitril içinde % 0.1 formik asit içerir. Naringin miktarının tespitinde kullanılan gradient programı Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8: HPLC gradient programı.

Süre (dk.)	A (mobil faz)	B (mobil faz)
0-7.0 dk.	% 100	% 0
7-7.1 dk.	% 60	% 40
7.1-8.6 dk.	% 0	% 100
8.7-10 dk.	% 100	% 0

Enjeksiyon hacmi 20µL olup, detekte edilen dalga uzunluğu 276 nm olarak ayarlanmıştır [140]. Naringin (%98'lik) kullanılarak, 5-100 mgL⁻¹ (ppm) arasında standart çözeltiler hazırlanıp, HPLC'ye verilip kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Denklem (3.10) kalibrasyon eğrisi denklemini göstermektedir. ($R^2=0.99901$)

$$A=12.3848258.C+11.08 \quad (3.10)$$

Denklemde A:alan, C ise konsantrasyondur (ppm).

3.6. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM)

SEM (SEM-EDX, FEI Quanta FEG-450) cihazı kullanılarak greyfurt yapraklarının yapısının Soxhlet, UDE, MDE ve SAE yöntemlerinden önce ve sonraki yapısındaki değişiklikler tespit edildi. Yüzeydeki elektrostatik yüklemeyi uzaklaştırmak için örnekler altın film ile kaplandı. Örnekler 20 kV voltajla çalışılarak vakum altında çalışıldı.

4. BULGULAR

4.1. SOXHLET EKSTRAKSİYON DENEYLERİ

Greyfurt kabuklarına soxhlet ekstraksiyon yöntemi uygulanıp, çözücü türünün ekstraksiyona etkisi incelenmiştir. Tablo 4.1'de deney sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.1: Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilen greyfurt kabuğu ekstraksiyonunda çözücü türünün toplam fenolik miktarına ve üretim hızına etkisi.

Deney No	Çözücü (% v/v) (300 mL)	TFM (mg-GAEG ⁻¹ -YK)	TFM-ÜH (mg-GAE g ⁻¹ .sn ⁻¹ -YK).10 ⁻⁵
1	H ₂ O	7.969	9.22
2	%50 EtOH	11.457	13.26
3	%100 EtOH	6.372	7.375

Tablo 4.1'de görüldüğü üzere, çözücü türlerinin TFM'ye etkisi oldukça fazladır. Kabuklar için %50 EtOH çözeltisi en iyi çözücü olarak bulunmuştur. Çözücünün polaritesi, dielektrik sabiti, dipol moment ve viskozitesi difüzyon hızını etkilediğinden dolayı ekstraksiyon verimini de etkilemektedir [141,142]. Suyun dielektrik sabiti diğerlerinden, çok yüksek olmasına rağmen, %50 EtOH ile en yüksek sonuca ulaşılması, belli miktarda EtOH suyun viskozitesini düşürmesi ile açıklanır. Diğer taraftan, etanolün ısılatma özelliği de suya göre daha yüksektir. Birçok araştırmacı ise saf çözücülerin yerine farklı oranlarda EtOH ve H₂O karışımlarıyla yaptığı ekstraksiyon çalışmalarda daha yüksek fenolik madde bulduklarını belirtmişlerdir [141,143]. Elde edilen deney sonuçları, literatürdeki sonuçlarla uyumludur.

Greyfurt yapraklarına da Soxhlet ekstraksiyon yöntemi uygulanıp, farklı çözücülerle fenol miktarları belirlenmiştir. Tablo 4.2'de deney sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.2: Soxhlet ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilen greyfurt yaprağı ekstraksiyonunda çözücü türünün ekstrakt miktarına etkisi.

Deney No	Çözücü (% v/v) (300 mL)	TFM (mg-GAE g ⁻¹ -KY)	TFM-ÜH (mg-GAEg ⁻¹ s ⁻¹ -KY).10 ⁻⁵
1	H ₂ O	15.945	18.45
2	%50 EtOH	13.645	15.79
3	%100 EtOH	12.372	14.32

Çözücü olarak su kullanıldığında yapraklardaki TFM miktarının en fazla olduğu bulunmuştur. Goli ve diğ. [144] fıstık gövdesini ekstrakte etmişler ve en fazla TFM çözücü olarak su kullandıklarında elde etmişlerdir. Bu durumu, suyun yüksek polaritesi ve yüksek dielektrik sabitine bağlamışlardır. Yaprak ve kabukta benzer eğilimlere rastlanmaması tamamen ekstrakte edilecek maddenin matris yapısı ile ilgilidir. Bitkinin matrisi hedef komponentin etkstraksiyonunu etkileyen bir başka parametredir.

4.2. ULTRASES DESTEKLİ EKSTRAKSİYON DENEYLERİ

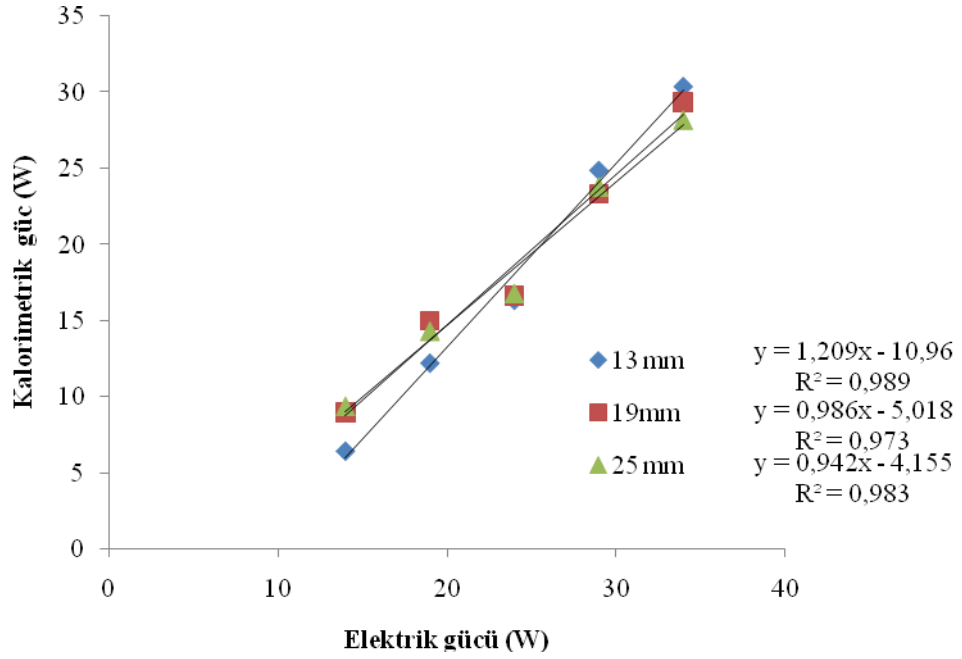
4.2.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

4.2.1.1. Kalorimetrik Sonuçlar

Ultrases çeviricinin ne kadar elektrik harcadığını belirlemek için Wattmetre kullanılmıştır. Sistem stand-by konumundayken, wattmetre 20 W'ı göstermektedir. Piezoelektrik çevirici tarafından tüketilen net elektrik gücünün hesaplanması için elektrik gücünden bu değer çıkarılmıştır. Denklem (4.1) puls oranı ile güç yoğunluğu arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

$$W_{\text{puls}} = \text{puls oranı} \cdot W_{\text{sürekli}} \quad (4.1)$$

Kalorimetrik güç değerleri ve elektrik güç değerleri arasındaki ilişki Şekil 4.1'de ifade edilmiştir.



Şekil 4.1: Farklı problarla elde edilen kalorimetrik güce karşı elektrik gücü.

Kalorimetrik güç değerleriyle elektrik güç değerleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu görülmektedir. Gerekli minimum elektrik gücü doğrunun kesim noktasıdır. Oluşan kabarcıklar için, akustik güç eşiği minimum elektrik gücü tarafından yenilmesi gereklidir. Hesaplanan akustik güç eşiği 13 mm, 19 mm ve 25 mm problar için sırasıyla 9.1 W, 5.1 W ve 4.4 W'dır. Bu değerler güç yoğunluğu olarak 7.2 Wcm^{-2} , 1.9 Wcm^{-2} , ve 0.9 Wcm^{-2} olarak hesaplandı. Prob çapı arttığında, tüketilen elektrik gücünün düştüğü görülmektedir. Bunun yanında, büyük prob çapı elektrik gücünün ultrasonik güce dönüşümünün daha yüksek verimle dönüştüğü bilinmektedir. Çünkü, verilen ekstraksiyon hacmine daha geniş yüzeyli ısınlanan kaynak boyunca enerji transferi olmaktadır [145].

4.2.1.2. Regresyon Model Denkleminin Geliştirilmesi

D-optimal tasarım uygulanırken, parametre değer aralığı belirlemek için ön denemeler yapıldı. Öncelikle, ultrases genliği 15 dakika boyunca 10°C 'de % 20-70 aralığında değiştirildi. Katı/sıvı oranı 10 g L^{-1} ve puls oranları (4/10, 5/10 ve 6/10) alınarak kesikli ve sürekli olarak çalıştırıldı. Bunun yanında, prob dalma derinliği 4.0, 5.3 ve 7.0 cm olarak alındı. Ön deneyler sonucunda, puls oranı 5/10 ve prob dalma yüksekliği 5.3 cm olarak belirlenmiştir. Tablo 4.3, yukarıda belirtilen şartlarda gerçekleştirilen UDE

denemelerinde çeşitli parametrelerin TFM, TFM-ÜH ve TFM-SE üstüne etkilerini göstermektedir. Bağımlı değişkenler için geriye doğru elimine regresyonlu ikinci dereceden model uygulandı. Modellerin yeterliliği ise her bir bağımlı değişken için varyans analizi (ANOVA) kullanılarak doğrulandı.

Tablo 4.4'de korelasyon katsayıları (R^2 , R_a^2 ve R_t^2), standart katsayılar, varyans ve yeterli hassasiyet (adequate precision) gösterilmektedir. Korelasyon katsayıları 0.95'ten büyük olması modelin deneysel verilere uyduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, R_a^2 ve R_t^2 korelasyon katsayıları arasındaki fark 0.2'den daha azdır. Bir diğer önemli parametre ise varyasyon katsayısıdır (CV). Standart sapmanın ortalamaya oranını ifade etmektedir.

Tablo 4.3: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler.

Deney No	TFM (mg-GAEg ⁻¹ -KY)	TFM-ÜH (mg- GAEg ⁻¹ sn ⁻¹ -KY)	TFM-SE (kJmg ⁻¹ -GAE)
1	21.223	0.012	1.092
2	22.261	0.012	1.041
3	19.641	0.011	0.472
4	21.358	0.005	2.713
5	21.045	0.005	1.101
6	20.122	0.011	0.461
7	26.121	0.006	0.797
8	7.839	0.004	0.425
9	5.239	0.003	0.636
10	17.284	0.004	3.352
11	13.500	0.008	0.687
12	23.527	0.005	2.463
13	16.006	0.004	1.448
14	25.54	0.006	2.268
15	21.297	0.007	0.762
16	25.016	0.006	1.574
17	6.735	0.004	0.494
18	18.363	0.01	0.181
19	27.517	0.006	0.756
20	8.825	0.002	0.943
21	7.548	0.004	1.228
22	2.976	0.002	1.598
23	18.179	0.010	0.458
24	15.41	0.009	1.504
25	19.441	0.011	1.192
26	13.586	0.003	1.532
27	15.68	0.003	0.531

Tablo 4.3 (devam):

28	12.795	0.004	1.032
29	21.574	0.008	0.232
30	10.36	0.003	1.607
31	17.841	0.004	0.467
32	15.170	0.008	0.232
33	22.848	0.013	0.364
34	21.666	0.005	0.952
35	18.693	0.010	0.496
36	24.54	0.014	0.944
37	14.639	0.008	0.227
38	22.593	0.005	0.73
39	22.056	0.008	0.788
40	23.708	0.013	0.351
41	11.779	0.003	0.707
42	12.168	0.007	0.456
43	13.88	0.003	4.174
44	19.357	0.004	1.497
45	20.941	0.006	0.885
46	10.430	0.002	1.140
47	13.677	0.008	0.678
48	22.735	0.005	0.932
49	5.740	0.003	1.450
50	21.819	0.012	0.425
51	20.509	0.005	1.130

Tablo 4.4: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

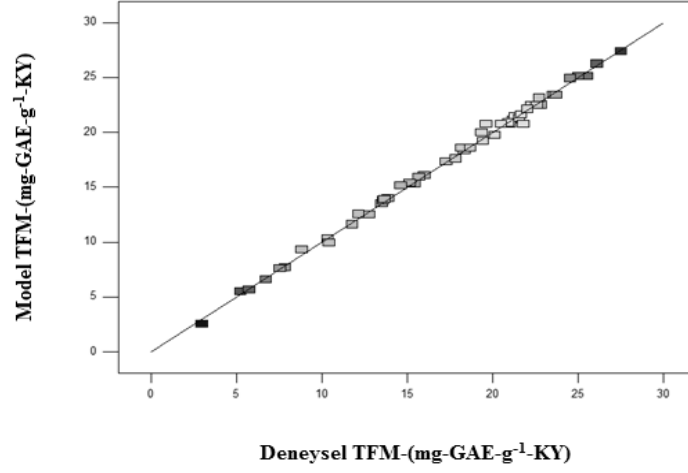
Bağımlı Değişkenler	SD*	R ²	R ² _a	R ² _t	CV	AP**
TFM (mg-GAEg ⁻¹ -KY)	0.730	0.9969	0.9857	0.9273	4.19	38.539
TFM-ÜH(mg-GAEg ⁻¹ sn ⁻¹ -KY)	0.035	0.9893	0.9702	0.8927	8.97	26.180
TFM-SE (kJmg ⁻¹ -GAE)	0.160	0.9841	0.9582	0.8557	15.22	28.360

*SD:Standart sapma

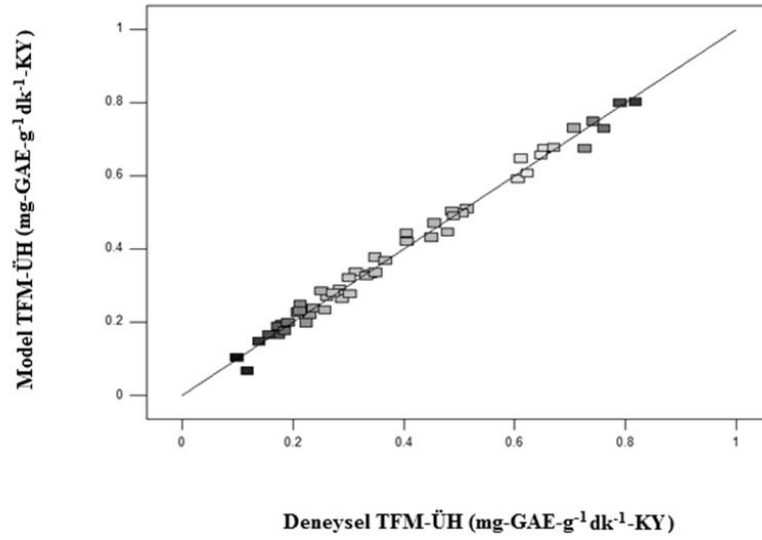
**AP:Yeterli hassasiyet

Genelde düşük CV değeri (% 10) ve düşük standart sapma modelin oldukça tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir [146]. Yeterli hassasiyet (Adequate precision-AP) değeri ise sinyalin gürültüye oranını ölçer ve bu değer 4'ten büyük olması istenir [147]. Bu durumda, yeterli hassasiyet oranı bütün modeller için yeterli sinyallerin olduğunu göstermektedir. Şekil 4.2-4.4 tahmin edilebilen verilerle (model) deneysel veriler arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermektedirler. Elde edilen lineer

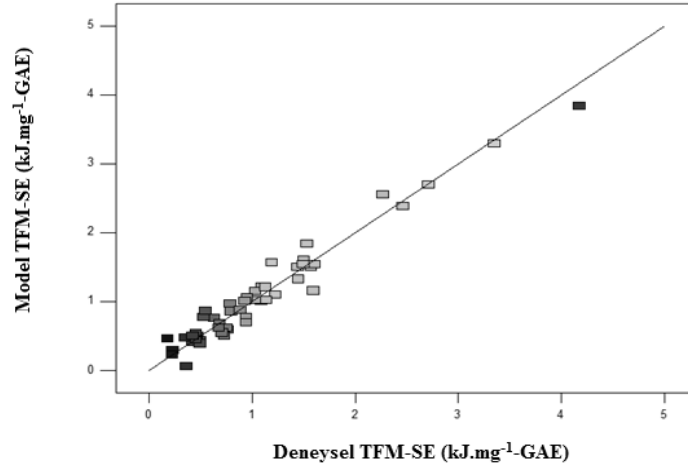
korelasyon katsayıları 0.9702'den 0.9983'e kadar değişmektedir. Yine de, bazı veri noktaları lineerlikten sapmaktadır.



Şekil 4.2: Greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM ile deneysel TFM arasındaki korelasyon.



Şekil 4.3: Greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM-ÜH ile deneysel TFM-ÜH arasındaki korelasyon.



Şekil 4.4: Greyfurt yapraklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM-SE ile deneysel TFM-SE arasındaki korelasyon.

Ray Ruby yaprağı 50 mL ekstraktör kullanılarak ekstrakte edilip, yeniden deneysel tasarım uygulandı. UDE denemelerinde çeşitli parametrelerin TFM, TFM-ÜH ve TFM-SE üstüne etkileri Tablo 4.5 ile gösterilmektedir.

Tablo 4.5: UDE yöntemi kullanılarak Ray Ruby yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler.

Deney No	TFM (mg-GAEg ⁻¹ -KY)
1	8.4724
2	12.0546
3	17.9607
4	10.8496
5	13.1820
6	13.1009
7	12.4892
8	10.0217
9	9.5824
10	8.9260
11	8.6311
12	7.6879
13	2.3019
"14	13.5887
15	9.1387
16	6.2890
17	12.9966
18	17.0381

Tablo 4.5 (devam):

19	10.5047
20	17.2352
21	14.3130
22	13.1897
23	12.6973
24	12.3902
25	9.4094
26	13.4427
27	6.2189
28	12.2535
29	12.2851
30	13.8872
31	13.3098
32	9.8092
33	12.4166
34	12.1117

Tablo 4.6 ise korelasyon katsayıları (R^2 , R^2_a ve R^2_t), standart katsayılar, varyans ve yeterli hassasiyet (adequate precision) göstermektedir.

Tablo 4.6: UDE yöntemi kullanılarak greyluft yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

Bağımlı Değişkenler	SD*	R^2	R^2_a	R^2_t	CV	AP**
TFM (mg-GAEg ⁻¹ -KY)	0.520	0.9891	0.9744	0.9273	4.19	38.203

*SD:Standart sapma

**AP:Yeterli hassasiyet

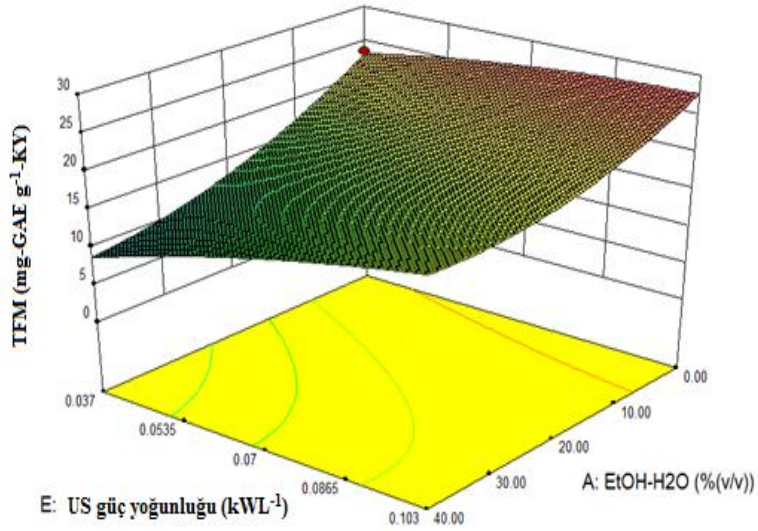
4.2.1.3. UDE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Yaprak Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları

Çok amaçlı optimizasyon problemleri Simpleks Metoduyla çözülür. Bağımlı değişkenler; TFM ve TFM-ÜH maksimize edildi. Bu amaçla, istenilen yaklaşım her tahmin edilen bağımlı değişken için 0-1 arasında değer alır. İstenilen değer 1'e yaklaşması demek, bağımlı değişken değerinin optimum olduğunun göstergesidir [148].

