



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**GÜLFATMA (*Alcea apterocarpa*) ÇİÇEĞİNDEN
BİYOÇÖZÜCÜLERLE PİGMENT ELDESİNİN
OPTİMİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Ayşegül ÖZKAN

Danışman
Prof. Dr. İlkey KOCA

SAMSUN
2022

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI



**GÜLFATMA (*Alcea apterocarpa*) ÇİÇEĞİNDEN
BİYOÇÖZÜCÜLERLE PİGMENT ELDESİNİN
OPTİMİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Ayşegül ÖZKAN

Danışman
Prof. Dr. İlkay KOCA

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.MUH.1904.20.013 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşegül ÖZKAN tarafından, Prof. Dr. İlkay KOCA danışmanlığında hazırlanan “GÜLFATMA (ALCEA APTEROCARPA) ÇİÇEĞİNDEN BİYOÇÖZÜCÜLERLE PİGMENT ELDESİNİN OPTİMİZASYONU” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 5.7.2022 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Zekai TARAĞCI Ordu Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. İlkay KOCA Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Belkıs TEKGÜLER Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır

16/06/2022
Ayşegül ÖZKAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: GÜLFATMA (*Alcea apterocarpa*) ÇİÇEĞİNDEN
BİYOÇÖZÜCÜLERLE PİGMENT ELDESİNİN OPTİMİZASYONU

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 16.06.2022 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 24

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

05/07/2022
Prof. Dr. İlkay KOCA

ÖZET

GÜLFATMA (*Alcea apterocarpa*) ÇİÇEĞİNDEN BİYOÇÖZÜCÜLERLE PİGMENT ELDESİNİN OPTİMİZASYONU

Ayşegül ÖZKAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans, Haziran/2022
Danışman: Prof. Dr. İlkyay KOCA

Türkiye’de doğal olarak yetişen ve Malvaceae familyasına ait olan gülfatma çiçeği (*Alcea apterocarpa*) uzun yıllardır halk arasında birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışma, gülfatma çiçeğinden yenilebilir, çevre dostu biyoçözücülerle pigment eldesini optimize etmek amacıyla yapılmıştır. Bunun için biyoçözücü olarak gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkol kullanılmıştır. Optimizasyonda yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM), merkezi kompozit tasarımı kullanılmış, sıcaklık ve çözücü konsantrasyonu bağımsız değişken olarak alınmıştır. Seçilen bağımsız değişkenlerin toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve antioksidan aktivite üzerine etkileri araştırılmıştır. Optimize koşullar gliserol için 85°C ekstraksiyon sıcaklığı, % 85 çözücü konsantrasyonu; 1,3-bütandiol için 85°C ekstraksiyon sıcaklığı, % 50.184 çözücü konsantrasyonu ve etil alkol için 75°C ekstraksiyon sıcaklığı, % 55.180 çözücü konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu optimum noktalarda gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkol için sırasıyla toplam fenolik madde 65.78, 48.85 ve 59.94 mg/g; toplam flavonoid 11.08, 11.95 ve 12.16 mg/g; toplam antosiyanin 8.38, 7.46 ve 8.04 mg/g; DPPH serbest radikal giderme etkisi 103.70, 188.55 ve 206.99 mmol/g; demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) 327.23, 437.54 ve 265.79 mmol/g olarak belirlenmiştir. Ayrıca, optimum noktada HPLC ile antosiyanin profilleri de incelenmiştir. HPLC sonuçlarına göre ekstraktlarda siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glukozit ve siyanidin klorit bulunmuştur.

Optimum koşullarda elde edilen ekstraktlarda, depolama ve ışık stabilite testleri uygulanmıştır. Oda sıcaklığında, karanlıkta 7 hafta depolama sonucunda antosiyaninlerde meydana gelen kayıp gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkol için sırasıyla % 42.12, % 75.87 ve % 67.74 olarak bulunmuştur. Işıktaki 4 hafta depolama sonunda antosiyaninde meydana gelen kayıp gliserol % 45.94, 1,3-bütandiol için % 96.25 ve etil alkol için % 97.88 olarak kaydedilmiştir.

Sonuç olarak biyoçözücülerden antosiyanin verimi açısından istatistiksel anlamda farklılık ($p>0.05$) bulunmazken, bireysel fenolik bileşiklerin birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. Depolama stabilitesi açısından değerlendirildiğinde, gliserol ile ekstrakte edilenlerin hem karanlık hem de ışıktaki depolama stabilitesinin yüksek olduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: *Alcea apterocarpa*, Biyoçözücü, Gliserol, 1,3-Bütandiol, Etil alkol

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF PIGMENT EXTRACTION FROM GULFATMA (*Alcea apterocarpa*) WITH BIOSOLVENTS

Ayşegül ÖZKAN
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Food Engineering
Master, June/2022
Supervisor: Prof. Dr. İlkey KOCA

The Gulfatma flower (*Alcea apterocarpa*) grows naturally in Turkey and belongs to the Malvaceae family. It has been used in the treatment of many diseases among the populations for many years. This study was carried out to optimize the pigment extraction from Gulfatma flower using edible and environmentally friendly biosolvents. For this purpose, glycerol, 1,3 butanediol and ethyl alcohol were used as biosolvents. Response surface methodology (RSM) and central composite design were used in the optimization. The temperature and solvent concentration were used as independent variables. The effects of the selected independent variables on total phenolic content, total flavonoid, total anthocyanin and antioxidant activity were investigated. Optimized conditions for glycerol were 85°C extraction temperature and 85 % solvent concentration; for 1,3-butanediol were 85°C extraction temperature and 50.184 % solvent concentration; and for ethyl alcohol were 75°C extraction temperature and 55.180 % solvent concentration. At these optimum conditions, the total phenolic content for glycerol, 1,3-butanediol and ethyl alcohol was 65.78, 48.85 and 59.94 mg/g, respectively; total flavonoid was 11.08, 11.95 and 12.16 mg/g; total anthocyanin was 8.38; 7.46 and 8.04 mg/g; DPPH free radical scavenging activity was 103.70, 188.55 and 206.99 mmol/g; and iron reducing antioxidant power (FRAP) was 327.23, 437.54 and 265.79 mmol/g. In addition, the anthocyanin profile was determined by HPLC at the optimum conditions and cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, pelargonidin-3-glucoside and cyanidin chloride were found in the extracts.

Storage and light stability tests were applied to the extracts obtained under optimum conditions. After 7 weeks of storage at room temperature in the dark, the loss of anthocyanins was found to be 42.12 % for glycerol, 75.87 % for 1,3-butanediol, and 67.74 % for ethyl alcohol. After 4 weeks of storage in the light, the loss of anthocyanin was recorded as 45.94 % for glycerol, 96.25 % for 1,3-butanediol and 97.88 % for ethyl alcohol.

As a result, no significant statistical difference ($p>0.05$) was found in terms of anthocyanin yield from biosolvents, however, the individual phenolic compounds were found to be different from each other. The extracted with glycerol had high storage stability in both dark and light compared to other solvents.

Keywords: *Alcea apterocarpa*, Biosolvent, Glycerol, 1,3-Butanediol, Ethyl alcohol

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışma konumun belirlenmesinde, laboratuardaki çalışmalarım sürecinde, sonuçların değerlendirilmesi ve yazım aşamasında göstermiş olduğu ilgi ve katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Prof. Dr. İlky KOCA'ya,

Gıda Mühendisliği Bölümü'nden arkadaşlarım Dr. Hojjat PASHAZADEH, Dr. Mohamed GHELLAM, Dr. Oscar ZANNOU, Begüm Ceren DUYAN ve Beyza KABA'ya da sonsuz destekleri için ayrıca teşekkür ederim.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü ve diğer bölümlerde görev yapan tüm araştırma görevlilerine desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde yardımlarını esirgemeyen, her koşulda yanımda olan ve maddi/manevi desteğini her zaman üzerimde hissettiğim annem Şafak ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Botanik teşhisi yapan, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden Sayın Prof. Dr. Erkan YALÇIN'a teşekkür ederim.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi'ne bu projeyi finanse ettiği için teşekkür ederim (PYO.MUH.1904.20.013).

Ayşegül ÖZKAN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Malvacea Familyası	3
2.1.1. <i>Alcea</i> L.	3
2.1.1.1. <i>Alcea apterocarpa</i> (FENZL) BOISS Bitkisinin Özellikleri, Halk Hekimliğinde Kullanım Şekilleri.....	4
2.1.1.2. <i>Alcea apterocarpa</i> İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar.....	6
2.2. Fenolik Bileşikler.....	8
2.2.1. Antosiyaninler.....	11
2.3. Yeşil Kimyanın Temsilcisi Olarak Biyosolventler	13
2.4. Biyosolventler.....	15
2.4.1. Gliserol.....	15
2.4.1.1. Biyoaktif Ekstraksiyonunda Gliserol Kullanımıyla İlgili Çalışmalar	17
2.4.2. 1,3-Bütandiol	22
2.4.2.1. 1,3-Bütandiol İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	23
2.4.3. Etil Alkol.....	23
2.4.3.1. Etil Alkol İle İlgili Yapılan Çalışmalar	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyal	30
3.2. Yöntem	30
3.2.1. <i>Alcea apterocarpa</i> 'nın Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi ..	30
3.2.1.1. Rengin Belirlenmesi	30
3.2.1.2. Kuru Madde Tayini	30
3.2.1.3. pH Tayini	31
3.2.2. Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Analizi	31
3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde Tayini	31
3.2.2.2. Toplam Antosiyanin Tayini	31
3.2.2.3. Toplam Flavonoid Tayini.....	32
3.2.2.4. DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) Serbest Radikalini Giderme Etkisinin Saptanması	32
3.2.2.5. Demir İndirgeme Antioksidan Gücünün (FRAP) Belirlenmesi.....	32
3.2.3. Optimum Noktalarda Yapılan Analizler	33
3.2.3.1. Optimum Koşullarda Biyoçözücülerin Özelliklerinin Belirlenmesi.....	33
3.2.3.2. Optimum Koşullarda Biyoçözücülerle Elde Edilen Ekstraktların Özelliklerinin Belirlenmesi	33
3.2.3.2.1. Depolama Stabilitesi	33
3.2.3.2.2. Işık Stabilitesi.....	33
3.2.3.2.3. Bireysel Antosiyanin Dağılımının Belirlenmesi	34
3.2.4. Deneme Deseni ve Yanıt Yüzey Yöntemi	34
3.2.5. İstatistiksel Analizler.....	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. <i>Alcea apterocarpa</i> 'nın Bazı Özellikleri.....	36
4.2. Biyoçözücüler İle Yapılan Ekstraksiyon Sonuçları	36

4.2.1. Gliserol İle Yapılan Ekstraksiyon Sonuçları.....	37
4.2.2. 1,3-Bütandiol İle Yapılan Ekstraksiyon Sonuçları.....	43
4.2.3. Etil Alkol İle Yapılan Ekstraksiyon Sonuçları.....	47
4.3. Optimum Koşullarda Biyoçözücü ve Ekstraktların Özellikleri	52
4.3.1. Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi	57
4.3.2. Optimum Koşullarda Elde Edilen Ekstraktların Pigment İçeriği Üzerine Depolamanın Etkisi.....	59
4.3.3. Optimum Koşullarda Elde Edilen Ekstraktların Antosiyanin İçeriği Üzerine Işığın Etkisi	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR	67



SİMGELER VE KISALTMALAR

ABTS	: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
AlCl ₃	: Alüminyum klorür
ANOVA	: Tek yönlü varyans analizi
CH ₃ COONa	: Sodyum asetat
CYN-3-GLU	: Siyanidin-3-glikozit
CYN-3-RUT	: Siyanidin-3-rutinozit
CYN-CL	: Siyanidin klorit
DDPH	: 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil
DES	: Derin ötektik çözücü
F	: F değeri
FeCl ₃	: Demir (III) klorür
FeSO ₄	: Demir (II) sülfat
FRAP	: Demir indirgeme antioksidan gücü
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HCl	: Hidroklorik asit
Hg	: Cıva
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPLE	: Yüksek basınçlı sıvı ekstraksiyonu
M	: Molar
mmol	: Milimol
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
NaNO ₂	: Sodyum nitrit
NaOH	: Sodyum hidroksit
nm	: Nanometre
P	: P değeri
PLG-3-GLU	: Pelargonidin-3-glikozit
R ²	: Regresyon katsayısı
RSM	: Yanıt yüzeyi metodolojisi
TA	: Toplam antosiyanin
TF	: Toplam flavonoid
TP	: Toplam fenol
TPTZ	: 2,4,6- tripiridil s-triazin
UV-VIS	: Morötesi-görünür ışık spektrofotometresi
W	: Watt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>A. apterocarpa</i> 'nın ülkemizdeki yayılış alanları	4
Şekil 2.2. <i>A. apterocarpa</i> türünün genel ve şematik görünümü.....	5
Şekil 2.3. Fenollerin yapısı	8
Şekil 2.4. Antosiyaninlerin genel yapısı	12
Şekil 2.5. Gliserolün kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.6. 1,3-bütandiolün kimyasal yapısı	22
Şekil 2.7. 1,3-bütandiol üretimi	23
Şekil 2.8. Petrokimya endüstrisinde etanol sentezi.....	24
Şekil 3.1. Taze ve kuru gülfatma çiçeklerinin görünümü	30
Şekil 3.2. Işık stabilitesi testinin uygulanışı.....	34
Şekil 4.1. Sıcaklık ve gliserol konsantrasyonunun a) toplam fenolik madde b) toplam flavonoid üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri ...	40
Şekil 4.2. Sıcaklık ve gliserol konsantrasyonunun toplam antosiyanin üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi.....	41
Şekil 4.3. Sıcaklık ve gliserol konsantrasyonunun DPPH değerleri üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi.....	42
Şekil 4.4. Sıcaklık ve 1,3 bütandiol konsantrasyonunun a) toplam fenolik madde b) toplam antosiyanin üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri	45
Şekil 4.5. Sıcaklık ve 1,3 bütandiol konsantrasyonunun FRAP değerleri üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi.....	46
Şekil 4.6. Sıcaklık ve etil alkol konsantrasyonunun a) toplam fenolik madde b) toplam flavonoid üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri ...	50
Şekil 4.7. Sıcaklık ve etil alkol konsantrasyonunun toplam antosiyanin üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi.....	51
Şekil 4.8. Sıcaklık ve etil alkol konsantrasyonunun a) DPPH b) FRAP değerleri üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri	51
Şekil 4.9. Gliserol optimum nokta çözeltisi ve bu çözeltiyle elde edilen ekstrakta ait spektrum	53
Şekil 4.10. 1,3-bütandiol optimum nokta çözeltisi ve bu çözeltiyle elde edilen ekstrakta ait spektrum	53
Şekil 4.11. Etil alkol optimum nokta çözeltisi ve bu çözeltiyle elde edilen ekstrakta ait spektrum	54
Şekil 4.12. 3 biyoçözücüyle optimum noktada elde edilen ekstraktlara ait spektrumlar	54
Şekil 4.13. Gliserol ekstraktlarındaki antosiyaninlere ait kromatogram.....	58
Şekil 4.14. 1,3-bütandiol ekstraktlarındaki antosiyaninlere ait kromatogram	58
Şekil 4.15. Etil alkol ekstraktlarındaki antosiyaninlere ait kromatogram.....	58
Şekil 4.16. Oda sıcaklığında depolanan biyoçözücü ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarındaki değişimi.....	60
Şekil 4.17. Işıktaki depolanan ekstraktların 4. hafta sonundaki görünümleri	61

Şekil 4.18. Işıktta depolanan ekstraktların toplam antosiyanin içeriklerindeki değişim..... 61