Çok amaçlı bağımsız değişkenler için çözücü konsantrasyonu %100 H₂O, ekstraksiyon zamanı 30 dk., ekstraksiyon sıcaklığı 37 °C ve katı/sıvı oranı 8 g L⁻¹, US güç yoğunluğu ise 0.076 kW L⁻¹ ve kategorik faktörlerden yaprak çeşidi Ray Ruby ve kalın prob ise prob boyutu olarak seçildi. Bağımlı değişken olarak, TFM için 28.986 (mg-GAE g⁻¹-

KY), TFM-ÜH 0.917 (mg- GAEg⁻¹dk⁻¹-KY), ve TFM-SE için 0.012 (kJmg⁻¹-GAE) olarak belirlendi.

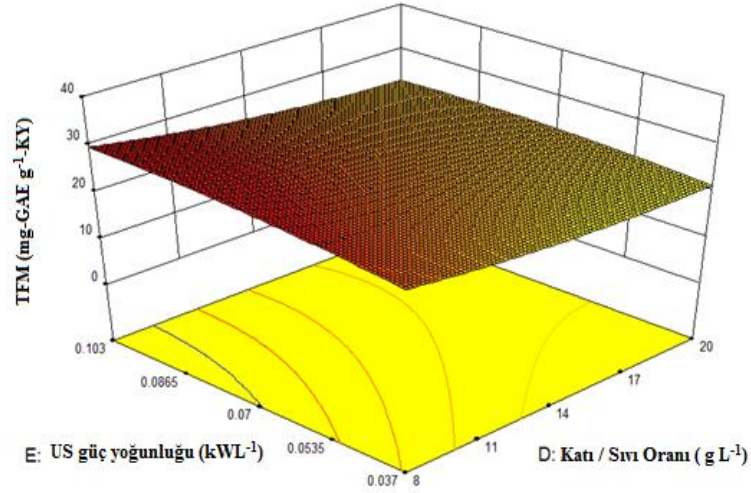
Ekstrakt verimlerini gösteren üç boyutlu (3-D) yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.5-4.7 ile gösterilmektedir.



Şekil 4.5: US güç yoğunluğu ve EtOH (%(v/v)) konsantrasyonunun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman: 30 dk., sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L⁻¹, yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).

Ultrases güç yoğunluğu artıkça, kavitasyon da artmaktadır [149]. Böylece, artan güç yoğunluğu, sonokimyasal reaksiyon hızını artırmaktır. Çünkü kavitasyon sayesinde daha çok sayıda kabarcık oluşmakta ve bu durum ekstraksiyon hızını artırmaktadır [150]. Üstelik katı ve sıvı faz arasındaki kütle transferi kesme kuvveti tarafından gelişir ve kavitasyon baloncuklarının patlaması sayesinde kütle iletimine direnç azalmaktadır [151]. Şekil 4.5'te TFM'nin artan su yüzdesi ile arttığı görülmektedir. Khochar ve Magnusdottir [152], çözücü olarak % 80 EtOH, % 70 EtOH ve %100 H₂O kullanarak, çay yapraklarından kateşin ve kafein ektrakte etmişler ve en yüksek ekstrakt verimini sadece H₂O kullandıklarında elde etmişlerdir. Benzer durumun bu tez çalışmasında da

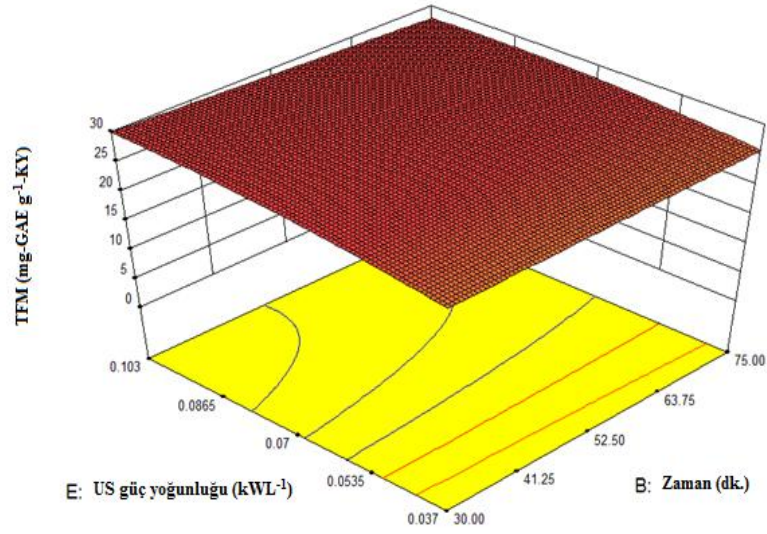
görülmesi suyun fenolik komponentler için ne kadar etkili bir çözücü olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6: US güç yoğunluğu ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman: 30 dk., sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L⁻¹, yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın, US güç yoğunluğu: 0.076 kW L⁻¹).

Katı/sıvı oranı yükseldiğinde, TFM'nin hafif yavaş bir azalma gösterdiği Şekil 4.6'da görülmektedir. Yüksek çözücü hacmi kütle transferini artırarak, TFM miktarını belli bir seviyeye kadar artırmaktadır. Prasada ve diğ. [153], Bi ve diğ. [154] farklı bitki hücrelerinde katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini incelediklerinde benzer sonuçlarla karşılaşmışlardır.

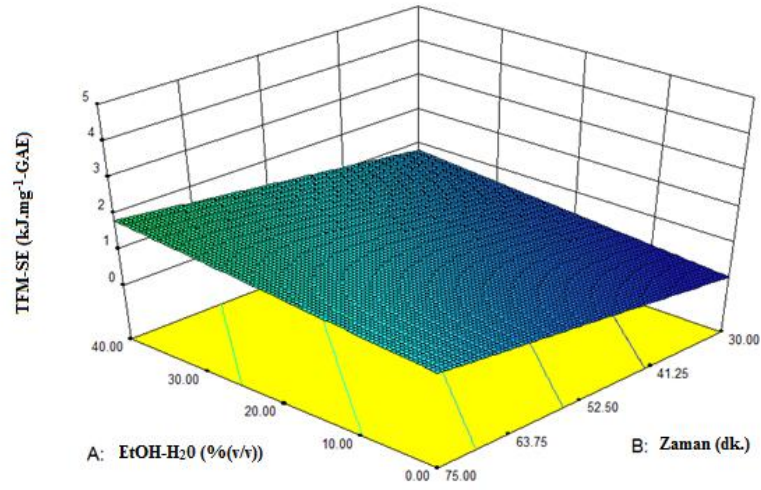
Şekil 4.7'ye bakılacak olursa ekstraksiyon süresinin TFM üzerinde çok etkili bir faktör olmadığı görülmektedir. TFM için 60 dk.'ya kadar keskin bir artış gözlenmiş, ardından bu artış çok belirginleşmemiştir. Bu durum difüzyon hızının başlangıçta artması belirli bir süreden sonra ise doygunluğa varıp sabitlenmesi ile açıklanmıştır. Wang ve diğ. [143], Thoo ve diğ. [155] ekstraksiyon süresinin TFM üzerine etkisini incelemişler ve bu çalışma ile uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir.



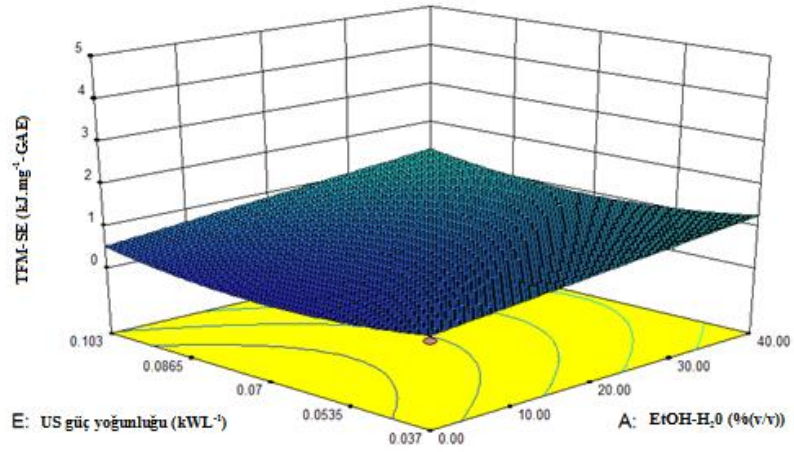
Şekil 4.7: US güç yoğunluğu ve zamanın TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (EtOH: %100, zaman: 30 dk., sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L⁻¹, yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).

Bunun yanı sıra TFM ve TFM-ÜH arasında lineer bir ilişki söz konusudur. Üretim hızı toplam fenolik miktara lineer olarak bağlıdır. TFM'yi etkileyen bütün faktörler TFM-ÜH'da etkiler.

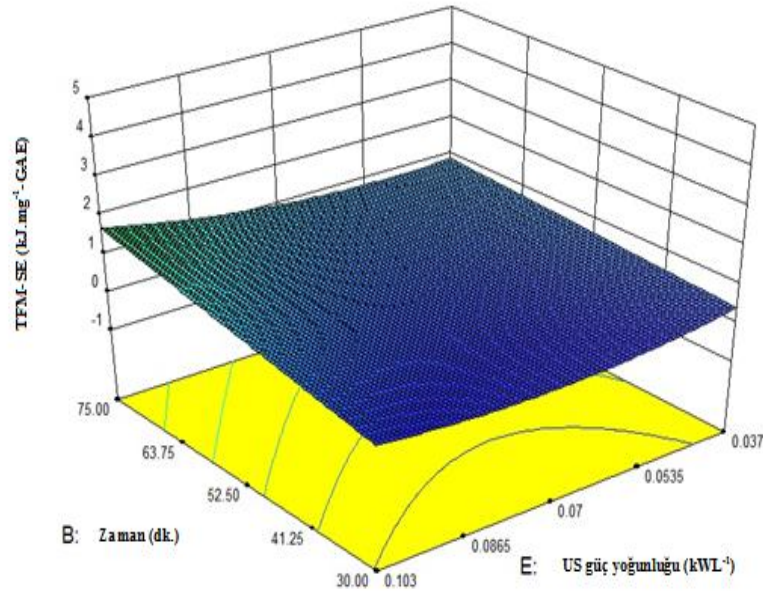
Spesifik enerji birim kütle başına olan enerjidir. TFM'yi etkileyen faktörler aynı zamanda TFM-SE'yi de etkilemiştir (Şekil 4.8-Şekil 4.10).



Şekil 4.8: EtOH-H₂O ve zamanın TFM-SE üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (US güç yoğunluğu: 0.076 kW L⁻¹, sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L⁻¹, yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).



Şekil 4.9: US güç yoğunluğu ve EtOH-H₂O'nun TFM-SE üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman: 30 dk., sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L⁻¹, yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).



Şekil 4.10: US güç yoğunluğu ve zamanın TFM-SE üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (EtOH: %100, sıcaklık: 37 °C, katı/sıvı oranı: 8 g L⁻¹, yaprak çeşidi: Ray Ruby, prob: kalın).

Yüksek US güç yoğunluğu yüksek spesifik enerjiyle sonuçlanır. Yüksek EtOH konsantrasyonu ve uzun ekstraksiyon süresi TFM-SE'yi etkilemektedir. Yüksek ekstraksiyon süresi oksidasyona ve düşük ekstrakt verimine neden olmaktadır. Artan EtOH konsantrasyonu ise çözücü polaritesi yüzünden düşük ekstrakt verimine neden olmaktadır.

Deney planında kullanılan bir diğer değişken ise sıcaklıktır. Sıcaklığın artması çözücü viskozitesinin azalmasına ve daha fazla difüzyon hızına neden olmaktadır. Örneğin, Wang ve diğ. [156] nar kabuğundan polifenollerini ekstrakte etmişler ve artan sıcaklıkla ekstrakt veriminin arttığını görmüşlerdir. Onlar bu olayı, Einstein denkleminde bağlamışlar ve artan sıcaklığın kütle transferini artırdığını ifade etmişlerdir. Ayrıca, Spigno ve De Faveri [157] üzümünden fenolik maddeleri ekstrakte ederken benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Prob boyutu kategorik faktör olarak analiz edildiğinde, prob çapı artığında güç yoğunluğu azalmaktadır, ancak büyük prob çapının ekstrakt verimini arttırdığı

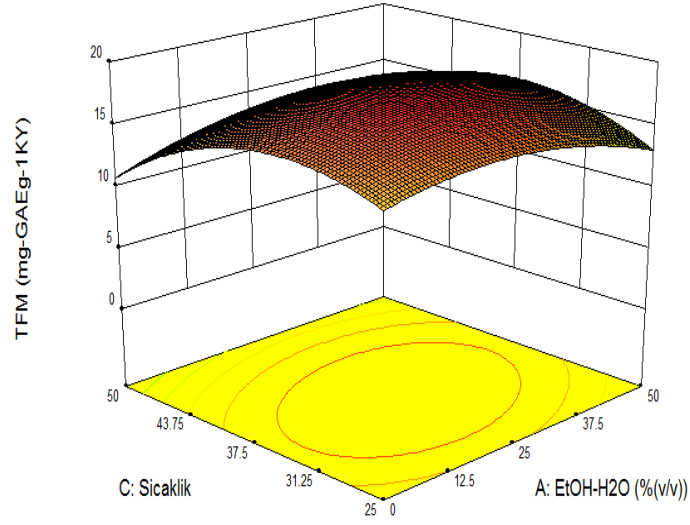
optimizasyon sonucundan bulunmuştur. Büyük prob çapı katı ve sıvı faz arasında yüksek temas yüzeyini arttırır bunun sonucu olarak da kütle transferi artar.

Literatür araştırmalarımıza göre, tüketilen enerji ve ekstrakt verimini göz önünde bulunduran ve aynı bölgede yetiştirilen greyfurt yapraklarının çeşitlerinin karşılaştırılması ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yine de birçok araştırmacı farklı bölgelerde ve farklı hasat mevsimlerinde yetiştirilen farklı çeşit bitkileri araştırmışlardır [158]. Deney sonuçlarına göre sırasıyla fenol miktarı büyükten küçüğe doğru Ray Ruby, Star Ruby ve Seedless Marsh şeklinde sıralanmaktadır. Kelebek (2010) [159] Türkiye'de yetiştirilen greyfurt çeşitlerinin antioksidan aktivitelerini ve fenolik madde miktarlarını tayin etmiştir ve Handerson, Rio Red, Star Ruby, Ruby Red greyfurt çeşitlerinden en yüksek miktarda fenolik ihtiva edenin Star Ruby çeşidi olduğunu belirtmiştir.

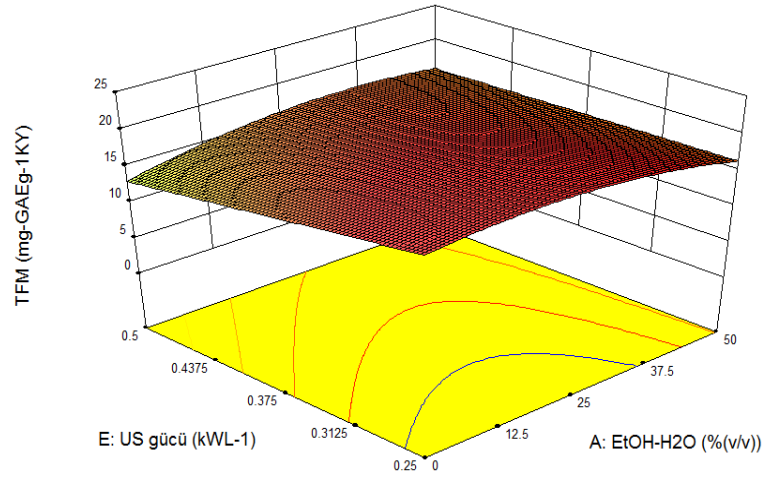
Ray Ruby greyfurt yaprağıyla yapılan D-optimal deneysel tasarımında bağımlı değişkenlerden TFM maksimize edildi. TFM için çözücü konsantrasyonu %28 EtOH-H₂O, ekstraksiyon zamanı 47 dk., ekstraksiyon sıcaklığı 35 °C ve katı/sıvı oranı 50 g L⁻¹, US güç yoğunluğu ise 0.406 kW L⁻¹ ve kategorik faktörlerden prob boyutu ise orta prob olarak seçildi. Bu optimal şartlar altında TFM 18.915 (mg-GAE g⁻¹-KY) olarak belirlendi.

Ekstrakt verimlerini gösteren üç boyutlu (3-D) yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.11-4.12 ile gösterilmektedir.

Şekil 4.11 ile sıcaklığın artması çözücü viskozitesinin azalmasına ve daha fazla difüzyon hızına neden olmakta ve böylece TFM artmaktadır. EtOH yüzdesi %28 iken en yüksek TFM görülmekte iken, %28'den sonra ise azalma meydana gelmektedir. Bu durum ise, suda daha iyi çözünen polifenolik maddelerin olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar bir önceki D-optimal tasarımı ile de görülmektedir. Şekil 4.12'de ise ultrases güç yoğunluğu artması kavitasyonu artırmaktadır. US güç yoğunluğu 0.406 kW L⁻¹ iken TFM'nin en yüksek değerde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.11: Sıcaklık ve EtOH-H₂O konsantrasyonunun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (US güç yoğunluğu ise 0.406 kW L⁻¹, katı/sıvı oranı: 50 g L⁻¹, prob: orta).



Şekil 4.12: US güç yoğunluğu ve EtOH-H₂O'nun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman: 47 dk., sıcaklık: 35 °C, katı/sıvı oranı: 50 g L⁻¹, prob: orta).

Ray Ruby çeşidine uygulanan D-optimal tasarım ile yaprak çeşidine uygulanan D-optimal tasarım sonuçları benzer çıkmıştır. Prob çapı arttığında TFM'nin arttığı görülmektedir.

4.2.2. Greyfurt Kabuklarına Uygulanan Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

4.2.2.1. Regresyon Mode Denkleminin Geliştirilmesi

Tablo 4.7: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen bağımlı değişkenler.

Deney No	EtOH (%v/v)	Katı/Sıvı (g ^L ⁻¹)	Zaman (dk)	Sıcaklık (°C)	TFM (mg-GAEg ⁻¹ YK)	TFM-ÜH (mg-GAE.g ⁻¹ sn ⁻¹ YK)
1	0	13	30	20	8.908	0.005
2	50	38	30	50	10.278	0.006
3	50	38	30	20	9.554	0.005
4	50	38	60	20	10.755	0.003
5	50	25	45	35	11.121	0.004
6	0	38	60	20	8.643	0.002
7	0	25	45	35	10.095	0.004
8	25	25	45	35	10.629	0.004
9	25	25	45	20	10.922	0.004
10	50	13	60	50	11.693	0.003
11	25	25	45	35	10.453	0.004
12	25	25	45	50	11.078	0.004
13	25	25	45	35	10.927	0.004
14	50	13	60	20	10.055	0.003
15	0	38	60	50	8.513	0.002
16	25	25	30	35	10.337	0.006
17	25	25	45	35	10.869	0.004
18	50	13	30	50	13.077	0.007
19	0	38	30	20	6.714	0.004
20	0	13	60	20	10.275	0.003
21	0	13	60	50	10.640	0.003
22	0	38	30	50	6.536	0.004
23	0	13	30	50	11.854	0.007
24	25	38	45	35	7.703	0.003
25	25	25	60	35	10.501	0.003
26	25	25	45	35	10.607	0.004
27	25	13	45	35	10.507	0.004
28	50	13	30	20	11.426	0.006
29	25	25	45	35	11.034	0.004
30	50	38	60	50	9.512	0.003

Bağımlı değişkenler için geriye doğru elimine regresyonlu ikinci dereceden model uygulandı. Modellerin yeterliliği ise her bir bağımlı değişken için varyans analizi (ANOVA) kullanılarak doğrulandı.

Tablo 4.8 UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM'ye ait ANOVA tablosunu, Tablo 4.9 ise TFM-ÜH'ye ait ANOVA tablosunu göstermektedir.

Tablo 4.8: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.

TFM Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	56.84	14	4.06	24.36	< 0.0001	Önemli
A-EtOH (%v/v)	12.99	1	12.99	77.97	< 0.0001	
B-katı/sıvı oranı (gL ⁻¹)	22.73	1	22.73	136.41	< 0.0001	
C-zaman(dk)	0.20	1	0.20	1.21	0.2891	
D-sıcaklık (°C)	1.95	1	1.95	11.72	0.0038	
AB	1.64	1	1.64	9.82	0.0068	
AC	2.54	1	2.54	15.26	0.0014	
AD	3.322E-3	1	3.322E-3	0.020	0.8896	
BC	3.01	1	3.01	18.08	0.0007	
BD	3.45	1	3.45	20.68	0.0004	
CD	1.27	1	1.27	7.64	0.0145	
A2	0.053	1	0.053	0.32	0.5794	
B2	4.79	1	4.79	28.72	< 0.0001	
C2	5.292E-3	1	5.292E-3	0.032	0.8609	
D2	0.74	1	0.74	4.46	0.0518	
Kalıntı	2.50	15	0.17			
Uyum eksikliği	2.25	10	0.23	4.52	0.0549	Önemsiz
Saf Hata	0.25	5	0.050			

Tablo 4.8 TFM'ye ait ANOVA tablosuna göre, en önemli bağımlı değişken katı/sıvı oranı olduğu görülmektedir. Bunu EtOH (%v/v) yüzdesi ve sıcaklık (°C) takip etmektedir. İkili etkileşimlerden ise, EtOH (%v/v)-katı/sıvı oranı etkileşimi, EtOH (%v/v)-zaman(dk) etkileşimi ve katı/sıvı oranı (gL⁻¹)-sıcaklık (°C) etkileşimi önemli olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, katı/sıvı oranı (gL⁻¹) etkileşimin karesi de önemli parametredir.

Tablo 4.9: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM-ÜH için ANOVA analizi.

TFM-ÜH Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	4.612E-5	14	3.294E-6	77.72	< 0.0001	Önemli
A-EtOH (%v/v)	2.888E-6	1	2.888E-6	68.14	< 0.0001	

Tablo 4.9 (devam):

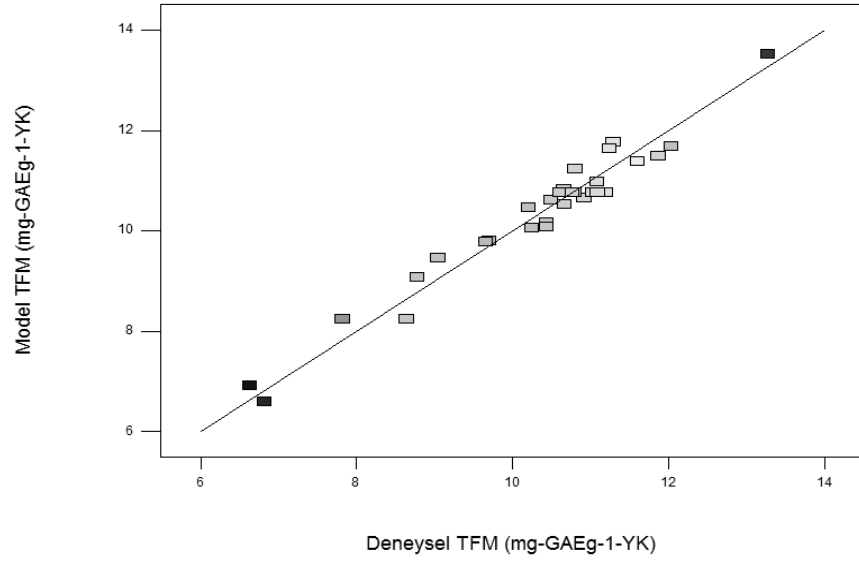
B-katı/sıvı oranı (g ^L ⁻¹)	4.767E-6	1	4.767E-6	112.46	< 0.0001	
C-Zaman(dk.)	3.228E-5	1	3.228E-5	761.58	< 0.0001	
D-Sıcaklık(°C)	5.304E-7	1	5.304E-7	12.51	0.0030	
AB	3.054E-7	1	3.054E-7	7.21	0.0170	
AC	1.345E-6	1	1.345E-6	31.73	< 0.0001	
AD	1.866E-9	1	1.866E-9	0.044	0.8366	
BC	1.764E-6	1	1.764E-6	41.62	< 0.0001	
BD	6.352E-7	1	6.352E-7	14.99	0.0015	
CD	4.496E-7	1	4.496E-7	10.61	0.0053	
A ²	5.353E-9	1	5.353E-9	0.13	0.7273	
B ²	6.770E-7	1	6.770E-7	15.97	0.0012	
C ²	5.165E-7	1	5.165E-7	12.18	0.0033	
D ²	9.423E-8	1	9.423E-8	2.22	0.1567	
Kalıntı	6.358E-7	15	4.239E-8			
Uyum eksiklikliği	6.016E-7	10	6.016E-8	8.80	0.0135	Önemli
Saf Hata	3.418E-8	5	6.837E-9			

Tablo 4.9'a ait ANOVA tablosundan, TFM-ÜH için tekli etkileşimlerden bütün parametreler önemli olduğu gözükmemektedir. Ekstraksiyon süresinin üretim hızı üzerine en etkili parametre olduğu görülmektedir. İkili etkileşimlerden ise, EtOH-katı/sıvı oranı etkileşimi, EtOH-zaman etkileşimi ve katı/sıvı oranı-zaman etkileşimi, katı/sıvı oranı-sıcaklık etkileşimi, zaman-sıcaklık etkileşimi etki olduğu görülmektedir. Aynı şekilde, katı/sıvı oranının karesi, sıcaklığın karesi, zamanın karesi de önemli parametrelerdendir.

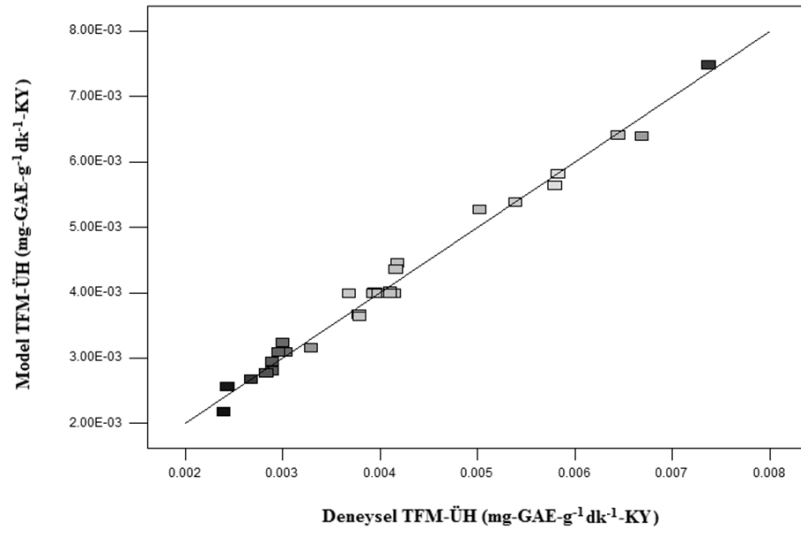
Tablo 4.10: UDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

Bağımlı Değişkenler	SD.	R ²	R ² _a	R ² _t	CV	AP
TFM (mg-GAEg ⁻¹ -YK)	0.41	0.958	0.919	0.74	4	23.68
TFM-ÜH (mg-GAEg ⁻¹ sn ⁻¹ -YK)	2.09x10 ⁻⁴	0.986	0.974	0.907	5.1	35.87

Şekil 4.13 ve 4.14 sırasıyla TFM ve TFM-ÜH açısından tahmin edilebilen verilerle (model) deneysel veriler arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Elde edilen lineer korelasyon katsayısı TFM için 0.9864, TFM-ÜH için ise 0.9579'dur.



Şekil 4.13: Greyfurt kabuklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM ile deneysel TFM arasındaki korelasyon.



Şekil 4.14: Greyfurt kabuklarına uygulanan UDE yöntem ile elde edilen model TFM-ÜH ile deneysel TFM-ÜH arasındaki korelasyon.

TFM için model eşitliği Denklem (4.2) ile gösterilmektedir.

$$\begin{aligned} \text{TFM} = & 6.012 + 0.046A + 0.302B - 0.026C + 1.024E - 3AB \\ & - 1.063E - 3AC - 3.842E - 5AD + 2.314E - 3BC - 2.476E - 3BD \\ & - 1.254E - 3CD + 2.299E - 4A^2 - 8.699E - 3B^2 - 2.009E - 4C^2 + 2.382E - 3D^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

TFM için verilen model denkleminde de en önemli parametrenin katı/sıvı oranı olduğu görülmektedir.

TFM-ÜH için verilen model eşitliği ise Denklem (4.3) gibi ifade edilmektedir.

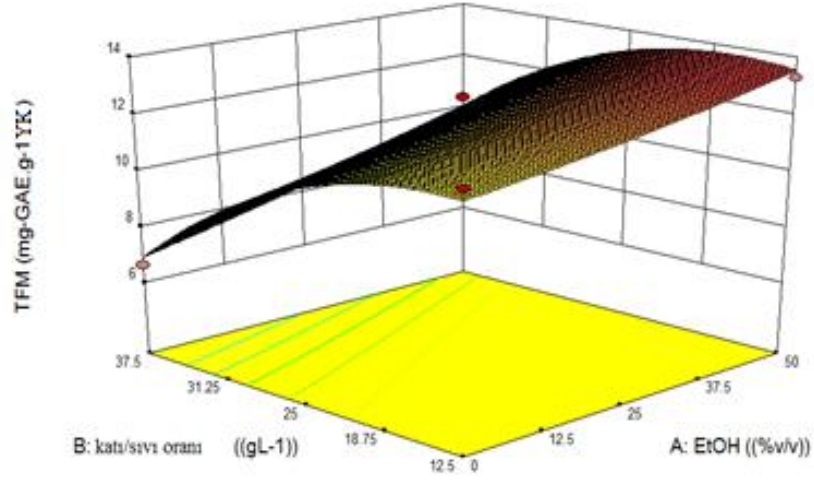
$$\begin{aligned} \text{TFM-ÜH} = & 0.0105 + 3.713E - 5A + 6.885E - 5B - 2.667E - 4C + 1.293E - 5D \\ & + 4.421E - 7AB - 7.732E - 7AC - 2.880E - 8AD + 1.771E - 6BD \\ & - 7.450E - 7CD + 7.272E - 8A^2 - 3.272E - 6B^2 + 1.984E - 6C^2 + 8.476E - 7D^2 \end{aligned} \quad (4.3)$$

TFM-ÜH modelinde de yine en etkili parametrenin zaman olduğu görülmektedir.

4.2.2.2. UDE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Kabuk Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları

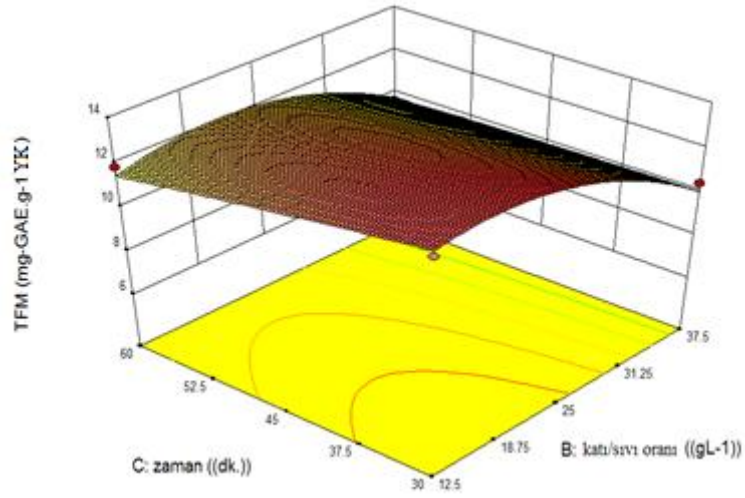
Design Expert-9 programının optimizasyon araç çubuğu kullanılarak, TFM ve TFM-ÜH maksimize yapıldı. Optimal ekstraksiyon koşulları, % 50 EtOH, ekstraksiyon zamanı 30 dk., ekstraksiyon sıcaklığı 50 °C ve katı/sıvı oranı 16 g L⁻¹ olarak belirlendi. Bu optimal koşullarda, TFM 13.706 (mg-GAE g⁻¹-YK) ve TFM-ÜH 0.007 (mg-GAEg⁻¹sn⁻¹-YK) olarak hesaplandı.

TFM ve TFM-ÜH üzerine en etkili bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren üç boyutlu (3-D) grafikler Şekil 4.15 - 4.17 ile gösterilmektedir.



Şekil 4.15: Katı/sıvı oranı ve EtOH (%v/v) konsantrasyonunun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Ekstraksiyon zamanı 30 dk., ekstraksiyon sıcaklığı 50 °C).

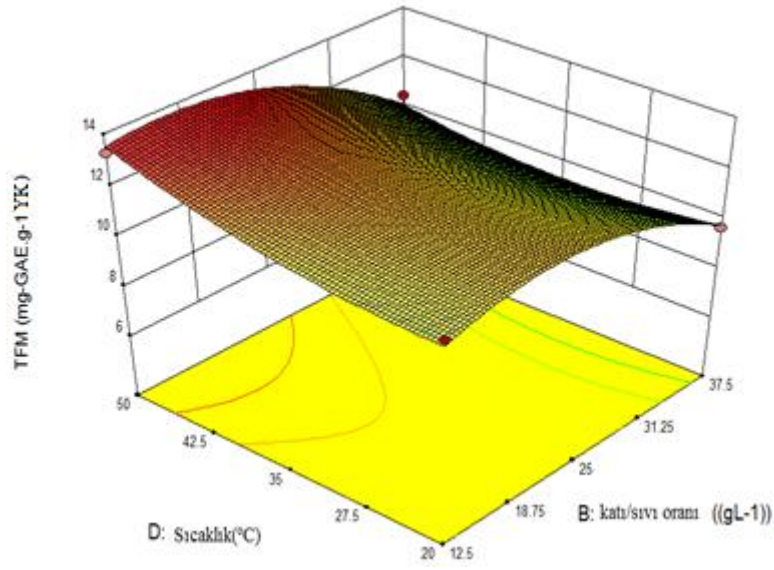
TFM'nin katı/sıvı oranının belirli bir değere (16 g.L^{-1}) kadar arttığı, ardından azalmaya başladığı Şekil 4.13'ten görülmektedir. Yüksek çözücü hacmi kütle transferini artırmaya neden olup, TFM miktarını belli bir noktaya kadar artırmaktadır. EtOH yüzdesi arttığında, TFM miktarı artmaktadır. Böylece, kabukların yapısındaki TFM'nin ekstraksiyonu için EtOH ve H_2O ikili etkisinin etkin olduğu görülmektedir.



Şekil 4.16: Zaman ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (% 50 EtOH, ekstraksiyon sıcaklığı 50 °C).

Şekil 4.16 incelendiğinde, TFM'nin 30 dakikada yüksek bir değere ulaştığı, ardından yavaş yavaş azaldığı görülmektedir. Bu durum difüzyon hızının 30 dakika boyunca arttığı, daha sonra konsantrasyonun doymuş seviyeye geldiği ve böylece difüzyon hızının sabit kalması ile açıklanabilir.

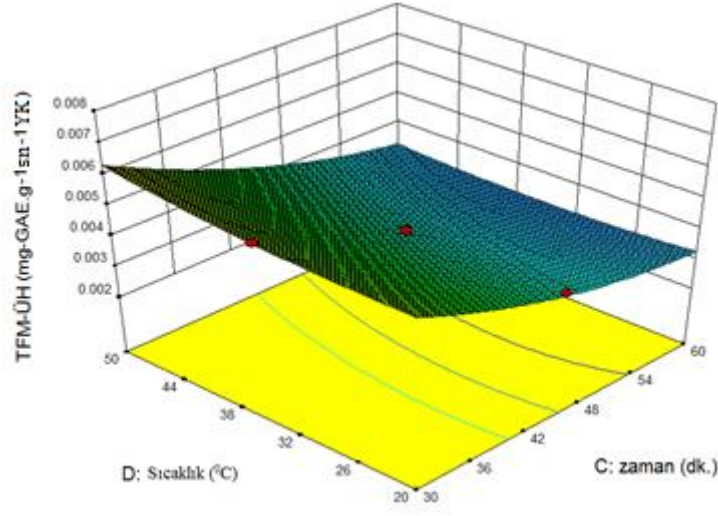
Şekil 4.17 incelendiğinde; sıcaklığın 27 °C'den 30 °C'ye kadar artmasıyla TFM yavaş artmıştır. Sıcaklığın 30°'den 50 °C'ye kadar artması sürecinde TFM daha hızlı artmıştır. Yüksek sıcaklık kütle transferini arttırmakta ve bu durum bitki matriksinin aktif bölgelerindeki hedef bileşenin desorpsiyonuyla ekstraksiyon performansının artmasına neden olmaktadır [160].



Şekil 4.17: Sıcaklık ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (% 50 EtOH, ekstraksiyon zamanı 30 dk).

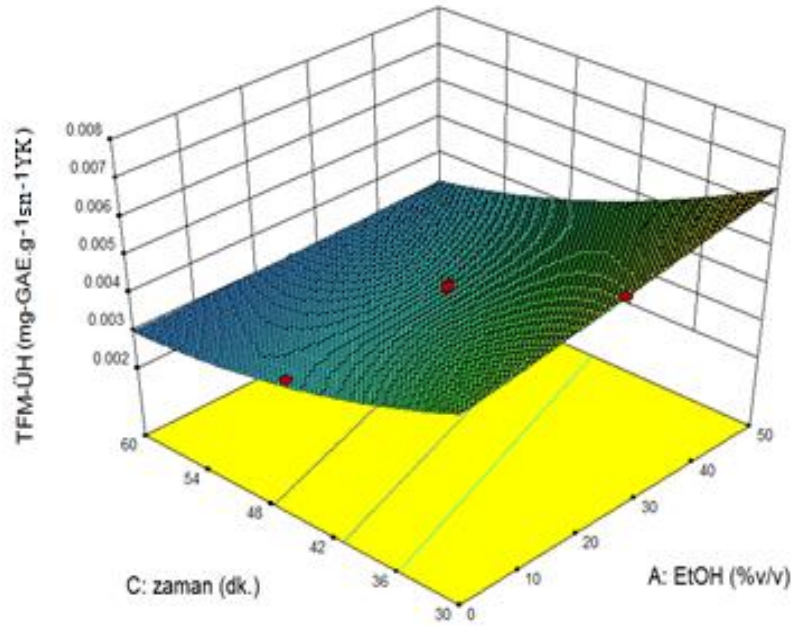
Beklenildiği gibi, TFM-ÜH TFM ile orantılı olarak değişmektedir. TFM'yi etkileyen bütün faktörler TFM-ÜH da doğal olarak etkilemektedir. TFM-ÜH'nı etkileyen önemli parametreler içeren 3-D grafikleri Şekil 4.18 ve 4.19 ile gösterilmektedir.