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>Alcea L.</i> 'nin taksonomisi	4
Tablo 2.2. <i>A.apterocarpa</i> 'nın karakteristik özellikleri.....	5
Tablo 2.3. Gülfatma çiçeğinin tedavi amaçlı kullanım şekilleri	6
Tablo 2.4. Karbon zincirlerine göre fenolik bileşiklerin ana sınıfları.....	9
Tablo 3.1. Antosiyanin kompozisyonunu belirlemede kullanılan cihaz ve kolon özellikleri ile kromatografik koşullar	34
Tablo 3.2. Farklı çözücüler için merkezi kompozit deneysel tasarımı.....	35
Tablo 4.1. Gliserol için bağımsız değişkenler ve yanıtlar.....	37
Tablo 4.2. Gliserol için ANOVA tablosu	39
Tablo 4.3. Gliserol için deneysel veriler yardımıyla elde edilen formüller	42
Tablo 4.4. Gliserol için istenilirlik fonksiyonuna göre optimum şartlardaki tahmini değerler	42
Tablo 4.5. 1,3-bütandiol için bağımsız değişkenler ve yanıtlar	43
Tablo 4.6. 1,3 bütandiol için ANOVA tablosu	44
Tablo 4.7. 1,3 bütandiol için deneysel veriler yardımıyla elde edilen formüller	46
Tablo 4.8. 1,3 bütandiol için istenilirlik fonksiyonuna göre optimum şartlardaki tahmini değerler	47
Tablo 4.9. Etil alkol için bağımsız değişkenler ve yanıtlar.....	47
Tablo 4.10. Etil alkol için ANOVA tablosu.....	49
Tablo 4.11. Etil alkol için deneysel veriler yardımıyla elde edilen formüller	52
Tablo 4.12. Etil alkol için istenilirlik fonksiyonuna göre optimum şartlardaki tahmini değerler	52
Tablo 4.13. Optimum koşullarda elde edilen solventlerin viskozite değerleri.....	53
Tablo 4.14. Biyoçözücülere göre tahmini verimler	55
Tablo 4.15. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların antioksidan özellikleri	55
Tablo 4.16. Biyoçözücülerle hazırlanan ekstraktların antosiyanin profili	57
Tablo 4.17. Oda sıcaklığı ve depolama süresinin biyoçözücü ekstraktlarının toplam antosiyanin değerleri (mg/g) üzerine etkisi	59

1. GİRİŞ

Antik çağlardan beri insanlar bitkilerden, besin kaynağı olarak veya koku ve tat verici, ilaç, yakıt veya silah kaynağı olarak faydalanmışlardır. Özellikle tıbbi bitkilerden elde edilen ekstraktlar, birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. 1800'lü yıllarda sentetik olarak üretilen ilk etken maddeler, bitkilerden elde edilmiştir. Bunun sonucunda ilaç endüstrisi doğmuştur (Ertas vd., 2016). Modern ilaç sanayindeki gelişmeye rağmen geleneksel ilaçlara tüm dünyada halen başvurulmaktadır. Özellikle, tıbbi bitkilerin ekstrakt ve yağları, ham ve işlenmiş olarak gıda, eczacılık, alternatif tıp ve doğal tedaviler gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Günümüze kadar insan sağlığı için kullanılan ilaçların yaklaşık % 25'i doğal bitkilerden elde edilmiştir (Benli vd., 2007).

Türkiye, bitki çeşitliliği açısından oldukça önemli ve zengin bir floraya sahiptir. Üç coğrafik bölgenin kesiştiği ve Güney Avrupa ile Güneybatı Asya ve Anadolu arasında köprü oluşturan bir bölgede yer alan ülkemizde birçok bitki kendiliğinden yetişmektedir, yani endemik türlerin sayısı fazladır (Benli vd., 2007). Her geçen gün yeni endemik taksonların keşfiyle tür sayısı da artmaktadır (Şenkul ve Kaya, 2017). Sağlığı geliştirici potansiyeli ve farmakolojik özellikleri nedeniyle bu bitkilerin önemli kısmı halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Anlas vd., 2017).

Malvaceae familyası, dünyada ve Türkiye'de yayılım gösteren farklı renkte çiçek açan bir bitki topluluğudur. Bu familyaya ait bitkiler, palmitik ve linoleik asitler gibi önemli tohum yağı bileşenlerinin varlığı ile karakterize edilmiş, içeriğinde bulunan müsilaj, uçucu olmayan yağlar ve esansiyel yağlar nedeniyle dünya çapında birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Erarslan ve Koçyiğit, 2019).

Gülfatma (*Alcea apterocarpa* (Fenzl) Boiss.), Malvaceae familyasına ait bir bitkidir. Türkiye'de doğal olarak yetişen bu bitki çeşitli yörelerde Huri, Hürin ya da Hürri olarak bilinir (Ertas vd., 2016; Anlas vd., 2017). Bu bitkiden yapılan dekoksasyon, boşaltım sistemi ve akciğer rahatsızlıklarına, özellikle de böbrek taşlarına karşı halk hekimliğinde kullanılır. Ayrıca, bu türün kök ve sürgünlerinden hazırlanan infüzyon ve dekoksasyonlardan, cilt hastalıkları ve yara tedavilerinde faydalanılır (Anlas vd., 2017).

Gülfatma çiçekleri, önemli antosiyanin kaynaklarından biridir. Antosiyaninler, bitkilerde doğal olarak bulunan ve antioksidan özellik gösteren, fenolik bileşiklerin

bir alt sınıfı olan flavonoidler grubuna mensup pigmentlerdir. pH'ya bağı olarak turuncu, pembe, kırmızı, mavi ve mor gibi değişik renkler sağlarlar (Pazmiño-Durán vd., 2001; Özen ve Akbulut, 2008; Aztekin ve Kasım, 2017). Doğada yaygın olan bu pigmentler; meyve, sebze, çiçekli bitkilerin taç yaprakları, gövde ve depo organları gibi çeşitli kısımlarda bulunmaktadır (Pazmiño-Durán vd., 2001; Cooper-Driver, 2001; Aztekin ve Kasım, 2017). Suda çözünebilir özellikte olan antosiyaninler, bilinen en iyi ve doğal gıda pigmentleridir. Gıda endüstrisinde sentetik boyalar yerine tercih edilen bu pigmentler, renklendirici özellikleri dışında sahip oldukları güçlü antioksidan kapasitesi ve sağlık üzerine olumlu etkileriyle ilgi çekmektedirler (Pazmiño-Durán vd., 2001; Özen ve Akbulut, 2008).

Son yıllarda antosiyaninlerin gıda endüstrisinde geniş çaplı kullanımları nedeniyle çeşitli bitkisel materyallerden eldesi konusunda çalışmalar yoğunlaşmıştır (Hepsağ vd., 2012). Antosiyaninlerin yapısı birbirlerine göre farklılık göstermektedir. Dolayısıyla bu bileşiklerin yapısına ve ekstraksiyonun amacına bağı olarak farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Seçilen ekstraksiyon yöntemi basit, hızlı, çevre dostu ve düşük maliyetli olmalıdır (Jahromi, 2019). Bu amaçla hem endüstride hem de akademik anlamda daha güvenli kimyasal prosesleri ve sürdürülebilirliği sağlamak için geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan organik solventler, yerini yeşil kimyada yer alan yeşil çözücülere bırakmaya başlamıştır (Oklu vd., 2019). Yeşil kimyada amaç, ekstraksiyon tekniklerinin basitleştirilmesi ve tehlikeli reaktifler yerine yenilenebilir kaynaklardan elde edilen çözücülerin kullanılmasıdır (Tobiszewski, 2019). Yeşil çözücülerden en önemlisi biyosolventlerdir. Günümüzde gıda, kozmetik ve ilaç gibi sektörlerde geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak biyosolventlerle ekstraksiyon ilgi odağı haline gelmiştir (Vovers vd., 2017). Bu teknikle bitkilerden biyoaktif bileşenlerin eldesi konusunda birçok çalışma yapılmıştır (Blidi vd., 2015; Gunathilake vd., 2018; Meziant vd., 2018; El Kantar vd., 2019; Vieira vd., 2020; Kowalska vd., 2021).

Bu çalışma, gülfatma çiçeğinden biyosolventler kullanılarak fenolik bileşiklerin ve antosiyaninlerin eldesinde optimum koşulların belirlenmesi ve elde edilen pigmentin stabilitesinin saptanması amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Malvacea Familyası

Malvaceae, diğ er bir adıyla ebegümeciler, dünyada yaklaşık 243 cins ve 4300'ten fazla türü içeren bir familyadır (Yıldırım vd., 2019). Ülkemizde 10 cins ve 47 türü, doğal olarak yetişmektedir. Kutuplar gibi dünyanın çok soğuk bölgeleri dışında hemen hemen her yerde bulunur, esas yayılım alanı Güney Amerika'dır (Erarslan ve Koçyiğ it, 2019). Bu familyadaki en kalabalık ve en çok rastlanılan cins, bünyesinde barındırdığı 300'e yakın tür ile *Hibiscus*'tur (Fersahoğ lu, 2016).

Malvaceae familyasına ait bitkiler, genellikle yıldız şeklinde tüyleri olan, tek ya da çok yıllık otsu, çalı veya ağ aç tipi bitkilerdir (Fersahoğ lu, 2016; Erarslan ve Koçyiğ it, 2019). Her noddan bir yaprak çıkar ve bu yapraklar, tam veya elsi loplu ve stipullara sahiptir (Erarslan ve Koçyiğ it, 2019). Büyük, parlak, huni şeklinde çiçeklere sahip olan bu familya, hermafrodit ve aktinomorftur (Ş en, 2011; Erarslan ve Koçyiğ it, 2019). Epikaliksler çoğ unlukla mevcuttur. Kaliks 5 çanaktan oluş ur, çanak yapraklar bazen aşağı da birleş ir. Birbirinden bağımsız 5 tane taç yaprağı vardır. Yaprak dizilimi kıvrık biçimde ve sap dibi staminal tüple kaynaş mış haldedir. Stamenler stillerin etrafında bir sütunda birleş ir. Sütun, yaprağ ın uç kısmında filamentlere bölünür ve her bir filament tek hücreli bir anter taş ır. Polen taneleri büyük ve dikenlidir. Meyve genellikle çok sayıda merikarpa ayrılan, nadiren kapsüle olan bir ş izokarptır (Erarslan ve Koçyiğ it, 2019).

2.1.1. *Alcea* L.

Malvaceae familyasının bir üyesi olan *Alcea* L. cinsi, Akdeniz bölgeleri ve Orta Asya'ya özgüdür (Anlas vd., 2017). Ağırlıklı olarak İ ran-Turan fitocoğ rafik bölgesinde yayılış göstermekte ve Türkiye'de 20, dünya genelinde ise 70'e yakın türden oluş maktadır. *Alcea* türleri Anadolu'da Hatmi olarak adlandırılmaktadır (Ertas vd., 2016). *Alcea* L.'nin taksonomik sıralaması Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Alcea L. türleri basit veya dallanmış bir yapıya sahiptir. Silindirik bir gövdesi olup, çapı 3 cm'dir (Büyükbayram, 2019). Çoğ unlukla, basit, loblu, palmatipartit veya palmatisekt yaprakları olan, az çok belirgin yıldızsı ve fasikülat tüyleri olan, uzun boylu hemikriptofitlerden oluş maktadır (García vd., 2012). 2-15 mm boyutundaki stipullar, basit veya 2-3 parçalıdır ve tüyleri yıldızsı, hirsut veya pilos şeklindedir. Çiçekler 1 ila 5 adet aralığında olup, yaprak koltuklarına veya

pedüncüllere yerleşmişlerdir. Çiçek sapı 0.1-16 cm olup, stipullar gibi yıldızsı, hirsut veya kadifemsi tüylüdür (Büyükbayram, 2019). Petaller, mor-leylak rengi, beyaz, pembe, sarı veya eflatun gibi çeşitli renklere sahiptir (Uzunhisarcıklı, 2008).

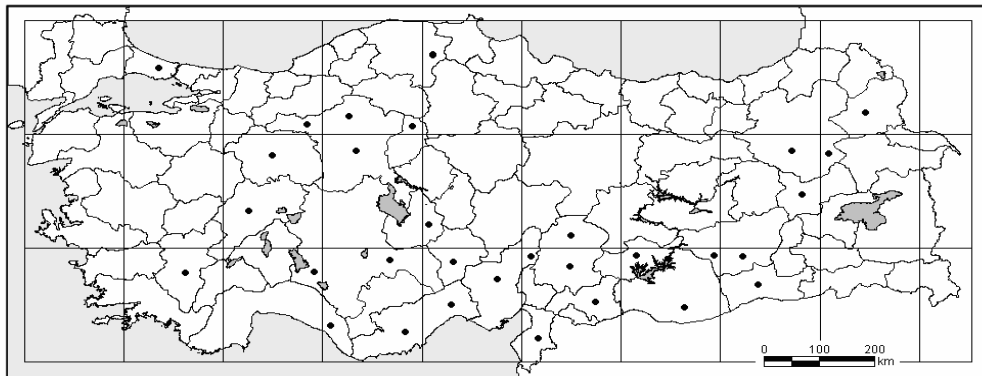
Tablo 2.1. *Alcea* L.'nin taksonomisi (Fersahoğlu, 2016)

Alem	Plantae - Bitkiler
Alt alem	Tracheobionta - Tracheophyta (Damarlı bitkiler)
Üst bölüm	Spermatophyta (Tohumlu bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Çiçekli bitkiler)
Sınıf	Magnoliopsida- Dicotyledonae (Çift çenekliler)
Alt sınıf	Dilleniidae
Ordo	Malvales
Familya	Malvaceae - Ebegümciler
Cins	<i>Alcea</i>

Alcea türlerinin çiçeklerinden hazırlanan infüzyonlar, halk tıbbında balgam söktürücü ve tahriş önleyici ilaçlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Aydın vd., 1992). Sağlık üzerine tedavi edici özellikleri sayesinde, *Alcea* türlerinden biri olan *Alcea apterocarpa* (Fenzl) Boiss ön plana çıkmaktadır.

2.1.1.1. *Alcea apterocarpa* (FENZL) BOISS Bitkisinin Özellikleri, Halk Hekimliğinde Kullanım Şekilleri

Alcea apterocarpa çok yıllık otsu bir bitkidir (Sürmen vd., 2016; Anlas vd., 2017). Ülkemizde doğal olarak yetişmekte olup geniş bir yayılım göstermektedir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. *A. apterocarpa*'nın ülkemizdeki yayılış alanları (Uzunhisarcıklı, 2008)

Hem Türkiye'de hem de Irak ve Mısır'da çok geniş bir yayılış gösteren *A. apterocarpa*'nın çiçeklenme dönemi, Mayıs-Ağustos ayları arasındadır. Makilik, taşlık alanlar, tarım alanları, step, yol kenarı, kalker kayalık, kayalık yamaçlar, orman altı ve açıklıkları gibi farklı ortamlarda yetişen bu çiçeğin genel ve şematik görünümü

ile karakteristik özellikleri Şekil 2.2. ve Tablo 2.2.'de verilmiştir (Uzunhisarcıklı, 2008).



Şekil 2.2. *A. apterocarpa* türünün genel ve şematik görünümü (Uzunhisarcıklı, 2008)

Tablo 2.2. *A. apterocarpa* 'nın karakteristik özellikleri (Uzunhisarcıklı, 2008; Büyükbayram, 2019)

Boyu	30-180 cm
Gövde çapı	3-6 mm
Gövde durumu	Gövde uzunluğu normal, silindirik ve yoğun tüylü
Gövde yaprak durumu	Orbikular, tabanı kordat, trunkat, kenarı krenat, ucu obtus, 5-9 loblu
Gövde yaprak uzunluğu	3-15 x 4-17 cm
Yaprak durumu	Palmatilobat-palmatipartit, üst yüzü seyrek, alt yüzü yoğun yıldızsı tüylü
Taban yaprak sap uzunluğu	14 cm
Taban yaprak durumu	5 loblu, orbikular, tabanı trunkat, kordat, kenarı krenat, ucu obtus
Taban yaprak genişlik ve uzunluğu	13-13.7 cm, 8.4 cm
Yaprak sapı durumu	Yıldızsı tüylü, stipul yok, loblar linear-lanseolat, kenarı düz, ucu akuminat
Üst yaprak sapı uzunluğu	2 cm
Üst yaprak genişliği ve uzunluğu	4.4-4 cm
Çiçek yaprakları durumu	Orbikular, lanseolat, tabanı kuneattrunkat, kordat, kenarı krenat-serrat, ucu obtus, 3-5 loblu
Çiçek yaprakları uzunluğu	0.8-8.5 x 0.9-10 cm
Çiçek sapı uzunluğu	1-2.5 cm; çiçek durumu raşem ve her koltuktan 2-3 adet çıkar.
Çiçek rengi	Beyazdan sarıya
Petal durumu	Beyaz, sarı veya pembe-mor, kenarı düz, ucu düz veya emerginat, tabanda birleşme yerlerinde beyaz pilos tüylü
Petal sayısı ve uzunluğu	5 adet ve 4-5 cm
Epikaliks durumu	Tabanda birleşik
Epikaliks sayısı ve uzunluğu	6-9 parçalı, 0.7 cm
Kaliks sayısı ve uzunluğu	5 parçalı, 1.7 cm
Sepal durumu	Tabanda birleşik, belirgin çizgili veya değil, lanseolat, kenarı düz, ucu obtus, akuminat, yoğun yıldızsı pilos tüylü
Sepal uzunluğu	8-22 x 3-7 mm
Filament	Sırt kısmından bağlı, tüysüz
Merikarp durumu	Orbikular, kahverengi, sırt kısmı kanatsız, belirgin şekilde buruşuk veya değil, yıldızsı-pilos tüylü, yan kısımlar pilos tüylü
Merikarp Uzunluğu	3-6 x 3.5-5.5 mm
Tohum Durumu	Böbreksi, kahverengi, yüzeyi tüberküllü, sırt kısmı ve hilumun etrafı seyrek-yoğun pilos tüylü
Tohum Boyutu	2-3 x 3-4 mm

Gülfatma çiçeği, sahip olduğu antioksidan, antikolinesteraz ve antimikrobiyal aktiviteleri sayesinde, çeşitli kullanım şekilleri ile halk hekimliğinde ön plana çıkan

bitkilerdendir (Azab, 2016). Literatürde gülfatma çiçeğinin tıbbi kullanımına ilişkin yapılan birçok çalışma mevcuttur (Tablo 2.3.).