Şekil 4.18'de görüldüğü üzere 20 °C'den 50°C ye kadar sıcaklığın yükselmesiyle kütle transferi arttığından TFM-ÜH da artmaktadır. Optimal ekstraksiyon zamanı 30 dk. olarak belirlendiğinden bu dakikadan sonra TFM-ÜH azalmaktadır. Bu olay, difüzyon hızına bağlanmaktadır. Önce, difüzyon hızı artmakta daha sonra çözücü ve çözünen madde doygunluk seviyesine gelip, TFM miktarı azalmaktadır. Bunun sonucu olarak TFM-ÜH'da 30 dakikadan sonra azalma gözlenmektedir.



Şekil 4.18: Sıcaklık ve zamanın TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (% 50 EtOH, katı/sıvı oranı 16 g L⁻¹).

Şekil 4.19 ise zaman ve EtOH yüzdesinin TFM-ÜH üzerine etkisi gösterilmektedir. EtOH yüzdesi arttığında, TFM miktarı artmaktadır bunun sonucu olarak TFM-ÜH artmaktadır.



Şekil 4.19: EtOH ve zamanın TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı 16 g L⁻¹, sıcaklık 37°C).

4.3. MİKRODALGA DESTEKLI EKSTRAKSİYON DENEYLERİ

4.3.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Yöntemi

4.3.1.1. Regresyon Model Denkleminin Geliştirilmesi

Tablo 4.11 yüzey merkezli merkezi kompozit tasarımına göre bağımlı değişkenler üzerine faktörlerin etkilerini göstermektedir.

Tablo 4.11: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler.

Deney No	Mikrodalga Güç Yoğunluğu (kW ^{L⁻¹})	Katı/Sıvı (g.L ⁻¹)	Ekstaksiyon Süresi (sn)	TFM (mg-GAE.g ⁻¹ -KY)	TFM-ÜH (mg-GAEg.sn ⁻¹ -KY)
5	0.2	8	30	8.484	0.283
2	1.4	8	30	14.379	0.479
4	0.2	20	30	4.219	0.141
8	1.4	20	30	4.211	0.140
1	0.2	8	240	11.679	0.049
16	1.4	8	240	22.863	0.095
17	0.2	20	240	6.822	0.028
7	1.4	20	240	14.994	0.062
19	0.2	14	135	7.381	0.055
14	1.4	14	135	15.047	0.111
18	0.8	8	135	20.214	0.150
11	0.8	20	135	10.066	0.075
3	0.8	14	30	8.005	0.267
10	0.8	14	240	11.996	0.050
15	0.8	14	135	11.850	0.088
12	0.8	14	135	13.057	0.097
20	0.8	14	135	12.757	0.094
9	0.8	14	135	12.854	0.095
13	0.8	14	135	13.143	0.097
6	0.8	14	135	13.579	0.101

TFM ve TFM-ÜH için regresyon uygulanıp, ikinci dereceden model tavsiye edilmiştir. Modelin geçerliliği ise her bir cevap için ANOVA analizi kullanılarak doğrulanmıştır. Tablo 4.12 MDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen TFM'ye ait ANOVA analizini, Tablo 4.13 ise TFM-ÜH'na ait ANOVA analizini göstermektedir.

Tablo 4.12: MDE yöntemi kullanılarak greyluft yapraklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.

TFM Kaynak	Karelerin Toplamı	df	Ortalama Karesi	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	406.79	9	45.20	44.84	< 0.0001	önemli
A-Mikrodalga güç yoğunluğu	108.31	1	108.31	107.46	< 0.0001	
B-katı/sıvı oranı	139.17	1	139.17	138.08	< 0.0001	
C-Süre	84.43	1	84.43	83.76	< 0.0001	
AB	9.94	1	9.94	9.86	0.0105	
AC	22.68	1	22.68	22.50	0.0008	
BC	0.36	1	0.36	0.36	0.5609	
A ²	6.26	1	6.46	6.41	0.0298	
B ²	15.75	1	15.75	15.62	0.0027	
C ²	20.73	1	20.73	20.57	0.0011	
Kalıntı	10.08	10	1.01			
Doğrunun Uyumsuzluğu	8.41	5	1.68	5.05	0.0500	Önemli
Saf Hata	1.67	5	0.33			

TFM için ANOVA analizinde, modelin F-değeri oldukça büyük, p-değeri ise 0.0001'den küçük olması modelin önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca, kullanılan parametrelerin hepsinin önemli olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Bununla beraber, ikili etkileşimlerden mikrodalga güç yoğunluğu-katı/sıvı oranının ikili etkileşimi, mikrodalga güç yoğunluk-zaman ikili etkileşiminin ve üç faktörün de kareli etkileşiminin model üzerinde önemli olduğu görülmektedir (Tablo 4.12).

Tablo 4.13: MDE yöntemi kullanılarak greyluft yapraklarından elde edilen TFM-ÜH için ANOVA analizi.

TFM-ÜH Kaynak	Karelerin Toplamı	df	Ortalama Karesi	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	0.20	6	0.034	52.18	< 0.0001	önemli
A-MGY	0.011	1	0.011	17.28	0.0011	
B-katı/sıvı oranı	0.037	1	0.037	57.62	< 0.0001	
C-Süre	0.11	1	0.11	163.09	< 0.0001	
AB	5.477E-3	1	5.477E-3	8.50	0.0120	
BC	0.023	1	0.023	35.55	< 0.0001	
C ²	0.020	1	0.020	31.01	< 0.0001	

Tablo 4.13 (devam):

Kalıntı	8.376E-3	13	6.443E-004			
Doğrunun Uyumsuzluğu	8.285E-3	5	1.036E-	56.65	0.0002	önemli
Saf Hata	9.141E-5	5	1.828E-5			

TFM-ÜH için ANOVA analizinde, modelin F-değerinin büyük olması (52.18), p-değerinin ise 0.0001'den küçük olması, modelin önemli olduğunun göstergesidir. Ayrıca, bağımsız parametrelerin yine hepsinin önemli olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). Bununla birlikte, ikili etkileşimlerden mikrodalga güç yoğunluğu-zamanın iç etkileşiminin ve ekstraksiyon zamanının karesinin de etkili parametreler olduğu Tablo 4.13'te görülmektedir. Tablo 4.14 ise TFM ve TFM-ÜH için, istatistiksel belirteçleri göstermektedir.

Tablo 4.14: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

Bağımlı Değişkenler	SD.	R ²	R ² _a	R ² _t	CV	AP
TFM (mg-GAEg ⁻¹ -KY)	1.00	0.976	0.954	0.800	8.45	27.968
TFM-ÜH (mg-GAEg ⁻¹ sn ⁻¹ -KY)	0.025	0.960	0.942	0.743	19.85	28.71

Tablo 4.14 de hem TFM hem de TFM-ÜH için verilen istatistiksel belirteçlerden modelle deneysel verilerin oldukça uyumlu olduğu görülmektedir. TFM için verilen ikinci dereceden eşitlik Denklem (4.4) gibidir:

$$\begin{aligned} \text{TFM} = & 19.229 + 13.023A - 2.281B + 0.068C - 0.310AB \\ & + 0.027E-3AC + 3.389BC - 4.257A^2 + 0.066B^2 - 2.491E-4C^2 \end{aligned} \quad (4.4)$$

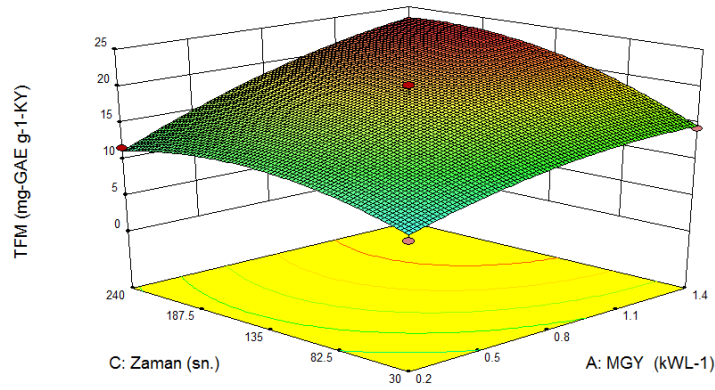
TFM denkleminde bakıldığında en etkili parametrenin mikrodalga güç yoğunluğu olduğu görülmektedir. TFM-ÜH için verilen ikinci dereceden eşitlik Denklem (4.5) gibidir:

$$\begin{aligned} \text{TFM-ÜH} = & 0.509 + 0.157A - 0.015B - 3.714E-3C - 7.268E-3AC \\ & - 7.268E-3AC + 8.494E-5BC + 5.734C^2 \\ & + 9.93165E-6xC^2 \end{aligned} \quad (4.5)$$

TFM-ÜH'nı en çok etkileyen parametre de yine mikro dalga güç yoğunluğudur.

4.3.1.2. MDE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Yaprak Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları

MDE yönteminde bağımlı değişkenler optimize edilirken, program tarafından TFM ve TFM-ÜH maksimize edildi. Çok amaçlı bağımsız değişkenler için MGY 1.4 kW L^{-1} , katı/sıvı oranı 8.00 g L^{-1} , ekstraksiyon süresi 218 sn olarak belirlendi. Bağımlı değişken olarak, TFM $23.555 \text{ (mg-GAE g}^{-1}\text{-KY)}$, TFM-ÜH ise $0.130 \text{ (mg-GAE g}^{-1}\text{sn}^{-1}\text{-KY)}$ olarak belirlendi. TFM ve TFM-ÜH üzerine en etkili bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren üç boyutlu (3-D) grafikler Şekil 4.20-4.21 ile gösterilmektedir.

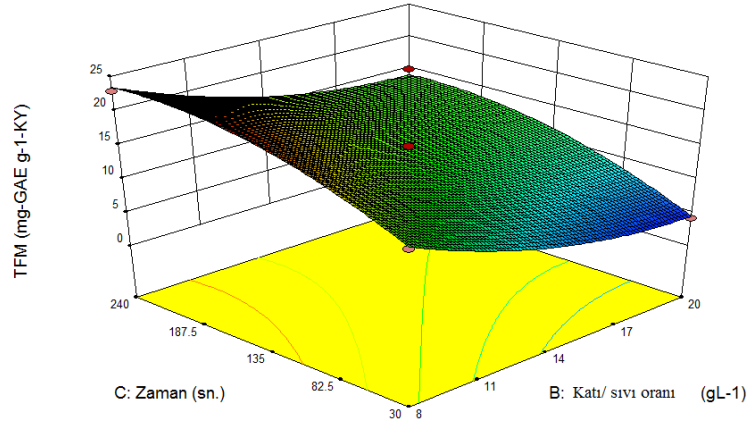


Şekil 4.20: Zaman ve mikrodalga güç yoğunluğu'nun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı: 8.00 g L^{-1}).

Şekil 4.20 incelendiğinde, mikrodalga güç yoğunluğunun artmasıyla, TFM'nin arttığı görülmektedir. Artan güç yoğunluğuyla ekstraksiyon sıcaklığı artmakta ve böylece ekstraksiyon hızı artmaktadır. Bu sonuçlar, Wang ve diğ [161], Xiao ve diğ [162] sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Wang ve diğ [161] yüksek mikrodalga gücünün ekstraksiyon sıcaklığını artırdığını ve hücre duvarını daha kolay kırdığını, biyoaktif maddenin daha rahat desorbe olduğunu ve çözücüye difüze olduğunu belirtmişlerdir. Mikrodalga güç yoğunluğunun artması, çözücü sıcaklığının artmasına neden olmaktadır. Düşük viskoziteye ve düşük yüzey gerilimine sahip olan sıcak çözücünün, çözünürlüğü de artmaktadır [163].

Ekstraksiyon zamanının TFM üzerine etkisi incelendiğinde, zamanın pozitif etkisi olduğu görülmektedir. Artan ekstraksiyon zamanıyla TFM'nin hızla arttığı, daha sonra

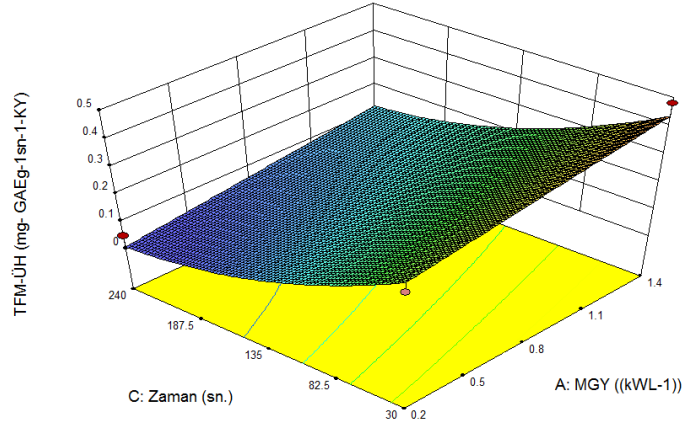
yaprakların mikrodalga ışınına fazla maruz kalmasıyla belli bir noktadan sonra değişmediği görülmektedir. Deneysel sonuçlar, Simşek ve diğ. [164], Pan ve diğ. [165], Xiao ve diğ. [162], Chen ve diğ. [166] bulduğu sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Chen ve diğ. [166] doğu mazısından (*Platycladus orientalis* L.) elde ettikleri ekstraktların flavonoid miktarlarının zamanla değişimini incelemişler, flavonoid miktarının 4 dakika boyunca arttığını, 4. dakikadan 10. dakikaya kadar ise önemli bir değişim olmadığını göstermişlerdir. Pan ve diğ. [165] ise çalışmalarında, yeşil çay yapraklarından elde ettikleri toplam fenol miktarlarını incelemişlerdir. Mikrodalga süresinin TFM üzerine etkisini incelediklerinde, benzer sonuçları gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.21: Zaman ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Mikrodalga güç yoğunluğu: 1.4kWL^{-1}).

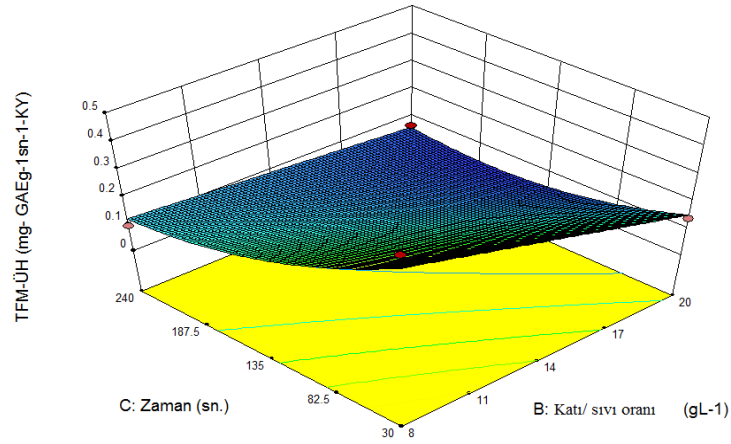
Şekil 4.21'de katı/sıvı oranının artmasıyla TFM'nin azaldığı görülmektedir. Mikrodalga ile yapılan birçok çalışmada, farklı katı/sıvı oranıyla çalışılmış; belli bir katı/sıvı oranından sonra TFM'nin maksimum noktaya geldiğini görülmüştür [166, 167].

TFM-ÜH'nı etkileyen önemli parametrelerin bulunduğu 3-D grafikleri Şekil 4.22-4.23 ile gösterilmektedir. Şekil 4.22'de, zamanla TFM-ÜH azalmakta iken, mikrodalga güç yoğunluğunun artmasıyla arttığı görülmektedir. Mikrodalga güç yoğunluğu ile TFM arttığından TFM-ÜH da artmaktadır.



Şekil 4.22: Zaman ve mikrodalga güç yoğunluğunun TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı:8 g.L⁻¹).

Katı/sıvı oranı azaldığında TFM'nin azaldığı daha önce belirtilmiştir. Benzer şekilde katı/sıvı oranı azaldığında, TFM-ÜH'nın da azaldığı Şekil 4.23'den görülmektedir.



Şekil 4.23: Zaman ve katı-sıvı oranının TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı: 8 gL⁻¹).

4.3.2. Greyfurt Kabuklarına Uygulanan Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

4.3.2.1. Regresyon Model Denkleminin Geliştirilmesi

Tablo 4.15, MDE yöntemi ile greyfurt kabuklarının ekstraksiyonunda yüzey merkezli kompozit tasarımına göre bağımlı değişkenler üzerine faktörlerin etkilerini göstermektedir.

Tablo 4.15: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen bağımlı değişkenler.

Deney No	Mikrodalga Güç Yoğunluğu (kW ^L ⁻¹)	Katı/Sıvı (g ^L ⁻¹)	Ekstaksiyon Süresi (sn)	TFM (mg-GAE.g ⁻¹ YK)	TFM-ÜH (mg-GAEg ⁻¹ sn ⁻¹ -YK)
5	1.2	10	60	11.384	0.190
2	2.8	10	60	16.345	0.272
4	1.2	25	60	12.865	0.214
8	2.8	25	60	11.025	0.184
1	1.2	10	120	18.956	0.158
16	2.8	10	120	22.564	0.188
17	1.2	25	120	17.890	0.149
7	2.8	25	120	12.689	0.106
19	1.2	17.5	90	11.056	0.123
14	2.8	17.5	90	11.986	0.133
18	2	10	90	14.658	0.163
11	2	25	90	11.997	0.133
3	2	17.5	60	12.664	0.211
10	2	17.5	120	16.965	0.141
15	2	17.5	90	12.625	0.140
12	2	17.5	90	11.841	0.132
20	2	17.5	90	12.246	0.136
9	2	17.5	90	12.118	0.135
13	2	17.5	90	12.564	0.140
6	2	17.5	90	12.456	0.138

Tablo 4.14 ve Tablo 4.15 sırasıyla TFM ve TFM-ÜH için ANOVA tablolarını göstermektedir.

Tablo 4.16: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.

TFM Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F Değeri	p-değeri Prob > F
Model	180.27	9	20.03	108.70	< 0.0001
A-MGY	0.60	1	0.60	3.28	0.1003
B-Kat/sıvı oran	30.42	1	30.42	165.08	< 0.0001
C-zaman	61.41	1	61.41	333.24	< 0.0001

Tablo 4.16 (devam):

AB	30.46	1	30.46	165.28	< 0.0001	
AC	2.78	1	2.78	15.07	0.0030	
BC	6.30	1	6.30	34.21	0.0002	
A ²	1.11	1	1.11	6.02	0.0340	
B ²	3.77	1	3.77	20.48	0.0011	
C ²	19.43	1	19.43	105.46	< 0.0001	
Kalıntı	1.84	10	0.18			
Doğrunun Uyumsuzluğu	1.40	5	0.28	3.13	0.1179	önemsiz
Saf Hata	0.45	5	0.089			

Tablo 4.16 incelendiğinde, greyfurt kabuklarına uygulanan MDE yönteminde TFM deneysel verilerine uygulanan modelin önemli olduğu anlaşılmaktadır. Zamanın en etkili parametre olduğu, bütün parametrelerin iç etkileşimlerinin ve karelerinin model üzerinde etkili olduğu görülmektedir ($p < 0.05$).

Tablo 4.17: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen TFM-ÜH için ANOVA analizi.

TFM-ÜH Kaynak	Karelerin Toplamı	df	Ortalama Karesi	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	0.030	9	3.295E-3	108.27	< 0.0001	önemli
A-MGY	2.408E-4	1	2.408E-4	7.91	0.0184	
B-Katı/sıvı oran	3.413E-3	1	3.413E-3	112.13	<0.0001	
C-zaman	0.011	1	0.011	356.05	< 0.0001	
AB	4.360E-3	1	4.360E-3	143.24	<0.0001	
AC	5.328E-4	1	5.328E-4	17.50	0.0019	
BC	9.238E-5	1	9.238E-5	3.04	0.1121	
A ²	1.485E-4	1	1.485E-4	4.88	0.0516	
B ²	4.451E-4	1	4.451E-4	14.63	0.0033	
C ²	4.591E-3	1	4.591E-3	150.86	<0.0001	
Kalıntı	3.044E-4	10	3.044E-5			
Doğrunun Uyumsuzluğu	2.493E-4	5	4.986E-5	4.53	0.0615	önemsiz
Saf Hata	5.506E-5	5	1.101E-5			

Tablo 4.17 incelendiğinde ise, greyfurt kabuklarına uygulanan MDE yönteminde, TFM-ÜH deneysel verilerine uygulanan modelin önemli olduğu anlaşılmaktadır. Burada yine ekstraksiyon süresi en önemli parametre olarak gözlenmiştir. Bunu katı/sıvı oranı ve mikrodalga güç yoğunluğu takip etmektedir ($p < 0.005$). İç etkileşimli parametrelerden ise mikrodalga güç yoğunluğu-katı/sıvı oranı, mikrodalga güç yoğunluğu-zaman, kareli etkileşimlerden ise katı/sıvı oranının karesi ve zamanın kareleri model üzerine önemli olduğu belirtilmiştir.

Tablo 4.18: MDE yöntemi kullanılarak greyfurt kabuklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

Bağımlı Değişkenler	SD.	R ²	R ² _a	R ² _t	CV	AP
TFM (mg-GAEg ⁻¹ -YK)	0.43	0.99	0.981	0.896	3.1	36.79
TFM-ÜH(mg-GAEg ⁻¹ .sn ⁻¹ -YK)	0.01	0.99	0.981	0.83	3.5	42.5

Tablo 4.18'de hem TFM hem de TFM-ÜH için verilen istatistiksel belirteçlerden modelle deneysel verilerin oldukça uyumlu olduğu görülmektedir.

TFM için verilen ikinci dereceden eşitlik Denklem (4.6) ile ifade edilmektedir:

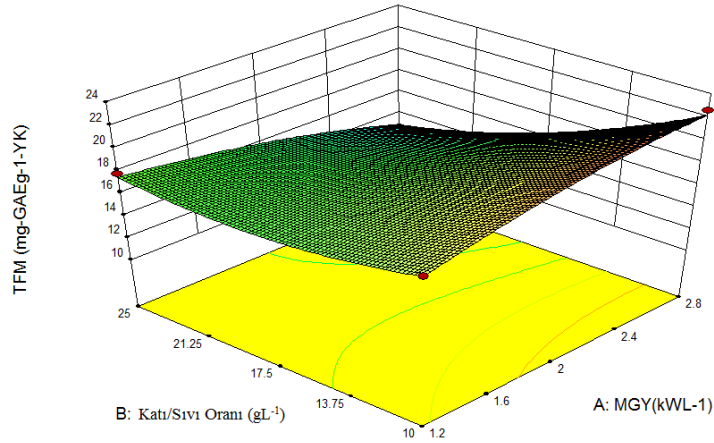
$$\begin{aligned} \text{TFM} = & 12.586 + 12.177A + 0.044B - 0.331C - 0.325AB \\ & - 0.025AC - 3.945E - 3BC - 0.992A^2 + 0.021B^2 + 2.954E - 3C^2 \end{aligned} \quad (4.6)$$

TFM-ÜH için verilen ikinci dereceden eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$\begin{aligned} \text{TFM-ÜH} = & 0.436 + 0.151A - 1.239E - 3B - 8.325E - 3C - 3.401E - 3AB \\ & - 3.400E - 4AC - 1.510E - 5BC - 0.0115A^2 + 2.262E - 4B^2 + 4.540E - 5C^2 \end{aligned} \quad (4.7)$$

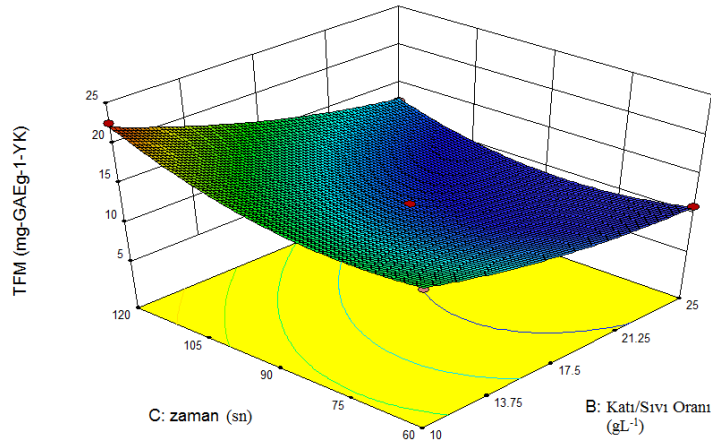
4.3.2.2. MDE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Kabuk Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları

Greyfurt kabuklarının MDE ile ekstraksiyonunda optimizasyon yapılırken, TFM ve TFM-ÜH maksimize edildi. Çok amaçlı bağımsız değişkenler için mikrodalga güç yoğunluğu 2.8 kWL⁻¹, katı/sıvı oranı 10 gL⁻¹, ekstraksiyon zamanı ise 120 sn. olarak belirlendi. Bağımlı değişken olarak, TFM için 22.160 (mg-GAE g⁻¹-YK), TFM-ÜH 0.191 (mg-GAEg⁻¹.sn⁻¹-YK) olarak belirlendi. TFM üzerine en etkili bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren üç boyutlu (3-D) grafikler Şekil 4.22-4.24'de gösterilmektedir.



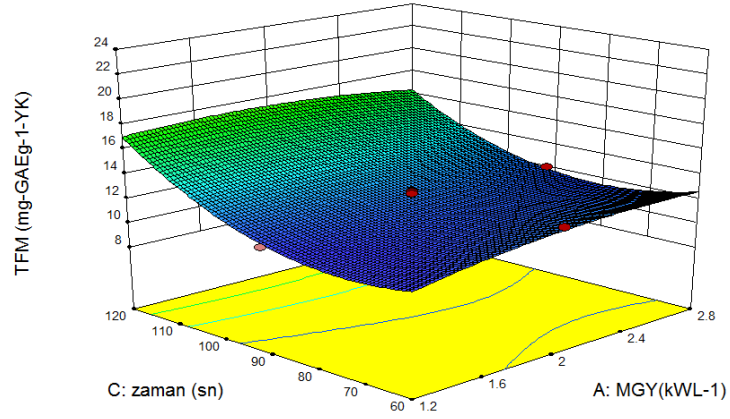
Şekil 4.24: Katı/sıvı oranı ve mikrodalga güç yoğunluğu'nun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (zaman=120 sn.).

Şekil 4.24'den mikrodalga güç yoğunluğu arttığında, TFM miktarının da arttığı görülmektedir. Artan güç yoğunluğuyla ekstraksiyon sıcaklığı artmakta ve bunun sonucu olarak ekstraksiyon hızı artmaktadır. Katı/sıvı oranı artarken, TFM'de çok fazla artış görülmemiştir.



Şekil 4.25: Zaman ve katı/sıvı oranının TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Mikrodalga güç yoğunluğu: 2.8 kWL⁻¹).

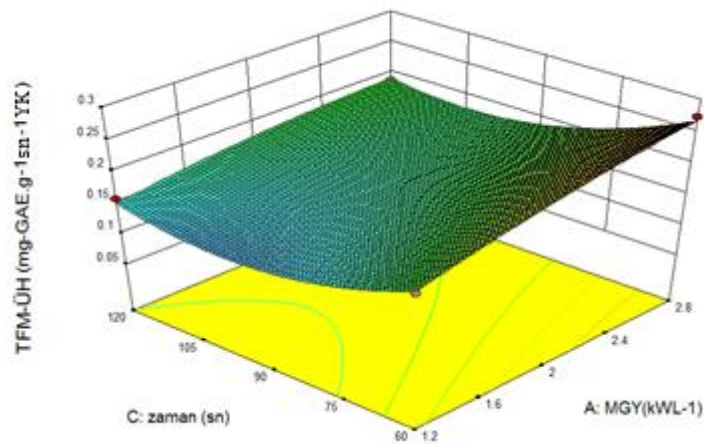
Şekil 4.25 incelendiğinde, ekstraksiyon süresince TFM artmakta, katı/sıvı oranı arttığında ise TFM'nin yavaşça azaldığı görülmektedir. Ekstraksiyon süresinin 60. saniyeden 120. saniyeye kadar artmasıyla TFM de artmıştır.



Şekil 4.26: Zaman ve mikrodalga güç yoğunluğunun TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (katı/sıvı oranı: 10 gL⁻¹).

Şekil 4.25'da da ekstraksiyon süresi arttığında TFM'nin arttığı görülmekte; bu durum ekstraksiyon işleminin hala devam ettiğini göstermektedir. Aynı şekilde mikrodalga güç yoğunluğunun artmasıyla da TFM artmaktadır. Mikrodalga ışınlaması ekstraksiyon işlemini hızlandırmaktadır. Böylece, mikrodalga güç yoğunluğu arttığında bitki matriksinden fenolik bileşenler kolaylıkla ekstrakte edilmektedir [168].

TFM-ÜH için de en önemli faktörlerin ikili etkileşimini gösteren 3-D grafiği Şekil 4.27'de gösterilmektedir.



Şekil 4.27: Zaman ve mikrodalga güç yoğunluğunun TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Katı/sıvı oranı:10).

Ekstraksiyon süresi arttığında, TFM-ÜH yavaş bir azalma göstermektedir. Ancak mikrodalga güç yoğunluğunun artmasıyla TFM-ÜH artmaktadır.

4.4. SÜPERKRİTİK AKIŞKAN EKSTRAKSİYON DENEYLERİ

4.4.1. Greyfurt Yapraklarına Uygulanan Süperkritik Akışkan Ekstraksiyon Yöntemi

4.4.1.1. Regresyon Model Denkleminin Geliştirilmesi

Tablo 4.19, Greyfurt yapraklarının SAE ile ekstraksiyonunda Box-Behnken tasarımına göre bağımsız faktörlerin bağımlı değişkenler üzerine etkileri ifade edilmiştir.

Tablo 4.19: SAE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler.

Deney No	Basınç (Bar)	Sıcaklık (°C)	EtOH (%v/v)	TFM (mg-GAE.g ⁻¹ -KY)	TFM-ÜH (mg-GAEg ⁻¹ sn ⁻¹ KY)x10 ⁵
1	100	32	60	0.309	8.581
2	300	32	60	0.133	3.692
3	100	52	60	0.205	5.700
4	300	52	60	0.055	1.528
5	100	42	20	1.293	35.928
6	300	42	20	0.128	3.555
7	100	42	100	1.551	43.081
8	300	42	100	0.674	18.715
9	200	32	20	0.467	12.975
10	200	52	20	0.072	2.000
11	200	32	30	1.222	33.937
12	300	52	50	0.702	19.513
13	200	42	40	0.367	10.182
14	200	42	40	0.345	9.583
15	200	42	40	0.382	10.611
16	200	42	40	0.359	9.981
17	200	42	40	0.373	10.347

Tablo 4.20 ve 4.21 sırasıyla TFM ve TFM-ÜH için sırasıyla ANOVA tablolarını göstermektedir.

Tablo 4.20: SAE yöntemi kullanılarak greylurt yapraklarından elde edilen TFM için ANOVA analizi.

TFM Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	2.72	9	0.3	4.42	0.0315	önemli
A-Basınç (Bar)	0.7	1	0.7	10.26	0.015	
B-Sıcaklık (°C)	0.15	1	0.15	2.2	0.1819	
C-EtOH (%v/v)	0.6	1	0.6	8.76	0.0211	
AB	1.66E-04	1	1.66E-04	2.43E-03	0.962	
AC	0.021	1	0.021	0.3	0.5986	
BC	3.85E-03	1	3.85E-03	0.056	0.8192	
A ²	0.012	1	0.012	0.17	0.6895	
B ²	0.25	1	0.25	3.63	0.0986	
C ²	1.02	1	1.02	15	0.0061	
Kalıntı	0.48	7	0.068			
Doğrunun Uyumsuzluğu	0.48	3	0.16	816.46	< 0.0001	önemli
Saf Hata	7.80E-04	4	1.95E-04			

Tablo 4.20 incelendiğinde, süperkritik akışkan ekstraksiyonun modeli üzerinde TFM bağımlı değişken için önemli bağımsız parametreler; sırası ile basınç, etanol ve etanolün kareli etkileşimidir. Bunun dışında, iç etkileşimlerin ve diğer parametrelerin ($p>0.05$) model üzerinde önemli olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.21: SAE yöntemi kullanılarak greylurt yapraklarından elde edilen TFM-ÜH için ANOVA analizi.

TFM-ÜH Kaynak	Karelerin Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Karesi	F Değeri	p-değeri Prob > F	
Model	2.097E-7	9	2.329E-8	4.42	0.0315	önemli
A-Basınç (Bar)	5.412E-8	1	5.412E-8	10.26	0.0150	
B-Sıcaklık (°C)	1.159E-8	1	1.159E-8	2.20	0.1819	
C-EtOH (%v/v)	4.619E-8	1	4.619E-8	8.76	0.0211	
AB	1.284E-11	1	1.284E-11	2.434E-3	0.9620	
AC	1.603E-9	1	1.603E-9	0.30	0.5986	
BC	2.972E-10	1	2.972E-10	0.056	0.8192	
A ²	9.148E-10	1	9.148E-10	0.17	0.6895	
B ²	1.912E-8	1	1.912E-8	3.63	0.0986	
C ²	7.908E-8	1	7.908E-8	15.00	0.0061	
Kalıntı	3.692E-8	7	5.274E-9			
Doğrunun Uyumsuzluğu	3.686E-8	3	1.229E-8	816.46	< 0.0001	önemli
Saf Hata	6.019E-11	4	1.505E-11			

Tablo 4.21 incelendiğinde, greyfurt yapraklarına uygulanan SAE yönteminde TFM-ÜH deneysel verilerine uygulanan modelin önemli olduğu görülmektedir. Bununla beraber, faktörlerden basıncın en etkili parametre olduğu, bunu etanol yüzdesi takip ettiği görülmektedir ($p < 0.05$). Kareli etkileşimlerden ise etanol konsantrasyonunun karesinin model üzerinde önemli olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 4.22: SAE yöntemi kullanılarak greyfurt yapraklarından elde edilen bağımlı değişkenler için istatistiksel belirteçler.

Bağımlı Değişkenler	SD.	R ²	R ² _a	R ² _t	CV	AP
TFM (mg-GAEg ⁻¹ -KY)	0.26	0.85	0.658	-1.392	51.5	8.3
TFM-ÜH(mg-GAEg ⁻¹ .sn ⁻¹ -KY)	7E-05	0.85	0.658	-1.392	51.5	8.3

Tablo 4.22'de istatistiksel belirteçlere bakıldığında, tahmin edilen korelasyon katsayısının negatif çıkması ve varyans katsayısının da 10'dan büyük çıkması modelden hesaplanan değerlerle deneysel değerlerin uyum sağlamadığı görülmektedir.

TFM için verilen ikinci dereceden eşitlik Denklem (4.8) ile ifade edilmektedir:

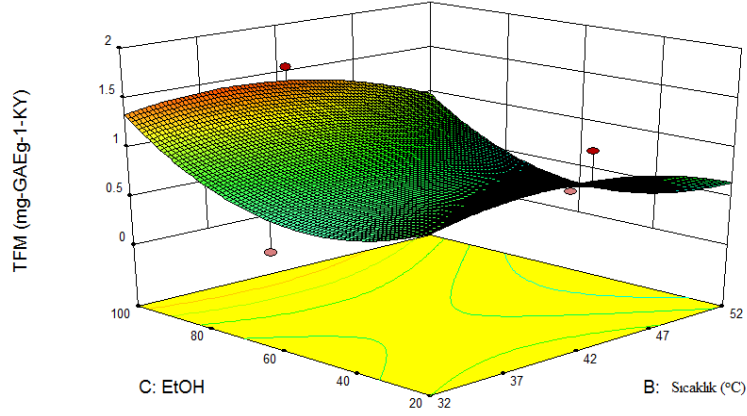
$$\begin{aligned} \text{TFM} = & -1.760 - 6.453\text{E}-3\text{A} + 0.195\text{B} - 0.031\text{C} + 6.449\text{E}-6\text{AB} \\ & + 1.801\text{E}-5\text{AC} - 7.758\text{BC} + 5.306\text{E}-6\text{A}^2 - 2.426\text{E}-3\text{B}^2 + 3.084\text{E}-4\text{C}^2 \end{aligned} \quad (4.8)$$

TFM-ÜH için verilen ikinci dereceden eşitlik Denklem (4.9) gibidir:

$$\begin{aligned} \text{TFM-ÜH} = & -4.889\text{E}-4 - 1.788\text{E}-6\text{A} + 5.374\text{E}-5\text{B} - 8.475\text{E}-6\text{C} + 1.791\text{E}-9\text{AB} \\ & + 5.004\text{E}-8\text{AC} - 2.155\text{E}-9\text{BC} + 1.474\text{E}-9\text{A}^2 + 6.739\text{E}-7\text{B}^2 + 8.566\text{E}-8\text{C}^2 \end{aligned} \quad (4.9)$$

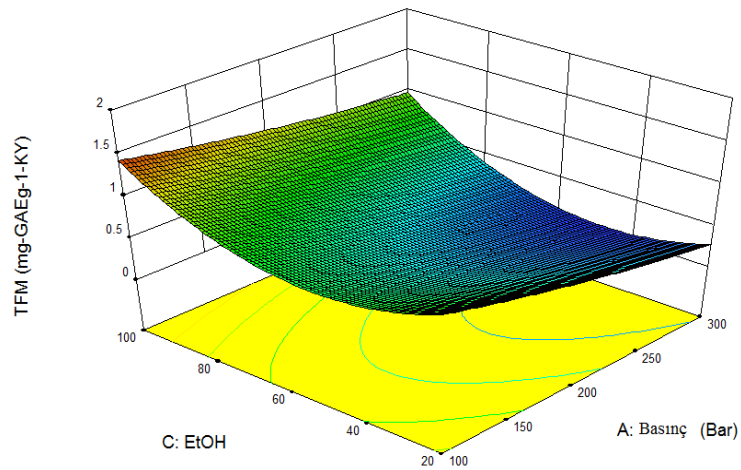
4.4.1.2. SAE Yönteminde Kullanılan Faktörlerin Yaprak Ekstraktı Üzerine Etkileri ve Deneysel Optimizasyon Sonuçları

TFM ve TFM-ÜH maksimize edilerek optimizasyon işlemi yapıldı. Bağımsız değişkenlerden basınç 100 Bar, sıcaklık 40 °C, EtOH konsantrasyonu %100 olarak belirlendi. Bağımlı değişkenlerden biri olan TFM için 1.440 (mg-GAE g⁻¹-KY), diğer bağımlı değişken olan TFM-ÜH için ise 0.0002 (mg-GAEg⁻¹.sn⁻¹-KY) olarak belirlendi. TFM üzerine en etkili bağımsız değişkenlerin etkilerini gösteren üç boyutlu (3-D) grafikler Şekiller 4.26-4.28 ile gösterilmektedir.