Tablo 2.3. Gülfatma çiçeğinin tedavi amaçlı kullanım şekilleri

Yerel İsmi	Kullanılan Kısım	Kullanım Amacı	Kullanım Şekli	Kaynak
Huri Hüri Hürun Hurin	Açıkta yetişen kısımlar	Bağırsak ve mide rahatsızlıkları Öksürük Yaraların iyileşmesi	İnfüzyon, dekoksasyon Doğrudan haşlanmış veya çiğ yumurta ile karıştırılarak	Yeşil ve Akalın, 2009
Huri Hüri Hürun Hurin	Kök	Hemoroid, iltihaplı yara ve normal yaraların iyileşmesi	Ezme, tereyağı ve un ile karıştırılarak, hamur halinde	Yeşil ve Akalın, 2009
Hatmi	Açıkta yetişen kısımlar	Cilt enfeksiyonları	Kaynatma	Mart ve Türkmen, 2018
Gülhatun Gülhatmi	Kök, çiçek	Karın ağrısı Öksürük Bronşit	İnfüzyon, dekoksasyon	Ezer ve Mumcu Arısan, 2006
Huri	Kök, sürgün, ot	Yara iyileşmesi, iltihap önleyici, cilt rahatsızlıkları, üriner sistem rahatsızlıkları, böbrek taşları, akciğer rahatsızlıkları, bağırsak rahatsızlıkları, mide rahatsızlıkları, öksürük	İnfüzyon, dekoksasyon	Azab, 2016
Ebegümece	Taze yaprakları ve küçük sapları	Öksürük	Haşlama, soğanla kavurma, diğer otlarla karışık pişirme, kırık buğdayla pişirme	Demir vd., 2017
Fatmagül çiçeği	Çiçek	Astım, bronşit, balgam söktürücü, idrar söktürücü, iltihap giderici, kuru öksürük	Çay	Aksoy vd., 2016
Hatmi Hıra otu	Çiçek	Hemoroid tedavisi, soğuk algınlığı, astım, bronşit, öksürük, adet düzenleyici, iltihap sökücü	Çay, sütle kaynatma Hemoroid tedavisinde çiçeğin ezilip uygulanması	Aslan vd., 2020

Gülfatma çiçeğinin kaynatılmasıyla elde edilen çayı, halk hekimliğinde üriner sistem ve akciğer rahatsızlıkları, bağırsak ve mide rahatsızlıkları, konjonktivit, öksürük, mantar enfeksiyonu, siğil tedavisi ve böbrek taşlarına karşı kullanılmaktadır (Ertas vd., 2016; Anlas vd., 2017).

2.1.1.2. *Alcea apterocarpa* İle İlgili Yapılan Bazı Çalışmalar

Benli vd. (2007), Türkiye’de yetişen bitki türlerinden *Alcea apterocarpa*, *Heracleum paphlagonicum*, *Stachys cretica subsp. anatolica* ve *Verbascum eriocarpum* yaprak, çiçek ve tohumlarından elde edilen altı bitki ekstraktını, 10’u bakteri (*Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* RSHI, *E. coli* ATCC 25922, *Shigella* RSHI, *Streptococcus pyogenes*,

Staphylococcus aureus, *Listeria monocytogenes* ve *Pseudomonas aeruginosa*), 4'ü maya (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* 845981, *C. albicans* 900628 ve *Candida crusei*) olmak üzere toplam 14 mikroorganizma üzerinde test etmişlerdir. *Alcea apterocarpa* tohum ve çanak yaprak metanol ekstraktının *P. aeruginosa*'ya karşı, *V. eriocarpum* çiçek ekstraktının *S. aureus*'a karşı, *S. cretica subsp. anatolica* yaprak ve çiçek ekstraktı ile *H. paphlagonicum* tohum ekstraktının *B. subtilis*'e karşı etkili olduklarını, ancak *Alcea apterocarpa* ve *H. paphlagonicum* yaprak ekstraktlarının hiçbir mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite göstermediğini belirlemişlerdir. Aynı zamanda standart antibiyotiklerle bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerini kıyaslamışlardır. Sonuç olarak bitki ekstraktlarının antibiyotiklerle benzer etkiye sahip olduğunu ve *Alcea apterocarpa* tohum ve çanak yaprak ekstraktının, *P. aeruginosa*'ya karşı bu antibiyotiklerden daha fazla inhibe edici bir davranış sergilediğini gözlemlemişlerdir.

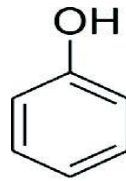
Ertas vd. (2016), *Alcea pallida* ve *Alcea apterocarpa*'nın yağ asidi, esansiyel yağ ve fenolik bileşimi ile petrol eter, aseton, metanol ve su ekstraktlarının antioksidan, antikolinesteraz ve antimikrobiyal aktivitelerini incelemişlerdir. Esansiyel yağların ana bileşenlerini *A. pallida* ve *A. apterocarpa* için sırasıyla % 34.2 ile araşidik asit ve % 25.3 ile heksatriyakontan olarak belirlemişlerdir. Çiçeklerin petrol eter ekstraktları kullanılarak elde edilen yağ asitlerinin ana bileşenlerini GC/MS vasıtasıyla *A. pallida* ve *A. apterocarpa* için sırasıyla % 31.2 ile palmitik asit ve % 25.6 ile oleik asidin oluşturduğunu belirlemişlerdir. Bitkilerin fenolik kompozisyonunu HPLC yardımıyla incelemişlerdir. Her iki bitkinin de askorbik, kafeik, salisilik ve p-hidroksibenzoik asitler ve kersetin içerdiğini, bunların içerisinde de en çok salisilik asidin bulunduğunu tespit etmişlerdir. DPPH ve ABTS yöntemlerini kullanarak inceledikleri antioksidan aktivitelerine göre fenolikler ve flavonoid içeriği açısından en zengin olanın, *A. pallida*'nın aseton ekstraktı olduğu sonuca varmışlardır. Test edilen 8 ekstrakt arasından, *A. pallida* aseton ekstraktının ön plana çıktığını ve bütiril-kolinesteraz enzimine karşı en yüksek inhibisyonu gösterdiğini bulmuşlardır. Ancak *A. pallida*'nın asetil-kolinesteraz enzimine karşı hiçbir ekstraktın anlamlı bir aktivite göstermediğini kaydetmişlerdir. Ekstraktların gram pozitif bakterilerden *Streptococcus pyogenes* ve *Staphylococcus aureus*, gram negatif bakterilerden *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*, mayalardan *Candida albicans*'a karşı petrol eter ve su ekstraktlarının, hiçbir aktivite

göstermediği, metanol ekstraktlarının ise zayıf bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bitkilerin aseton ekstraktlarının ise *A. pallida* için *E. coli*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*'ya karşı zayıf bir antimikrobiyal aktivite, *C. albicans*'a karşı orta derecede aktivite; *A. apterocarpa* için *C. albicans* ve *S. aureus*'a karşı orta derecede bir antimikrobiyal aktivite, *E. coli*, *S. pyogenes* ve *P. aeruginosa*'ya karşı zayıf bir aktivite sergilediğini saptamışlardır.

Anlas vd. (2017), Türkiye'de endemik bitki türlerinden olan *Achillea nobilis* subsp. *sipylea* ve *Alcea apterocarpa*'dan elde edilen farklı ekstraktların antioksidan aktivitelerini ve toplam fenolik içeriklerini karşılaştırmışlardır. Çalışmada, sokselet ekstraksiyonu, maserasyon, infüzyon ve dekoksasyon olmak üzere 4 farklı ekstraksiyon yöntemi kullanmışlardır. Sokselet ve maserasyon tekniklerinde hem ayrı ayrı hem de arka arkaya iki farklı çözücü (% 96 etanol ve n-hekzan) ile ekstraksiyon yapmışlardır. *Alcea apterocarpa* bitkisinde yapılan ekstraksiyonlar arasında en yüksek toplam fenolik bileşik verimini, etanol ile yapılan maserasyonda kaydetmişlerdir. *Achillea nobilis* subsp. *sipylea* bitkisinde ise en yüksek toplam fenolik bileşik, dekoksasyon ve infüzyon teknikleriyle elde edilmiştir. *Achillea nobilis* subsp. *sipylea*'nin fenolik bileşikler bakımından daha zengin bir kaynak olduğunu rapor etmişlerdir. En etkili ve en yüksek radikal süpürme aktivitesini; *Alcea apterocarpa*'da, sokselet ve infüzyonla elde edilen ekstraktlarda, *Achillea nobilis* subsp. *sipylea* bitkisinde ise infüzyon ve dekoksasyon ekstraktlarında belirlemişlerdir.

2.2. Fenolik Bileşikler

Basit fenoller ve fenolik asitler, hidroksisinamik asit türevleri ve flavonoidler dahil olmak üzere fenolik bileşikler, gıda bitkilerinde yaygın olarak bulunan biyoaktif maddelerdir. Taze ve işlenmiş bitkisel gıdaların duyusal ve besinsel kalitesi ile yakından ilişkilidirler (Ho, 1992). Fenolün kendisi, bir hidroksil grubu ile ikame edilmiş bir benzen halkasıdır. Bu nedenle sistematik adı hidroksibenzendir (Şekil 2.3.) (Al Mamari, 2021).


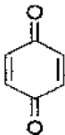

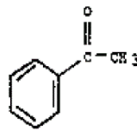
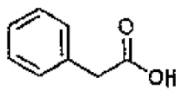
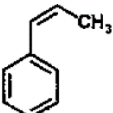
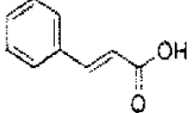


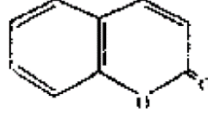
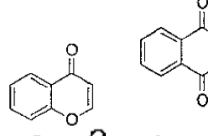
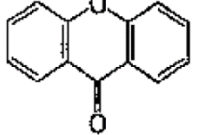
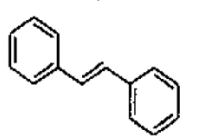
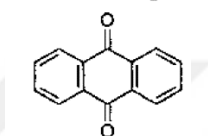
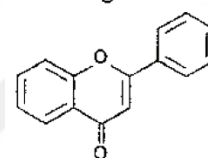
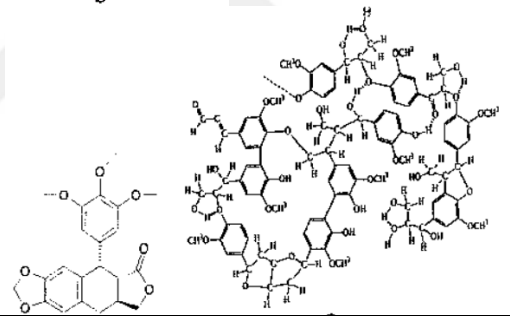
Şekil 2.3. Fenollerin yapısı (Al Mamari, 2021)

Fenolik bileşikler, basit moleküllerden yüksek düzeyde polimerize bileşiklere kadar değişen çok sayıda heterojen yapıda oluşturuldukları için farklı şekillerde sınıflandırılabilirler (Reis Giada, 2013). Temel olarak fenolik asitler ve flavonoidler şeklinde iki gruba ayrılırlar. Fenolik asitler bitkilerde çoğunlukla organik asit olarak veya şekerlerle esterleşmiş formda bulunurlar. Kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, sinapik asit, klorojenik asit, gallik asit, vanilik asit gıdalarda sık rastlanan fenolik asitlere örnektir. Flavonoidler ise fenolik bileşikler içinde en önemli grubu oluştururlar (Yeşilören Akal, 2019). Doğada 400'den fazla flavonoid tanımlanmış olup, halka yapılarına göre; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler, antosiyanidinler ve izoflavonoidler gibi isimler almaktadırlar (Turhan ve Üstün, 2006).

Fenolik bileşikler, basit moleküllerden yüksek düzeyde polimerize bileşiklere kadar değişen, çok sayıda heterojen yapıda oluşturuldukları için karbon zincirlerine göre de 16 ana sınıfa ayrılabilirler. Fenolik bileşiklerin karbon zincirlerine göre ana sınıfları Tablo 2.4.'de görülebilir (Reis Giada, 2013).

Tablo 2.4. Karbon zincirlerine göre fenolik bileşiklerin ana sınıfları (Reis Giada, 2013)

Sınıf	Ana İskelet	Yapı
Basit fenoller	C ₆	
Benzokinonlar	C ₆	
Fenolik asitler	C ₆ -C ₁	
Asetofenonlar Fenilasetik asitler	C ₆ -C ₂	 
Hidroksisinnamik asitler Fenilpropenler	C ₆ -C ₃	 

Kumarinler İzokumarinler	C ₆ -C ₃	
Kromonlar Naftokinonlar	C ₆ -C ₃ C ₆ -C ₄	
Ksantonlar	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Stilbenler	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Antrakinonlar	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Flavonoidler	C ₆ -C ₃ -C ₆	
Lignanlar ve Neolignanlar Lignanler	(C ₆ -C ₃) ₂ (C ₆ -C ₃) _n	

Gıdalarda bulunan fenolik bileşikler antioksidan aktiviteleri sayesinde, çeşitli hastalıkları önlediği ve insan sağlığı üzerine güçlendirici ve teşvik edici etkilere sahip olduğu için beslenme açısından önemlidir. Ayrıca bazı durumlarda bu bileşikler farmakolojik özelliklerinden dolayı tedavi amaçlı da kullanılabilir. Timol gibi düşük moleküler ağırlıklı birçok fenolik bileşik, toksisitesi nedeniyle tıpta antiseptik olarak kullanılmaktadır. Ancak fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi büyük ölçüde bu maddelerin kimyasal yapısına bağlıdır. Bilinen antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşikler arasında flavonoidler, tanenler, kalkanlar ve kumarinler ile fenolik asitler ön plana çıkmaktadır (Reis Giada, 2013).

Fenolik bileşikler, antioksidan aktivitelerinin yanı sıra, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve antitrombotik özellikler gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir. Bu özellikler fenolik bileşiklerin kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, kanser

ve hipertansiyon gibi çeşitli hastalıkları önlemesine yardımcı olur. Bu nedenle ilaç endüstrisinde terapötik ajan olarak kullanılabilirler. Antioksidan ve antimikrobiyal özellikler, fenolik bileşiklerin gıda koruyucuları ve katkı maddeleri olarak işlev görmesini sağlar. Bu nedenle gıda endüstrisinde de uygulamaları vardır. Ayrıca fenolik bileşiklerin kozmetik ve ambalaj endüstrilerinde uygulamaları vardır (Al Mamari, 2021).

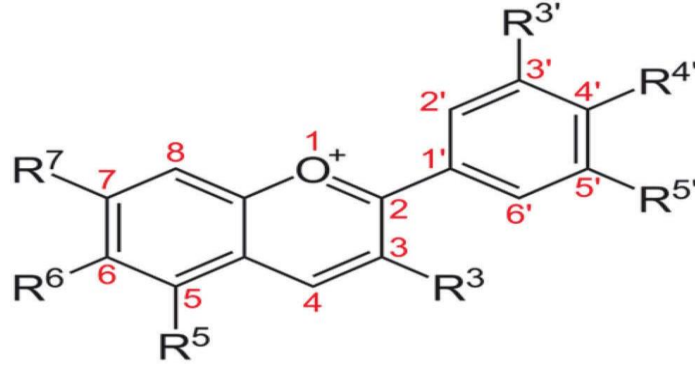
Gıdalarda bulunan birçok fenolik bileşiğin mutajenez ve karsinogenez üzerinde inhibitör etkileri olması ve doğal maddelerin veya fenolik antioksidanlar içeren gıda bileşenlerinin kullanımına ilişkin yapılan araştırmalar, son yıllarda gıda endüstrilerinin ilgisini çekmektedir (Ho, 1992). Bitki ekstraktlarında bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, bu bileşiklerin koruyucu olarak uygulanması için çok önemli olmuştur, böylece çeşitli gıda maddelerinin raf ömrünü arttırmıştır (Albuquerque vd., 2020).