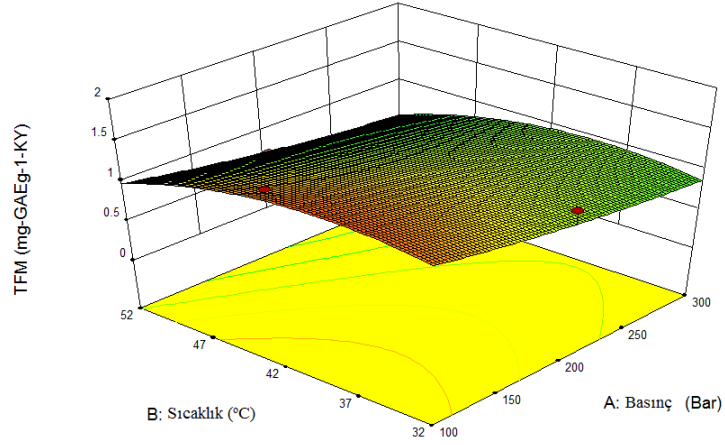
Şekil 4.28: EtOH ve sıcaklığın TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Basınç: 100 bar).

Şekil 4.28'den sıcaklığın 32 °C'den 40 °C'ye yükselmesiyle TFM'nin arttığı ardından TFM'nin düştüğü görülmektedir. Yardımcı çözücü etanol yüzdesinin artması ile de ekstraksiyonun arttırdığı görülmektedir. Bunun nedeni SAE yönteminde EtOH viskozitesinin H₂O göre daha düşük olması olarak açıklanabilmektedir. Benzer şekilde, Park ve diğ. [169] SAE yöntemini kullanarak, yeşil çaydan kafeini ekstrakte etmişlerdir. Çalışmalarında, yardımcı çözücü olarak H₂O ve EtOH kullanmışlar, yardımcı çözücü olarak EtOH kullandıkları zaman daha yüksek miktarda ekstrakt elde etmişlerdir.



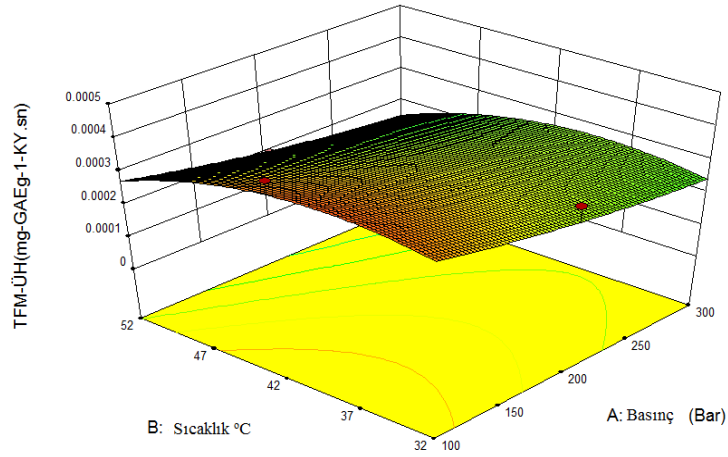
Şekil 4.29: EtOH ve basıncın TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (Sıcaklık: 40 °C).

Şekil 4.29, TFM'nin basınç artışı ile çok az bir şekilde azaldığını, EtOH yüzdesi ile ise arttığını göstermektedir. Kopcak ve diğ. [170], SAE yöntemi kullanarak, basınç ve yardımcı çözücü olarak EtOH'un kafeinin çözünürlüğüne etkisini incelemişler, ve yüksek basınçlarda, EtOH etkisinin kafeinin çözünürlüğünü düşürdüğünü görmüşlerdir.



Şekil 4.30: Sıcaklık ve basıncın TFM üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (EtOH %100 v/v).

Söz konusu sistem için SAE yönteminde sıcaklığın artması ekstraksiyon hızını arttırmaktadır. Basıncın artmasıyla fenolik bileşenler haricindeki maddelerin de ekstrakte edilmesinden dolayı TFM'de hafif bir azalma fark edilmiştir.



Şekil 4.31: Sıcaklık ve basıncın TFM-ÜH üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği (EtOH %100).

TFM-ÜH için de en önemli faktörlerin ikili etkileşimini gösteren 3-D grafiği Şekil 4.31'de gösterilmektedir. Sıcaklık 40 °C'ye kadar arttığında, TFM-ÜH artmakta ve daha sonraki sıcaklık değerlerinde azalmaktadır. Basıncın artmasıyla TFM-ÜH azalmaktadır.

SAE yönteminden elde edilen greyfurt yaprak ekstraktlarının TFM ve TFM-ÜH içeriği diğer yöntemlere göre oldukça düşük çıkmıştır. Dolayısıyla, kabuklara uygulanmamıştır.

4.5. OPTİMİZASYON KOŞULLARINDAKİ FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNDEN ELDE EDİLEN NARINGİN MİKTARI VE ANTIOKSIDAN AKTİVİTELERİ

Greyfurt kabuk ve yapraklarına optimum koşullarda uygulanan ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktların naringin miktarı ve farklı analiz yöntemleriyle (DPPH, ABTS, CUPRAC) elde edilen antioksidan aktiviteleri Tablo 4.23'te verilmiştir.

Tablo 4.23: Optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktların naringin miktarı ve antioksidan aktiviteleri.

Ekstraksiyon Yöntemi	Naringin Mik..	ABTS	DPPH	CUPRAC
	(mg-NMg ⁻¹ -KY) (mg-NMg ⁻¹ -YK)	(mg-TEAK-g ⁻¹ -KY) (mg-TEAK-g ⁻¹ -YK)	(mg-TEAK-g ⁻¹ -KY) (mg-TEAK-g ⁻¹ -YK)	(mg-TEAK-g ⁻¹ -KY) (mg-TEAK-g ⁻¹ -YK)
Soxhlet-KY	33.780	2.800	2.250	3.250
UDE-KY	117.08	5.500	3.250	5.350
UDE-YK	51.250	3.256	2.240	4.930
MDE-KY	18.800	2.450	2.050	2.780
MDE-YK	14.620	2.100	1.700	2.500
SME-KY	0.032	0.008	0.018	0.048
SAE-KY	0.644	0.136	0.082	0.142

KY:kuru yaprak, YK:yaş kabuk

Tablo 4.24: Optimum ekstraksiyon koşullarında tüketilen elektrik enerjisine karşılık gelen TFM.

Ekstraksiyon Yöntemi	Elektrik Enerjisi Tüketimi (kW-h)	TFM (mg-GAEg ⁻¹ KY) TFM (mg-GAEg ⁻¹ -YK)
Soxhlet-Kuru Yaprak	2.614	15.945
Soxhlet-Yaş Kabuk	2.614	11.457
UDE-Kuru Yaprak	0.245	28.986
UDE- Yaş Kabuk	0.247	13.706
MDE-Kuru Yaprak	0.033	23.133
MDE- Yaş Kabuk	0.022	22.160
SMDE-Kuru Yaprak	0.033	0.464
SAE-Kuru Yaprak	0.540	1.440

Tablo 4.23 incelendiğinde, naringin değerleri arttığında antioksidan aktivitelerinin de arttığı görülmektedir. Bunun yanında, en çok naringin miktarı UDE yöntemi ve kuru yaprak (117.08 mg-NMg⁻¹-KY) kullanıldığı zaman elde edilmiştir. Tablo 4.22'deki kuru yapraktaki TFM dikkate alındığında, UDE ve MDE yöntemlerinde veriler birbirlerine oldukça yakındır. UDE yönteminde MDE yöntemine göre yapraklardan 6 kat daha fazla naringin elde edilmiştir. Greyfurt ile ilgili araştırmalara bakıldığında; Rouseff ve diğ. [171] farklı greyfurt cinslerine ait meyve suyundaki naringin miktarlarını incelemiştir. İnceledikleri farklı cinslerdeki en fazla naringin miktarlarının sırasıyla Canned, Duncan, Foster, Marsh, Ruby Red, Star Ruby türleri olarak bulup; içeriğinin 73-419 ppm arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda tespit edilen naringin

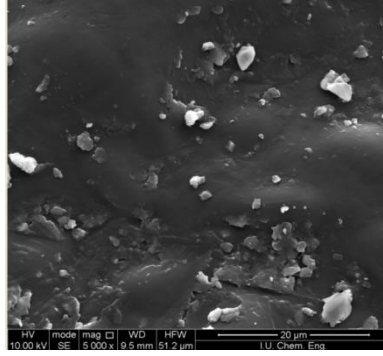
konsantrasyonu ise yapılan analizler sonucunda 80-640 ppm değişmektedir. Yu ve diğ. [172] SAE yöntemini kullanarak greyfurt tohumundan naringini ekstrakte etmişlerdir. Ekstraksiyon parametreleri olarak sıcaklık, zaman, basınç ve etanol konsantrasyonunu seçip, Box-Behnken deneysel tasarımı kullanmışlardır. Çalışmalarında en yüksek naringin miktarını 41.4 MPa basınçta, 50 °C ekstraksiyon sıcaklığında ve % 20 etanol konsantrasyonunda 0.2 mgg⁻¹-tohum olarak bulmuşlardır. Hayat ve diğ. [173] mikrodalga ekstraksiyon yöntemiyle mandalina kabuklarından fenolik asitleri ekstrakte etmişlerdir. Bağımsız parametre olarak, mikrodalga gücü, ekstraksiyon zamanı, sıvı/katı oranı ve metanol konsantrasyonunu seçmişlerdir. Box-Behnken deney tasarımı kullanmışlardır. Optimum deney şartlarını 152 W, ekstraksiyon zamanını 49 sn., sıvı/katı oranını 16, metanol konsantrasyonunu % 66 olarak belirlemişlerdir. Bu koşullarda fenolik asit verimini 1145µg-GAE-g⁻¹ kuru ağırlık olarak bulmuşlardır. Şahin (2015) [174] ise *Citrus* türlerinden mandalina yaprağındaki antioksidan aktivite ve fenolik madde miktarlarını SMDE yöntemi kullanarak araştırmıştır. Deneysel tasarım uygulayarak, optimum koşulları 53.15 sn., 339 W ve 2.5 g kuru yaprak olarak bulmuştur. Bu koşullarda en yüksek TFM 0.8610 mg-GAEG⁻¹-KY olarak elde etmiştir. Ayrıca; mandalina yapraklarındaki antioksidan aktivitelerini DPPH, CUPRAC ve ABTS yöntemleri kullanarak belirlemiştir. En yüksek antioksidan aktivite sonuçlarını, CUPRAC yöntemi kullandığında (1.1539±0.39 mg-TEAK-g⁻¹-KY) elde etmiştir. Tablo 4.21'den SMDE yöntemiyle elde edilen deneysel sonuçların, Şahin'in sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir. Ayrıca, CUPRAC yönteminin diğer antioksidan yöntemlerine göre daha büyük çıkması, Şahin'in çalışması ile tutarlılık göstermektedir. Her analiz yöntemi için farklı sonuçlar çıkmasının nedeni, hedef bileşenin antioksidan aktivitesinin radikal süpürme, peroksitin dekompozisyonu gibi birçok mekanizmaya katkı sağlamasındandır [175]. Castro-Vazquez ve diğ. [176] İspanya bölgesinde yetiştirilen greyfurt kabuklarına hızlandırılmış ekstraksiyon metodu uygulayarak, yapısındaki toplam polifenoller, antioksidan aktivitelerini ve naringin miktarlarını analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda, TFM 49-84 (mg-GAE-g⁻¹ kuru kabuk) olarak, DPPH yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite seviyelerinin 32-110 (mg-TEAC-g⁻¹ kuru kabuk) ve ABTS yöntemi kullanıldığında ise 122-455 (mg-TEAK-g⁻¹ kuru kabuk) olarak bulmuşlardır. Castro-Vazquez ve diğ. [176] çalışmalarında, ABTS yöntemiyle elde edilen antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemine göre oldukça yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Tablo 4.23 de ABTS ve DPPH yöntemlerinden elde edilen

antioksidan aktivite ölçüm sonuçları kıyaslandığında, ABTS yöntemiyle daha yüksek antioksidan aktivitesi elde edilmiştir.

Optimum ekstraksiyon koşullarında tüketilen elektrik enerjisine karşılık gelen toplam fenolik madde miktarlarına bakıldığında (Tablo 4.24); birim TFM başına en az elektrik tüketiminin MDE yöntemi ile elde edildiği görülmektedir. Ayrıca, en düşük toplam fenolik miktarının SAE yöntemi kullanıldığı zaman elde edildiği görülmüştür. Soxhlet yönteminde ise ekstraksiyon süresinin fazla olması ve bunun sonucunda daha çok elektrik enerjisi tüketilmesinden dolayı bu metodun etkin olmadığı sonucuna varılmıştır. UDE yönteminde yapraklardan elde edilen TFM MDE yöntemiyle elde edilen değerin 1.25 katıdır (Tablo 4.24). Diğer taraftan, MDE yöntemi UDE yöntemine göre 24 kat daha az enerji tüketmiştir. Ayrıca, yapraklara uygulanan SMDE ile MDE yöntemlerinin tükettiği elektrik enerji miktarlarının aynı olmalarına rağmen, MDE yöntemi kullanıldığı zaman elde edilen ekstraktaki TFM, SMDE yönteminden elde edilen miktarın 46 katıdır. Böylece, hiç çözücü içermeyen SMDE yönteminin çevre dostu olmasına rağmen, etkili bir yöntem olmadığı görülmüştür. SAE yöntemiyle elde edilen ekstraktaki TFM'nin, SMDE yöntemiyle elde edilen miktardan 3 kat daha fazladır. Ancak, SAE yönteminin tükettiği elektrik enerjisi miktarı, SMDE yönteminin tükettiği miktardan 54 kat daha yüksek çıkmıştır.

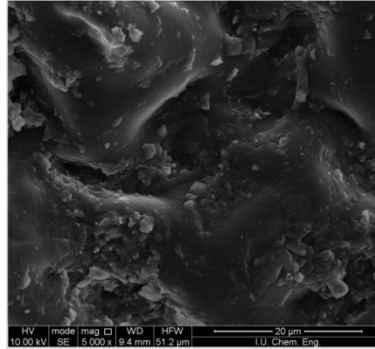
4.6. OPTİMUM EKSTRAKSİYON KOŞULLARINDAKİ YAPRAKLARIN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) İLE ANALİZİ

Şekil 4.32-4.37 sırasıyla işlem görmemiş greyfurt yaprağının morfolojik yapısını ve MDE, SMDE, UDE, SAE ve Soxhlet yöntemlerinden sonraki greyfurt yaprağının morfolojik yapısını göstermektedir.



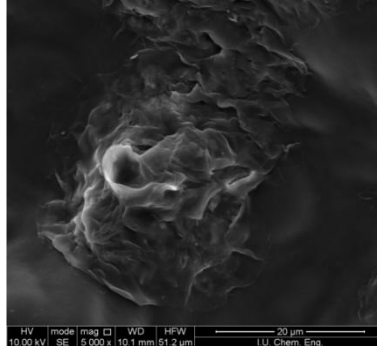
Şekil 4.32: İşlem görmemiş greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.

Şekil 4.32 incelendiğinde, ekstraksiyon işlemi görmemiş greyfurt yaprak morfolojisinin dış yüzeyinin pürüzsüz olduğu görülmektedir.



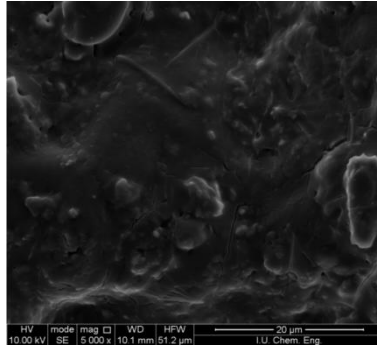
Şekil 4.33: MDE yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.

MDE yönteminde geleneksel ısı yöntemin tersine, moleküllere mıknatıs etkisi yaratıp, elektromanyetik dalga sinyallerinin enerjilerini kullandığından, moleküller dönerken üretilen enerji ısıya dönüşmekte ve greyfurt yaprağı ısındığından yüzeyinin değiştiği ve bitki hücre zarının genişleyip parçalandığı görülmektedir (Şekil 4.33).



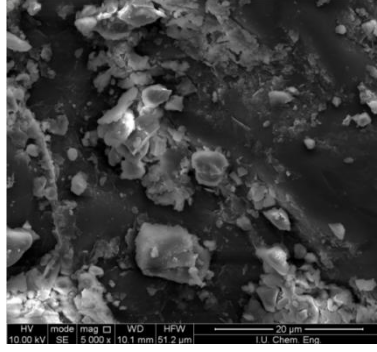
Şekil 4.34: SMDE yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.

Şekil 4.34'e bakıldığında SMDE yönteminde bitki hücresinin içindeki su molekülleri dönerken üretilen enerji ısıya dönüşmekte ve greyfurt yaprağının elektromanyetik ısıyla ısınarak yaprak hücresindeki yağ bezlerinin genişleyip, kapasitelerini aşarak parçalandıkları görülmektedir. Ayrıca, MDE yöntemine göre ısıнын etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir.



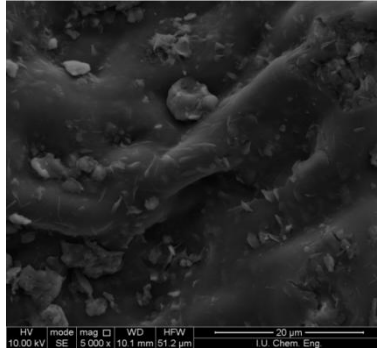
Şekil 4.35: UDE yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.

UDE yöntemi ile işlem görmemiş greyfurt yapraklarının SEM görüntüleri karşılaştırıldıklarında, ultrases kavitasyonu sayesinde bitki hücresinin parçalandığı gözlenmiştir (Şekil 4.35).



Şekil 4.36: SAE yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.

Şekil 4.36'ya bakıldığında SAE yöntemi ile, yüksek basıncın etkisiyle yaprak hücrelerin parçalandığı görülmektedir.



Şekil 4.37: Soxhlet ekstraksiyon yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısı.

Soxhlet yönteminden sonra greyfurt yaprağının morfolojik yapısıyla (Şekil 4.37) UDE yönteminden sonra greyfurt yaprağının SEM görüntüleri (Şekil 4.33) benzerlik göstermektedir. Soxhlet yöntemi sonucunda yaprakta kırılmalar ortaya çıksa da, diğer yöntemlere göre hücredeki bezlerin genişleyip parçalanmadığı görülmektedir. Bu durum, Soxhlet kartuşuna konulan yaprakların yoğunlaşan çözücüyle termal olarak ısıtılması ile açıklanabilir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, greyfurt kabuk ve yapraklarında geleneksel yöntem olarak tercih edilen Soxhlet metodunun pek çok avantajı olmasına rağmen, fenolik komponentlerin ekstraksiyonunda bazı noktaların önemle vurgulanması gerekmektedir. Öncelikle, Soxhlet ekstraksiyonunun avantajlarına bakılacak olursa Soxhlet'de kartuş kullanılması, ekstraksiyon işleminden sonra süzme işlemine gerek bırakmamaktadır. Bir diğer avantajı ise düşük maliyetli ekipman kullanılmasıdır. Soxhlet yönteminde kullanılan çözücü hacminin fazla olması ve ekstraksiyon zamanının diğer yöntemlere göre çok uzun sürmesi yöntemin dezavantajları arasındadır. Ekstraksiyon işlemi 24 saat sürdüğünden tüketilen elektrik enerjisi diğer yöntemlere göre daha fazladır (2.614 kW-h). Eş zamanlı olarak birkaç Soxhlet ekipmanı paralel olarak kurulup, sistem pilot ölçekli seviyeye getirilebilmesine rağmen otomasyonu zordur. Soxhlet ekstraksiyonu işleminde bitki matriksi uzun süre kaynama noktasında ekstrakte edildiğinden, bu durum termal etkiyle solutenin (hedef maddenin) stabil olmayan bileşenlere bozunmasına yol açabilir [177].

Çözücü olarak %100 EtOH, %50 EtOH, %100 H₂O kullanılarak greyfurt kabuklarına uygulanan Soxhlet yönteminde, en yüksek TFM verimi çözücü %50 EtOH olarak seçildiğinde elde edilmiştir. (11.457 mg-GAE-g⁻¹-YK). Greyfurt yapraklarında ise en yüksek verim %100 H₂O kullanıldığı zaman elde edilmiştir (15.945 mg-GAE-g⁻¹-KY). Bu durum kabuk ve yaprakların yapısındaki polifenol profilinin çeşitlilik göstermesinden kaynaklanmaktadır.

UDE yönteminin pilot ölçekten endüstriyel ölçeğe geçmesi oldukça zordur. Ultrasonik probun ömrünün oldukça kısa ve prob maliyetinin pahalı olması bir dezavantajdır [178]. Ultrasonik problemler hızlı bir şekilde aşınmaya uğrarlar. Ayrıca, belli bir süre UDE yöntemine maruz kalan çalışanlarda işitme kaybı oluşabilmektedir. Bu yüzden, bu yöntem kullanılırken ses izolasyon kabini gereklidir. Bu da ayrı bir maliyet getirmektedir.

Greyfurt yapraklarına, UDE yöntemi kullanıldığı zaman optimal koşullar için çözücü konsantrasyonu %100 H₂O, ekstraksiyon zamanı 30 dk., ekstraksiyon sıcaklığı 37 °C ve katı/sıvı oranı 8 g L⁻¹ ve ultrases güç yoğunluğu ise 0.076 kW L⁻¹ olarak bulunmuştur. Buna ilaveten kategorik faktörlerden yaprak çeşidi Ray Ruby ve prob türü ise kalın prob olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda, TFM 28.986 (mg-GAE g⁻¹-KY), TFM-ÜH 0.917 (mg- GAEg⁻¹dk⁻¹-KY), ve TFM-spesifik enerji 0.012 (kJmg⁻¹-GAE) olarak hesaplanmıştır. Greyfurt yapraklarına uygulanan optimum ekstraksiyon koşulları ise % 50 EtOH, ekstraksiyon zamanı 30 dk., ekstraksiyon sıcaklığı 50 °C ve katı/sıvı oranı 16 g L⁻¹ olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda, TFM 13.706 (mg-GAE g⁻¹-YK) ve TFM-ÜH 0.007 (mg- GAEg⁻¹sn⁻¹-YK) olarak bulunmuştur. Yaprakların TFM, içeriği kabuklarınkinin 2.11 katıdır. Yapraklara ve kabuklara uygulanan deneysel tasarım parametrelerin farklı aralıklarda uygulanması kabuk ve yaprağın fenolik içeriğinin çeşitlilik göstermesindendir. Ayrıca, yapraklar kuru ağırlık olarak ele alınırken kabuklar yaş olarak analiz edilmiştir. Yapraklara ve kabuklara uygulanan deneysel parametre aralığının farklı olmasındaki amaç daha yüksek verimi veren parametreleri tespit etmektir. Mühendislikte amaç maksimum verimi ve minimum maliyeti veren deney parametrelerini elde etmektir. Enerji tüketimi açısından incelendiğinde UDE yönteminin 0.245-0.247 (kW-h) arasında enerji tükettiği gözlenmiştir.

MDE yönteminde ekstraksiyon zamanının oldukça kısa olması ve zaman, güç, sıcaklık gibi parametrelerin kontrol edilebilmesi yöntemin avantajlarından. MDE yöntemini dikkate aldığımızda hem naringinin hem de TFM'nin kabuk ve yapraklarda birbirine yakın çıktığı görülmüştür. Bununla beraber, yöntemin enerji tüketiminin oldukça düşük olduğu (0.022-0.033 kW-h) gözlenmiştir. Bu durum, işletme maliyetinin oldukça düşük olduğunun göstergesidir. Sistemin kurulum maliyeti ise ekonomik açıdan oldukça yüksektir.

Yöntemleri birbirleri ile kıyaslarken her yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları olduğu dikkate alınmalıdır. Örneğin, Soxhlet, UDE ve MDE yöntemlerinde sırasıyla 300 mL, 250 mL ve 250 mL çözücü harcanırken, SAE yönteminde ise 10 mL yardımcı çözücü harcanmıştır. Bu durum, SAE yönteminin daha çevre dostu bir yöntem olduğunu göstermektedir. Hiç çözücü kullanılmayan SMDE yöntemi ise diğer yöntemlere göre avantajlı olmasına rağmen ekstrakt veriminin diğer

yöntemlere göre düşük çıkması ise çözücünün ne kadar etkili bir parametre olduğunun göstergesidir. Ayrıca SMDE yönteminde malzeme ne kadar nemlendirilse bitki hücrelerine hapsolan suyun ekstrat verimi için önemli bir katkısı olmadığı çok net görülmüştür. UDE ve MDE yöntemlerinde değişken olarak ele alınan katı/sıvı oranının ekstrakt verimini oldukça değiştirdiği görülmüştür. Çözücü miktarı yetersiz olduğunda çözücü bitki matriksine difüzenemeyip, soluteyi tam olarak özütleyemediği görülmüştür. UDE ile MDE karşılaştırıldığında ekstrakt içerisinde TFM birbirine yakındır. Naringin miktarı ise UDE yönteminde daha yüksek elde edilmiştir. Hem TFM hem de naringin seviyeleri açısından UDE metodunun üstün olduğu söyleyebiliriz.

Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular neticesinde çeşitli tavsiyelerde bulunabilirler. Öncelikle, HPLC-MS kullanılarak yapı aydınlatılması yoluna gidilebilir. Bir diğer önemli husus da kimyacıların, kimya mühendislerinin, eczacıların ve gıda mühendislerinin multidisipliner yaklaşımı içinde çalışarak bu biyoaktif bileşenlerce son derece zengin ekstraktların ilaç, gıda ve kozmetik endüstrileri tarafından değerlendirilmesi gerektiridir.

KAYNAKLAR

- [1]. Dai, A., 2010, Drought under global warming: a review, *Climate change*, 2 (1), 45-65.
- [2]. Lin, J., Zuo, J., Gan, L., Li, P., Fenglin, L., Wang, K., Chen, L., Gan, H., 2011, Effects of mixture ratio on anaerobic co-digestion with fruit and vegetable waste and food waste of China, *Journal of environmental science*, 23 (8), 1403-1408.
- [3]. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004, Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American journal of clinical nutrition*, 79 (5), 727-747.
- [4]. Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkh, D.K., 1995, *Food antioxidants: technological: toxicological and health perspectives*, CRC Press, New York, ISBN: 0-8247-9351-X.
- [5]. Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., Sineiro, J., Dominguez, H., 2001, Natural antioxidants from residual sources, *Food chemistry*, 72, 145–171.
- [6]. Koleva, II., Van-Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N., 2002, Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*, 13 (1), 8-17.
- [7]. FAO, 2012, *Agricultural statistics*, <http://www.fao.org/site/567/desktopdefault.aspx#ancor.html>, [Ziyaret tarihi: 3 Kasım 2015].
- [8]. Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., 1998, Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts, *Journal of agricultural food chemistry*, 46 (6), 2123-2129.
- [9]. Wu, Y.H., Yang, L.X., Wang, F., Wu, X.M., Zhou, C.X., Shi, S.Y., Mo, J.X., Zhao, Y., 2007, Hepatoprotective and antioxidative effects of total phenolics from *laggera pterodonta* on chemical-induced injury in primary cultured neonatal rat hepatocytes. *Food and chemical toxicology*, 45 (8), 1349–1355.
- [10]. Jung, U.J., Kim, H.J., Lee, J.S., Lee, M.K., Kim, H.O., Park, E.J., Kim, H.K., Jeong, T.S., Choi, M.S., 2003, Naringin supplementation lowers plasma lipids and enhances erythrocyte antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic subjects, *Clinical nutrition*, 22(6), 561-568.
- [11] Rajadurai, M., Prince, P.S.M., 2006, Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: Biochemical and histopathological evidences, *Toxicology*, 228 (2-3), 259-268.

- [12]. Jeond, S-M., Boka, S-H., Jang, M-K., Lee, M-K., Nam, K-T., Park, Y.B., Rheec, S-J., Cho, M-S, 2001, Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits, *Life sciences*, 69 (24), 2855-2866.
- [13]. Lee, C-H., Jeong, T-S., Choi, Y-K., Hyun, B-H., Oh, G-T., Kim, E-H., Kim, J-R., Han, J., Bok, S-H., 2001, Anti-atherogenic effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, associated with hepatic acat and aortic vcam-1 and mcp-1 in high cholesterol-fed rabbits, *Biochemical and biophysical research communications*, 284 (3), 681-688.
- [14]. Martin, M.J., Marhuenda, E., Pérez-Guerrero, C., Franco, J.M., 1994, Antiulcer effect of naringin on gastric lesions induced by ethanol in rats, *Pharmacology*, 49 (3), 144-150.
- [15]. Janatia, G.C. and Reddy, T.K., 2005, Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin, *Life sciences*, 77 (7), 780-794.
- [16]. Frankel, E., Bakhouché, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2013, Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols, *Journal of agricultural of food chemistry*, 61, 5179-5188.
- [17]. Lebovka, N., Vorobiev, E., Chemat, F., 2011, *Enhancing extraction processes in the food industry*, CRC Press:Cambridge, United Kingdom, ISBN: 978-1-4398-4593-6.
- [18]. Lapkin, A.A., Plucinski, P.K., Cutler, M., 2006, Comparative assessment of technologies for extraction of artemisinin, *Journal of Natural Product*, 69 (11), 1653–1664.
- [19]. Nelson, P.R., Coffin, M., Copeland, A.F., 2003, *Introductory statistics for engineering experimentation*, CA: Acedemic Press, San Diego, ISBN: 978-0-12-515423-9
- [20]. Pérez-Serradilla, J.A. and Luque de Castro, M.D., 2011, Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract, *Food chemistry*, 124 (4), 1652-1659.
- [21]. Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., Cintas, P., 2008, Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Food chemistry*, 15 (5), 898-902.
- [22]. Japón-Luján, R. and Luque de Castro, M.D., 2007, Static-dynamic superheated liquid extraction of hydroxytyrosol and other biophenols from alperujo (a semisolid residue of the olive oil industry). *Journal of agricultural food chemistry*, 55(9), 3629-3634.
- [23]. Romdhane, M. and Gourdon, C., 2002, Investigation in solid-liquid extraction: influence of ultrasound., *Chemical engineering journal*, 87 (1), 11–19.

- [24]. Baroutaji, A., Gilchrist, M.D., Smyth, D., Olabi, A.G., 2005, Analysis and optimization of sandwich tubes energy absorbers under lateral loading, *International journal of impact engineering*, 82, 74-88.
- [25]. Montgomery, D.C., 1997, *Design and analysis of experiments*, 4th ed., NY, Wiley, New York, ISBN: 978-1118146927.
- [26]. Ebadi, M., 2001, *Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative diseases*, Prominent Press, Arizona.
- [27]. Güner, U., 2014, *Toksikoloji Notları*, Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi.
- [28]. Cheeseman, K.H. and Slater, T.F., 1993, An introduction to free radical biochemistry, *British medical bulletin*, 49 (3), 81- 493.
- [29]. Dichi, I., Breganó, J.W., Simão, A.N.C., Rubens, C., Role of oxidative stress in chronic diseases, *CRC Press, Taylor&Francis Group*, Brazil, ISBN: 13:978-1-4822-1682-0.
- [30]. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007, *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc, Newyork, ISBN: 978-0-19-871747-8.
- [31]. Yıldırım, S.E., 2002, *Yaşlanma biyokimyası*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- [32]. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160 (1), 1-40.
- [33]. Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Poeggeler, B., Barlow-Walden, L., Chuang, J., Ortiz, G.G., Acuna-Castroviejo, D., 1995, A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant, *Journal of pineal research*, 18 (1), 1–11.
- [34]. Shohami, E., Yannai, E.B., Horowitz, M., Kohen, R., 1997, Oxidative stress in closed head injury: brain antioxidant capacity as an indicator of functional outcome, *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 17, 1007–1019.
- [35]. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012, Reactive oxygen species, oxidative damage and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions., *Journal of botany*, 1-26.
- [36]. Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006, Algal antioksidanlar, *EÜ Su Ürünleri Dergisi* 23 - Ek (1/1), 85-89.
- [37]. Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C., Ames, B.N., 1998, Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain, *Proceedings of the national academy of sciences of The United States of America*, 85 (9), 3175-3179.

- [38]. Carol, K.S. and Elizabeth, A.R., 2008, *Life-span human development*, 6th ed., Wadsworth Publishing, England, ISBN: 978-0495553403.
- [39]. Şahin, S., 2011, *Zeytin ağacı yapraklarından süperkritik-CO₂ ile ekstrakt eldesi ve bileşimindeki Oleuropein miktarının incelenmesi*, Doktora, İstanbul Üniversitesi.
- [40]. Nimse, S.B. and Pal, D., 2015, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanism, *Royal society of chemistry*, 5, 27986-28006.
- [41]. Robinson, D.S., 1991, *Food biochemistry and nutritional value*, Wiley, London, ISBN: 978-0470207352.
- [42]. Tiwari, B.K., Nigel, P., Brunton, C.S.B., 2013, *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction*, John Wiley & Sons, London, ISBN: 978-1-4443-3810-2.
- [43]. Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewig, N.G., 2000, Natural products (secondary metabolites) in biochemistry and molecular biology of plants, *American society of plant biologists*, 1250-1268.
- [44]. Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., 2008, Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food chemical toxicology*, 46, 3774-3779.
- [45]. Nishino, H., Murakoshi, M., Ii, T., 2002, Carotenoids in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Review*, 21, 257-264.
- [46]. Şahin, B., 2013, *Farklı ekim zamanlarında yetiştirilen bazı tıbbi bitkilerin verim ve kalite özelliklerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans, Selçuk Üniversitesi.
- [47]. Stavric, B., 1994, Role of chemopreventers in human diet, *Clinical biochemistry*, 27 (5), 319-332.
- [48]. Winkler, B.S., Orselli, S.M., Tonia, S., 1994, The redox couple between glutathione and ascorbic acid: A chemical and physiology perspective, *Free radical biology and medicine*, 17, 333-349.
- [49]. Shahriar, K. and Robin, J., M., 2010, Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies, *Molecules*, 15, 7985-8005.
- [50]. Heim, K. E., Tagliaferro, A., R., Bobilya, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The journal of nutritional biochemistry*, 13 (10), 572-584.
- [51]. Boyanay, K.Ö., 2013, *Turunçgil yapraklarının çeşitli ayırma yöntemleri ile uçucu yağ eldesi ve bileşiminin incelenmesi*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi.

- [52]. Swingle, W.T., 1943, *The botany of citrus and its wild relatives of the orange subfamily*. In: Reuther, W., Webber, H.J., Batchelor, L.D., (eds). *The Citrus Industry*, vol. 1. University of California, Berkeley, 129-474.
- [53]. Barrett, H.C., Rhodes, A.M., 1976, A numerical taxonomic study of the affinity relationships in cultivated citrus and its close relatives. *Systematic Botany*, 1, 105-136.
- [54]. Webber, H.J., 1967, *History and development of the Citrus industry*. In: Reuther, W., Batchelor, L.D. and Webber, H.J. (eds) *The Citrus Industry*, 2nd ed. University of California Press, California, 1-39.
- [55]. Chapot, H., 1975, The citrus plant. In: *Citrus Technical Monograph*, no. 4. Ciba-Geigy Agrochemicals, 6-13.
- [56]. Khan, I., 2007, *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*, Cab International, London, UK, ISBN-13: 978 0 85199 019 4.
- [57]. Bedestenci, H.Ç.ve VURUŞ, H., 2000, Türkiye'de turuncgil üretimi ve geleceği, *Fen ve Mühendislik Dergisi*, (1) 3, 149-159
- [58]. Hidayet, O., 2008, *Toprak Bilgisi Ders Notu*, Gümüşhane Üniversitesi.
- [59]. Kafa G., Canihoş, E., 2010, Türkiye Cumhuriyeti Tarım Ve Köy İşleri Bakanlığı Teşkilatlanma Ve Destekleme Genel Müdürlüğü Televizyon Yoluyla Yaygın Çiftçi Eğitimi Projesi (Yayçep) Turuncgil Yetiştiriciliği, Tarım ve Köy İşleri Yayın Dairesi Başkanlığı, 1. Baskı, Kavaklı dere, Ankara.
- [60]. Ağar, A., 2007, Aurantioideae alt familyasındaki cinslerde yer alan bazı türlerin ssrmarkırlarıyla moleküler karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı
- [61]. Uysal, O., 2012, Turuncgil üretim maliyetleri, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Alata Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu.
- [62]. Soni, N.K. and Soni, V., 2010, *Fundamentals of botany*, Tata McGraw Hill Education Private Limited, New Delhi, ISBN (10): 0-07-068177-5.
- [63]. TÜİK, 2014., *Bitkisel üretim istatistikleri veritabanı* <http://www.tuik.gov.tr/PreTabloArama.do?metod=search&araType=vt> [Ziyaret tarihi: 15 Kasım 2015].
- [64]. Pessarakli, M., 2001, *Handbook of plant and crop physiology*, 2nd ed., Marcel Dekker, New York, Basel, ISBN: 0-8247-0546-7.
- [65]. Chichester, C.O., 1959, *Advances in food research*, Academic Press, New York and London.

- [66]. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1992, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in Netherlands, *J Agr Food Chem.*, 40, 2379–2383.
- [67]. Keys, A., 1995, Mediterranean diet and public health: Personal reflections, *Am J Clin Nutr.*, 61, 1321–1323.
- [68]. Hertog, M.G., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D., 1993, Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease, *Lancet*, 342, 1007–101.
- [69]. Ejaz, S., Ejaz, A., Matsuda, K., Chae, W.L., 2006, Limonoids as cancer chemopreventive agents, *J. Sci. Food Agr.*, 86, 339–345.
- [70]. Nagy, S. and Attaway, J.A. 1994. Anticancer phytochemicals of citrus fruits and their juice products., *Fruit Process.*, 11, 349-354.
- [71]. Lota, M-L., Tomi, F., Bessiere J-M., Casanova, J., 1999, Chemical composition of peel and leaf essential oils of *Citrus medica* L. and *C. limonimeditica* Lush, *Flavour Frag J.*, 14 (3), 161-166.
- [72]. Zaheddb, N., Chrifb, R., Abidb, I., Medfeib, W., Kallelc, M., Brahimd, N.B., Sebeib, H., 2010, Composition of peel essential oils from four selected Tunisian Citrus species: Evidence for the genotypic influence, *Food Chemistry*, 123 (4), 1098-1104.
- [73]. Eltson, A., Lin, J., Rouseff, R. 2005. Determination of the role of valencene in orange oil as a direct contributor to aroma quality, *Flavour Frag.*, 20:381-386.
- [74]. Lam, L.K.T., Zhang, J., Hasegawa, S. 1994. Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis, *Food Technology*, 48:104-109.
- [75]. Anagnostopoulou MA, Kefalas P, Papageorgiou VP, Assimopoulou AN and Boskou D (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*), *Food Chemistry*, 94: 19-25.
- [76]. Horowitz RM (1961). The citrus flavonoids. In: Sinclair WB editor. The orange. Its biochemistry and physiology, CA, University of California, Division of Agricultural Science, Los Angeles, pp.334-372.
- [77]. Bermffldez-Soto, M.J., A., Toms-Barbern, F.A., 2004, Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices, *European food research technology*, 219, 133–14.
- [78]. Peleg, H., Naim, M., Rouseff, R.L. and Zehavi, U., 1991. Distribution of bound and free phenolic acids in oranges (*Citrus sinensis*) and grapefruits (*Citrus paradisi*), *Journal of science of food and agriculture*, 57, 417-426.
- [79]. Yılmaz, E., Turunçgil meyvelerinin insan sağlığına etkileri, *Gıda Mühendisliği* 7, 47-52.