2.2.1. Antosiyaninler

Antosiyanin kelimesi, Yunanca kökenli olup 'anthos' (çiçek) ve 'kyanos' (mavi) anlamına gelen iki kelimenin birleşmesiyle oluşmaktadır (Yeşilören Akal, 2019). Çiçek ve meyvelerin renkleri, başlıca karotenoidler, betasiyaninler, antosiyaninler ve diğer flavonoidler (flavonlar ve flavonoller) olmak üzere farklı pigment gruplarından kaynaklanmaktadır. Antosiyaninler, çiçekli bitkilerin taç yapraklarındaki pembeden maviye kadar değişen geniş renk yelpazesinden sorumludurlar. Yapısal olarak antosiyaninler, 2-fenil benzopirilyum (flavilyum) tuzlarının glikolize edilmiş polihidroksi/metoksi türevleridir (Cooper-Driver, 2001). Antosiyaninler, şekerler ve şeker olmayan kısımlar (aglikon) şeklinde iki bölümden oluşur (Yeşilören Akal, 2019). Antosiyaninler, antosiyanidinlerin yani aglikonların glikosile edilmiş formlarıdır. Bu bileşikler, farklı pozisyonlarda hidroksile edilmiş bir flavilyum katyon omurgası tarafından oluşturulur (Mattioli vd., 2020).

Doğada tanımlanmış yaklaşık 25 farklı antosiyanidin vardır ve bunlara glikoz, galaktoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz gibi şekerlerin bağlanması ile farklı renklerde antosiyaninler oluşmaktadır (Ramos vd., 2014; Yeşilören Akal, 2019). Bununla birlikte, sadece altı antosiyanidin (siyanidin, delphinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin ve petunidin) doğada yaygın olarak dağılmıştır ve tanımlanan antosiyaninlerin % 90'ından fazlasını oluşturur (Ramos vd., 2014). Bu

antosiyandinlerin meyve ve sebzelerdeki dağılımı sırasıyla % 50, % 12, % 12, % 12, % 7 ve % 7'dir. Antosiyanın genel moleküler yapısı Şekil 2.4.'de gösterilmektedir (Khoo vd., 2017).



Şekil 2.4. Antosiyandinlerin genel yapısı (Khoo vd., 2017)

Antosiyandinler genellikle çiçeklerde ve birçok bitkinin meyvelerinde bulunur. Bu çiçeklerden bazıları geleneksel olarak halk hekimliğinde ve renklendirici ile gıda olarak kullanılmıştır. Geleneksel kullanımının yanı sıra kırmızı, mor ve mavi renkli meyveler faydalı etkileri nedeniyle yaygın olarak tüketilmektedir. Böğürtlen, kuş üzümü ve diğer kırmızı ila mavi renkli meyve türlerinden elde edilen renkli antosiyandin pigmentleri güçlü antioksidanlardır. Ayrıca antosiyandin açısından zengin kara havuç, kırmızı lahana ve mor patates, hastalıkların önlenmesi için tüketilen potansiyel fonksiyonel besinlerdir. Tıbbi değerleri nedeniyle bitki antosiyandinleri üzerine geniş çapta çalışılmıştır. Antosiyandinler, antidiyabetik, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve anti-obezite etkilerinin yanı sıra kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine de yardımcı olur. Bu nedenle, yenilebilir bitkilerden ekstrakte edilen antosiyandinler, potansiyel farmasötik bileşenlerdir (Khoo vd., 2017).

Antosiyandinler hidrofiliktir ve genellikle bitki hücre vakuollerinde bulunur (Cooper-Driver, 2001). Suda çözümleri, sulu gıda sistemlerine dahil edilmelerini kolaylaştırır ve gıda ve farmasötiklerin renklendirilmesinde yüksek kalitede ürün oluşumunu sağlarlar (Pazmiño-Durán vd., 2001; Özen ve Akbulut, 2008). Antosiyandin, gıdalara yalnız çekici renk kazandırmaz, aynı zamanda yüksek antiradikal kapasiteleri nedeniyle, eklendikleri gıdaların oksidatif stabilitelerini de artırır (Özen ve Akbulut, 2008). Bu etkileri sayesinde kanser, nörodejeneratif hastalıklar, aterosklerozis gibi hastalıklara karşı koruyucu olduğu, damar koruyucu, iltihap giderici, trombosit kümeleşmesini önleyici, normal damar geçirgenliğini

koruyucu, diyabet kontrolünü sağlayıcı, tümör gelişimini önleyici ve antiülser gibi sağlık üzerine birçok yararı olduğu bilinmektedir (Özen ve Akbulut, 2008; Ekici, 2011). Antosiyanin hafıza geliştirme, yaşa bağlı ortaya çıkan nöral hastalıkların engellenmesinde de önemli rolü vardır (Ekici, 2011).

Bitkilerde bulunan antosiyaninler geniş bir kullanım alanına sahiptir. Çiçeklerden, meyvelerden ve sebzelerden elde edilen mavi, kırmızı ve mor renkli pigmentler geleneksel anlamda boya ve gıda renklendiricisi olarak kullanılmaktadır (Khoo vd., 2017).

İşlenmiş gıda ve içeceklerde doğal renklendirici ve katkı maddelerinin kullanılması, bu ürünlerin tüketici tarafından kabul edilebilirliğinin artırılması açısından önemlidir. Bitkilerden ekstrakte edilen antosiyanin pigmentleri, düşük veya hiç toksik olmayan doğal renklendiricilerdir. Doğal renklendiriciler, sentetik renklendiricilere kıyasla daha yüksek dozlarda bile tüketilebilir (Khoo vd., 2017).

Antosiyanin pigmentlerini ekstrakte etmek için metanol ve etanol gibi organik çözücülerin kullanılması toksisite sorununa neden olur. Etanol genel olarak güvenli bir ekstraksiyon ortamı olarak kabul edilse de, su bazlı ekstraksiyon kullanılarak antosiyaninlerin izolasyonu daha yeşil bir yol olarak kabul edilir (Khoo vd., 2017).

Antosiyaninler genellikle daha hidrofilik çözücülerle veya daha belirgin sulu bazlı karışımlarla ekstrakte edilir. Bu durum, flavilyum formundaki bileşiklerin iyonizasyon durumunu korumak için çok faydalıdır ve bu amaca, sulu faza inorganik veya organik asitler ilave edilerek ulaşılabilir. Örneğin etanol veya metanol ile ekstraksiyonda HCl, formik asit veya sitrik asit gibi diğer organik asitler kullanılabilir (Mattioli vd., 2020).

2.3. Yeşil Kimyanın Temsilcisi Olarak Biyosolventler

Günümüze kadar, kimya, ilaç ve gıda endüstrisinde kullanılan çözücülerin büyük çoğunluğu petrol bazlı fosil yakıtlardan elde edilmiştir. Zamanla fosil yakıtlar yetersiz kalmaya başlamış ve petrol fiyatları da artmıştır (Chemat vd., 2019). Daha da önemlisi, genelde uçucu, toksik, yanıcı ve patlayıcı olan bu çözücüler, hem insan sağlığı hem de çevreye zararlı etkileri nedeniyle kullanımı küresel bir problem haline gelmiştir (Calvo-Flores vd., 2018).

Günümüz endüstrisi organik çözücüler gibi tehlikeli maddelerin kullanımını azaltmayı, kullanıldığı takdirde atık oluşumunu yok etmeyi veya minimuma

indiremeyi hedeflemektedir (Oklu vd., 2019). Yeşil kimya kavramının ana fikri, tehlikeli kimyasallar yerine daha çevre dostu alternatif tekniklere yönelimdir (Díaz-Álvarez ve Cadierno, 2013). İlk olarak 1990'ların başında ortaya atılan yeşil kimya teriminden kasıt, analitik tekniklerin, özellikle ekstraksiyon tekniklerinin minyatürleştirilmesi, gereksiz adımlardan kaçınmak için prosedürlerin basitleştirilmesi ve daha az tehlikeli reaktiflerin ve çözücülerin kullanılmasıdır (Hernández vd., 2010; Tobiszewski, 2019).