- [80]. Tripoli, E, Guardia, M.L., Giammanco, S., Majo, D.D., Giammanco, M., 2007, Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review, *Food Chemistry*, 104 (2), 466-479.
- [81]. Yusof, S., Ghazali, H.M., King, G.S., 1990, Naringin content in local citrus fruits, *Food Chemistry*, 113-121.
- [82]. Kroyer, G., 1986, The antioxidant activity of citrus fruit peels, *Europe PMC*, 25 (1), 63-69.
- [83]. Bocco, A., Cuvelier, M-E., Richard, H., Berset, C., 1998, Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (6), 2123-2129.
- [84]. Sorata, Y., Takaham, A.U., Kimura, M., 1984, Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of hematoporphyrin, *Biochimica biophysica acta*, 799, 313-317.
- [85]. Kahraman, A., Serteser, M., Köken, T., 2002, Flavonoidler, *Kocatepe tıp dergisi*, 3, 1-8.
- [86]. Jeon, S-M., Bok, S-H., Jang, M-K., Lee, M-K, Nam, K-T., Park, Y. B., Rhee, S-J., Choi, M-S., 2001, Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits, *Life Sciences*, 69 (24), 2855-2866.
- [87]. Pang, W-Y., Wang, X-L., Mok, S-K., Lai, W-P., Chow, H-K., Leung, P-C., Yao, X-S., Wong, M-S., 2010, Naringin improves bone properties in ovariectomized mice and exerts oestrogen-like activities in rat osteoblast-like (UMR-106) cells, *British journal of pharmacology*, 159 (8), 1693-1703.
- [88]. Srinivasan, M., Sudheer, A.R., Menon, V.P., 2007, Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property, *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 40, 92-100.
- [89]. Abdel-Wahab, M.H., El-Mahdy, M.A., Abd-Ellah, M.F., Helal, G.K., Khalifa, F., Hamada, F.M.A., 2003, Influence of p-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart, *Pharmacological research*, 461-465.
- [90]. Schönbucher, A., 2002, *Thermische Verfahrenstechnik*, 1st ed., Springer, Berlin, Heidelberg.
- [91]. Gertenbach, DD., 2001, Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals, CRC Press, Newyork.
- [92]. Ahuja, S., Alsante, K.M., Handbook of Isolation and Characterization of Impurities in Pharmaceuticals, San Diego, California, ISBN: 012044982X.
- [93]. Extraktionstechnik, S. <http://www.samtech.at/extraktionsverfahren/> [Ziyaret Tarihi: 10.10.2015].

- [94]. Castro, M.D.L., Priego-Capote, F., 2010, Soxhlet extraction: past and present panacea, *Journal of chromatography A*, 1217 (16), 2383-2389.
- [95]. Luque-Garcia, J.L., Castro, M.D.L., 2004, Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid ample treatment: Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds, *Journal of chromatography A*, 1034 (1-2), 237-242.
- [96]. Viro, M., Tomao, V., Ginies, C., Visinoni, F., Chemat, F., 2008, Green procedure with a green solvent for fats and oils' determination. Microwave-integrated Soxhlet using limonene followed by microwave clever distillation, *Journal of chromatography A*, 1196, 147-152.
- [97]. Vinatoru, M., 2001, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
- [98]. Cocito, C., Gaetano, G., and Delfini, C. 1995, Rapid extraction of aroma compounds in must and wine by means of ultrasound, *Food Chemistry*, 52, 311-320.
- [99]. Blake, J. R., and Gibson, D.C., 1987, Cavitation bubbles near boundaries, *Annual Review of Fluid Mechanics*, 19, 99-123.
- [100]. Ergan-Temur, B., 2013, Doktora, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- [101]. Zlotorzynski, A., 1995, The application of microwave radiation of analytical and environmental chemistry, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 25, 43-75.
- [102]. Burkert R., H.W. Helberg, J.U von Schiitz, 1993. Longitudinal and transverse conductivity in (2,5-Me 2-DCNQI) Cu fibres, *Synth. Met.*, 56: 2519-2524.
- [103]. Letellier, M., Budzinski, H., 1999, Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analisis*, 27(3), 259-267.
- [104]. Chemat, F., Cravotto, G., 2013, Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice, Springer, London, ISBN: 978-1-4614-4830-3.
- [105]. Mishra, A., Vats, T., Clark, J.H., Microwave Radiations: Theory and Instrumentation, in Microwave-Assisted Polymerization, 2015, RSC Green Chemistry, UK, ISBN:978-1-78262-318-2.
- [106]. Metaxas, A.C., Meredith, R.J., 1993, Industrial Microwave Heating, CPI group,
- [107]. Raner, K.D. and Strauss, C.R., 1992, Influence of microwave on the rate of esterification of 2,4,6 trimethylbenzoic acid with 2-propanol, *Journal of organic chemistry*, 57, 6231.
- [108]. Kristenson, E.M., 2006, Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends. Analytical Chemistry*, 25, 96-111.

- [109]. Mishra, A., Vats, T., Clark, J.H., 2016, Microwave-Assisted polyrization, CPI Group Ltd., Groydon, UK.
- [110]. Arai, Y., Sako, T., Takebayashi, Y., 2002, Supercritical fluids: Molecular Interactions, Physical Properties, and New Applications, Springer, Germany, ISBN: 978-3-642-62515-2.
- [111]. Kayan, B., 2009, *Taxus baccata l.'nin farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ekstraksiyonu ve ekstraksiyon verimlerinin karşılaştırılması*, Doktora, Mersin Üniversitesi.
- [112]. Dinçer, S., Acaralı, N.B., Uzun, İ.N., Deniz, D., 2007, A Second Option in Special Separation Operations; Supercritical Fluid Processes, *Journal of Engineering and Natural Science*, Sigma, 25(2) 106-128.
- [113]. <http://www.rsc.org/education/eic/issues/2008November/SupercriticalProcessing.asp>
- [114]. <http://www1.chem.leeds.ac.uk/People/CMR/criticalpics.html>
- [115]. Westwood, S.A., 1993, Supercritical fluid extraction and its use in chromatographic sample preparation, Springer, India.
- [116]. Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K., 2005, Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dieatry supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8) 3110-3113.
- [117]. Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G., 1993, Oxygen-Radical Absorbance Capacity Assay for Antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 14(3) 303–311.
- [118]. Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W., 1997, Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fragraea blumei*, *Helvetica Chimica Acta*, 80 (4), 1144-1152.
- [119]. Miller, N. J., Rice-Evans, C. A., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods of Enzymology*, 234, 279-289.
- [120]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 7970-7981.
- [121]. Montgomery, D.C., 2006, *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley and Sons, New York.
- [122]. İlbay, Z., Şahin, S., Kırbaşlar, Ş.İ., 2013, Optimization of ultrasound-assisted extraction of rosehip (*Rosa canina* L.) with response surface methodology, *Journal of the science of food and agriculture*, 2804-2809.

- [123]. Draper N.R. and John J.A., 1998, Response-surface designs for quantitative and qualitative variables. *Technometrics*, 30, 423–428.
- [124]. Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandao, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L., 2007, Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica chimica acta*, 597 (2), 179-186.
- [125]. Ozcelik, B., Erzurumlu, T., 2005, Determination of effecting dimensional parameters on warpage of thin shell plastics parts using integrated response surface method and genetic algorithm, *Int Commun Heat Mass Transfer*, 32, 1085-1094.
- [126]. Chen, C-C., Chiang, K-T., Chou, C-C., Liao, Y-C., 2001, The use of D-optimal design for modeling and analyzing the vibration and surface roughness in the precision turning with a diamond cutting tool, *The international journal of advanced manufacturing technology*, 54, 465–478.
- [127]. Oktem, H., Erzurumlu, T., Kurtaran, H., 2005, Application of response surface methodology in the optimization of cutting conditions for surface roughness, *Journal of materials processing technology*, 170 (1-2), 11–16.
- [128]. Kansal, H.K., Singh, S., Kumar, P., 2005, Parametric optimization of powder mixed electrical discharge machining by response surface methodology, *Journal of materials processing technology*, 169, 427-436.
- [129]. Youssefi, Sh., Emam-Djomeh, Z., Mousavi, S.M., 2009, Comparison of artificial neural network (ANN) and Response Surface Methodology (YYM) in the Prediction of Quality Parameters of Spray-Dried Pomegranate Juice, *Drying technology: an international journal*, 27 (7-8), 910-917.
- [130]. Korkut, İ., 2012, *Ultrases destekli polimer sentezi*, Doktora, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [131]. Koda, S., Kimura, T., Kondo, T., Mitome, H., 2003, A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system, *Ultrasonics sonochemistry*, 10, 149-156.
- [132]. Shaviklo, A.R., Rafipour, F., 2014, Consumer-Based Development and Optimization of Fish Strudel Using D-optimal Mixture Design, *Journal of food processing and preservation*, 38, 845–855.
- [133]. Soltysiak, M., Erle, U., Celuch, M., 2008, Load curve estimation for microwave ovens: experiments and electromagnetic modelling. *Mikon Conference proceeding*, 633, 1-4.
- [134]. Swain, M.J., Ferron, S., Coelho, A.I.P., Swain, M.V.L., 2006, Effect of continuous (Intermittent) use on the power output of domestic microwave ovens. *International journal of food science technology*, 41 (6), 652-656.

- [135]. İlbay, Z., 2011, *Doğrudan metanol yakıt hücresinin kinetik modellenmesi ve modelin doğrulanması*, Yüksek Lisans, Gebze Teknik Üniversitesi.
- [136]. Apak, R., Güçlü, K., Demirata B., Özyürek M., Çelik S.E., Bektaşoğlu, B., K. I.Berker, Özyurt, D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12 (7), 1496-1547.
- [137]. Yu, J., Wang, L., Walzem, R.L., Miller, E.G., Pike, L.M., Patil, B.S., 2005, Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins, *Journal of agricultural and food chemistry*, 23 (56), 2009-2014.
- [138]. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free radical biology and medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.
- [139]. Marvin C. McMaster, 2006, *HPLC: A Practical User's Guide*, Wiley Interscience, 2th Edition.
- [140]. John, W., Henderson, Jr., Judy-Berry, A., Mack, W., Long, Agilent Technology, Rapid Gradient and Elevated Temperature UHPLC of Flavonoids in Citrus Fruit. <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-6237EN.pdf>. [Ziyaret Tarihi: 12.10.2015].
- [141]. Khiari, Z., Makris, D.P., Kefalas, P., 2009, An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems, *Food bioprocess technology*, 2, 337-343.
- [142]. Cacace, J.E., Mazza, G., 2002, Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (21), 5939-5946.
- [143]. Wang, H., Zhao, M., Yang, B., Jiang, Y., Rao, G., 2008, Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities, *Food chemistry*, 107, 1399-1406.
- [144]. Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A., 2005, Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts, *Food chemistry*, 92 (3), 521-525.
- [145]. Korkut, I., Bayramoğlu, M., 2014, Various aspects of ultrasound assisted emulsion polymerization process, *Ultrasonics sonochemistry*, 21, 1592-1599.
- [146]. Beg, Q.K., Sahai, V., Gupta, R., 2003, Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 39 (2), 203-209.
- [147]. Simpson, T.W., Poplinski, J.D., Koch, P.N, Allen, J.K., 2001, Metamodels for Computer-based Engineering Design: Survey and recommendations, *Engineering with computers*, 17, 129-150.

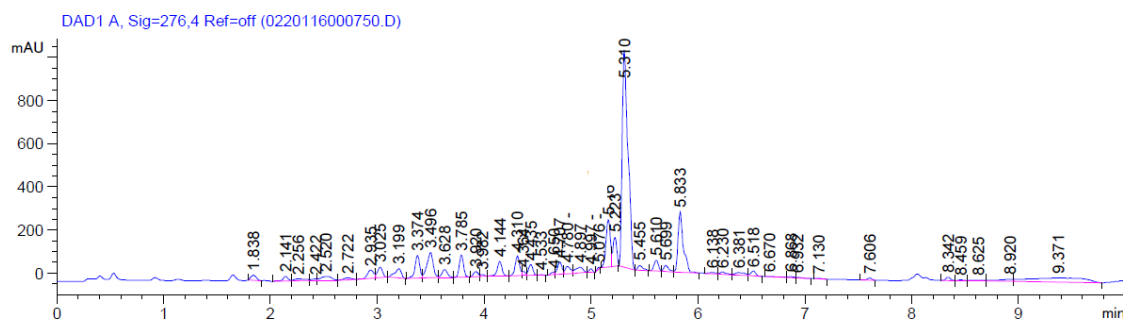
- [148]. Statease, 2009. Handbook for experimenters, http://www.statease.com/pubs/handbk_for_ex_p_sv.pdf. [Ziyaret Tarihi: 18.10.2015].
- [149]. Hu, A-J., Zhao, S., Liang, H., Qiu, T-Q., Chen, G., 2007, Ultrasound assisted supercritical fluid extraction of oil and coixenolide from adlay seed. *Ultrasonics sonochemistry*, 14, 219-224.
- [150]. Jiang, Y., Petrier, C., Waite, T.D., 2002, Kinetics and mechanisms of ultrasonic degradation of volatile chlorinated aromatics in aqueous solutions, *Ultrasonics sonochemistry*, 9, 317-323.
- [151]. Vilkhov, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008, Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9, 161-169.
- [152]. Khokhar, S., Magnusdottir, S.G.M., 2002, Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 565-570.
- [153]. Prasad, N.K., Yang, B., Zhao, M., Wang, B.S., Chen, F., Jiang, Y., 2009, Effects of high-pressure treatment on the extraction yield, phenolic content and antioxidant activity of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp, *International Journal of food science and technology*, 44, 960-966. 22
- [154]. Bi, W., Tian, M., Row, H.K., 2011, Extraction and concentration of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* Bunge by task-specific non-ionic surfactant assistance, *Food chemistry*, 126, 1985-1990.
- [155]. Thoo, Y.Y., Ho, S.K., Liang, J.Y., Ho, C.W., Tan, C.P. 2010, Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food chemistry*, 120, 290-295.
- [156]. Spigno, G., De Faveri, D.M., 2007, Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts, *Journal of food engineering*, 78, 793-801.
- [157]. Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., Atungulu, G.G., 2011, Extract of Phenolics From Pomegranate Peels, *The open food science journal*, 5, 17-25.
- [158]. Tan, X-J., Li, Q., Chen, X-H., Wang, Z-W., Shi, Z-Y., Bi, K-S., Jia, Y. 2008, Simultaneous determination of 13 bioactive compounds in *Herba Artemisiae Scopariae* (Yin Chen) from different harvest seasons by HPLC-DAD. *Journal of pharmaceut biomedical.*, 47, 847-853.
- [159]. Kelebek, H., 2010, Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey, *Industrial crops and products*, 32, 269-274.

- [160]. Velickovic, D.T., Milenovic, D.M., Ristic, M.S., Velijkovic, V.B., 2006, Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage, *Ultrasonics Sonochemistry*, 13, 150-156.
- [161]. Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X., 2007, Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology, *Journal of food engineering*, 78 (2), 693-700.
- [162]. Xiao, W., Han, L., Shi, B., 2008, Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*, *Separation and purification technology*, 62 (3), 614-618.
- [163]. Fang, L., Liu, Y., Zhauang, H., Liu, W., Wang, X., Huang, L., 2011, Combined microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography for separation and purification of xanthenes from *Garcinia mangostana*, *Journal Chromotography B, Analytical Technology Biomed Life Science*, 879 (28), 3023-3027.
- [164]. Simsek, M., Sumnu, G., Sahin, S., 2012, Microwave assisted extraction of phenolic compounds from sour cherry pomace, *Separation science and technology*, 47 (8), 1248-1254.
- [165]. Pan, X., Niu, G., Liu, G., 2003, Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves, *Chemical engineering and processing*, 42, 129-133.
- [166]. Liu, T., Sui, X., Zhang, R., Yang, L., Zu, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, Z., 2011, Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid, and essential oil from *Rosmarinus officinalis*, *Journal of chromatography A*, 1218, 8480-8489.
- [167]. Ma, C-L., Liu, T-T, Yang, L., Zu, Y-G., Chen, X., Zhang, L., Zhang, Y., Zhao, C., 2011, Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of essential oil and biphenyl cyclooctene lignans from *Schisandra chinensis* Baill fruits, *Journal of chromatography A*, 1218, 8573-8580.
- [168]. Gao, M., Huang, W., Chowdhury, M.R., Liu, C., 2007, Microwave-assisted extraction of scutellarin from *Erigeron breviscapus* Hand-Mazz and its determination by high-performance liquid chromatography, 591 (2), 161-166.
- [169]. Park, H.S., Lee, H.J., Shin, M.H., Lee, K-W., Lee, H., Kim, Y-S., Kim, K.O., Kim, K.H., 2007, Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide, *Food chemistry*, 105 (3), 1011-1017.
- [170]. Kopcak, U., Mohamed, R-S., 2005, Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures, *The journal of supercritical fluids*, 34 (2), 209-214.
- [171]. Rousseff, R.L., Martin, S.F., Youtsey, C.O., 1987, Quantitative survey of naringin, hesperidin and neohesperidin in citrus, *Journal of agricultural food chemistry*, 35, 1027-1030.

- [172]. Yu, J., Dandekar, D.V., Toledo, R.T., Singh, R.K., Patil, B.S., 2007, Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds, *Food Chemistry*, 105, 1026-1031.
- [173]. Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., Xia, W., 2009, Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Separation and purification technology*, 70, 63-70.
- [174]. Şahin, S., 2015, A novel technology for extraction of phenolic antioxidants from mandarin (*Citrus deliciosa* Tenore) leaves: solvent free microwave extraction, *Korean journal of chemical engineering*, 32, 950-957.
- [175]. Chen, X., Zhang, Y., Zu, Y., Fu, Y., Wang, W., 2011, Composition and biological activities of the essential oil from *Schisandra chinensis* obtained by solvent-free microwave extraction, *LWT-Food science technology*, 44, 2047-2052.
- [176]. Castro-Vazquez, L., Alanon, M.E., Rodriguez-Robledo, V., Perez-Coello, M.S., Hermosin-Gutierrez, I., Diez-Maroto, M.C., Jordan, J., Galindo, M.F., Arrovo-Jimenez, M. del, 2006, Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.), *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, dx.doi.org/10.1155/2016/8915729.
- [177]. de Castro, M.D.L., Priego-Capote, F., 2010, Soxhlet extraction: past and present panacea. *Journal of chromatography A*, 1217 (16), 2383-2389.
- [178]. Santos, H.M., Capelo, J.L., 2007, Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment, *Talanta*, 73 (5), 795-802.

EKLER

EK 1. Greyfurt ekstraksiyona ait HPLC kromatogram.



ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Zeynep İLBAY
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	29/03/1985, İzmir
Telefon	+905308225587
E-mail	zilbay@gmail.com
Web adres	http://aves.istanbul.edu.tr/zeynep.ilbay/

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Kimya Mühendisliği/ Temel İşlemler ve Termodinamik	2016
Yüksek Lisans	Gebze Teknik Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü/Kimya Mühendisliği / Proses ve Reaktör Tasarımı	2011
Lisans	İ.Ü. Mühendislik Fak. Kimya Müh. Bölümü	2008
Lise	Bilecik Fen Lisesi	2003