Bir çözücünün yeşil olarak kabul edilebilmesi için, yeşil kimyanın kriterlerine uygun olmalıdır. Yani piyasada kolaylıkla ulaşılabilir ve ucuz, çözücü tamamen geri dönüştürülebilir olmalı, enerji tasarrufu sağlayan proseslerle hazırlanabilmeli, ihmal edilebilir toksisite göstermeli, biyolojik olarak parçalanabilmeli, geleneksel çözücülere göre daha üstün özelliklere sahip olmalı, yanıcı olmamalı, mevzuata uygun olmalı, yenilenebilir hammaddelerden elde edilmeli, ekstraksiyonu kısa süreli olmalı ve çevre kirliliğine yol açmamalıdır (Gu ve Jérôme, 2013). Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu özellikleri taşıdığı belirlenen biyosolventler giderek yaygınlaşmaktadır. Fenolik bileşikler, pigmentler, alkaloidler, polisakkaritler vb. gıda bileşenleri farklı biyosolventlerle elde edilmektedir. Biyoçözücülerden etil alkol, gliserol, D-limonen yaygın olarak kullanıma sahiptir. Cañadas vd. (2021), biyo-bazlı çözücüler kullanarak sulu ortamdan fenolik madde kaynaklı antioksidanları elde etmek için 2-metiltetrahidrofur (2-MeTHF), siklopentil metil eter (CPME) ve D-limonen (LIM) kullanmışlar ve sonuçları karşılaştırmak için geleneksel organik çözücü olan etil asetat kullanmışlardır. Tüm fenolik asitler için en yüksek verim, 2-MeTHF ile sağlandığını kaydetmişlerdir. Bu çözücü ile hedef bileşikler arasındaki afinitenin son derece yüksek olduğunu görmüşlerdir. Potansiyel olarak, sıvı matrislerden fenolik asitlerin daha çevre dostu bir şekilde geri kazanılması için iyi bir solvent alternatifi olarak düşünülebileceğini rapor etmişlerdir. CPME'nin, özellikle hidroksibenzoik asitlerden p-hidroksibenzoik asit ve vanilik asit için ve hidroksisinnamik asitlerden sinamik asit ve p-kumarik asit için iyi bir ekstraksiyon çözücüsü olduğunu bildirmişlerdir.

Wu vd. (2022), D-limonen, α -pinen, p-simen, 2,5-dimetilfuran (DMF) ve CyreneTM dahil olmak üzere yeşil biyo-türevli çözücüler arasında en uygununu bulmak için doğal alkaloid ekstraksiyonunda model bir bileşik olarak fenol kullanmışlardır. Ayrıca, Cyanex 923, trioktilfosfin oksit (TOPO), tri-bütül-fosfat

(TBP) ve Alamine 336 gibi solventlerin, fenollerini ekstrakte etmedeki performansını da değerlendirmişlerdir. D-limonenin fenol ekstraksiyonu için kabul edilebilir ekstraksiyon performansı gösterdiğini, ancak muhtemelen alkaloid ekstraksiyonu sırasında emülsiyon oluşumu nedeniyle ksilen ile karşılaştırdıklarında morfin ekstraksiyonu için daha az verimli olduğu bulmuşlardır.

2.4. Biyosolventler

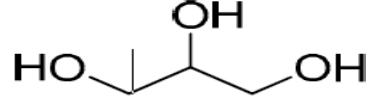
Son yıllarda hem laboratuvar hem de endüstriyel olarak kullanımlar için solventlerin hazırlanmasında daha verimli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar genellikle biyokütle kullanılarak hazırlanan biyosolventlerdir (Calvo-Flores vd., 2018). Biyosolventler; boyalar ve kaplamalar, farmasötikler, yapıştırıcılar, baskı mürekkepleri ve kozmetikler dahil birçok alanda halen kullanılmakta olan fosil yakıt bazlı solventlerin yerini alabilecek güce sahiptirler (Vovers vd., 2017). Özellikle gıda, kozmetik ve ilaç gibi sektörlerde fenolik bileşiklerin geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak biyosolventlerle ekstrakte edilmesi, araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir (Ruesgas-Ramón vd., 2017).

Organik çözücüler, fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda çeşitli yeteneklere sahip olsalar da atmosferde birikme, yanıcı ve toksik olması, biyolojik olarak parçalanamama, yüksek maliyet ve özellikle de uzun ekstraksiyon sürelerinden dolayı bu bileşiklerin hidroksil gruplarındaki bozunmalar gibi dezavantajlara sahiptirler. Ayrıca yüksek buhar basıncına sahip oldukları için endüstride alkandollerin ve gliserolün kullanımı daha güvenlidir. Süperkritik akışkanlara dayanan diğer teknikler ise endüstride yaygın olarak kullanılmadıklarından, sağlayacağı verimden ve işletme maliyetinden şüphe edilebilir (Huang vd., 2018). Bu solventlerin çevreye ve polifenollere verdiği zararlar karşısında biyosolventlerin sulu çözeltileri yeşil kimya trendini karşılamaktadır (Ruesgas-Ramón vd., 2017). Bu bağlamda gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkol, ön plana çıkan biyosolventlerdir.

2.4.1. Gliserol

Genel olarak biyo bazlı alkoller, esterler, eterler, iyonik sıvılar ve derin ötektik çözücüler olarak 5 sınıfa ayrılan biyoçözücüler, laboratuvarlarda ve endüstride yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Alkollerin bazıları hem petrokimya endüstrisi prosedürlerinden hem de yenilenebilir kaynaklardan hazırlanabilir. Bunlar, biyo bazlı alkoller olarak tanımlanabilir (Calvo-Flores vd., 2018).

Gliserol veya diğerk yaygın ismiyle gliserin, 1779'da İsveçli kimyager Carl W. Scheele tarafından keşfedilmiştir (Kumar ve Srivastava, 2019; Makris ve Lalas, 2020). Kimyasal formülü $C_3H_8O_3$ 'tür (Şekil 2.5.) (Kumar ve Srivastava, 2019).



Şekil 2.5. Gliserolün kimyasal yapısı (Skarpalezos ve Detsi, 2019)

Gliserol biyolojik olarak parçalanabilir, higroskopik, renksiz, kokusuz, viskoz ve tatlı bir polialkoldür. Ucuz, toksik olmayan ve geri dönüştürülebilir özellikleriyle yeşil kimya kriterlerini karşılayan gliserol, bitkisel ve hayvansal yağların hidrolizi, sabunlaştırılması ve transesterifikasyonu ile elde edilir (Kumar ve Srivastava, 2019; Makris ve Lalas, 2020).

Yüksek kaynama noktası sayesinde uçucu olmayan gliserol, yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen kimyasal reaksiyonlarda büyük bir kolaylık sağlar. Bunun yanı sıra yüksek viskozitesi, düşük sıcaklıkta çözünmesi bir dezavantajdır. Ancak, çözücü olarak gliserolün kullanıldığı reaksiyonlar, 60°C ve üzeri gibi yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirildiği takdirde, bu sorunun da üstesinden gelinmektedir (Kumar ve Srivastava, 2019).

Son yıllarda, gliserol, biyodizel üretimi için atık olarak büyük miktarlarda üretilmektedir (Calvo-Flores vd., 2018). Gliserol çeşitli alanlarda özellikle gıda, farmasötik preparatlar ve kozmetikte kullanılır. Kozmetikte, nemlendirici ve cilt koruyucu olarak işlev görür. Farmasötik preparatları, göz tedavisi ile ilgili uygulamalarda ve dermatolojik ürünlerde, gıda sanayinde ise genellikle katkı maddesi, nem tutucu, koruyucu ve tatlandırıcı olarak kullanılır. Gliserol, kimya endüstrisinde değerli olan çeşitli ince kimyasalları elde etmek için dikkate değer bir yenilenebilir kaynak haline gelmiştir (Calvo-Flores vd., 2018; Makris ve Lalas, 2020).

Gıda endüstrisinde katı atıklardan veya tıbbi ve aromatik bitkilerden polifenollerin ve pigmentlerin geri kazanılması amacıyla solvent olarak tercih edilmektedir (Makris ve Lalas, 2020). Tek başına, sulu çözelti halinde veya derin ötektik karışımlarda kullanılabilir (García vd., 2014).

2.4.1.1. Biyoaktif Ekstraksiyonunda Gliserol Kullanımıyla İlgili Çalışmalar

Apostolakis vd. (2014), kurutulmuş zeytin (*Olea europaea*) yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonunda yanıt yüzey yöntemi kullanarak sıcak su/gliserol ve su/etanol karışımları arasındaki ekstraksiyon verimliliğini karşılaştırmışlardır. Sıcak sulu gliserol çözeltisinin daha verimli olduğunu ve sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi analizinde karışımın bireysel fenolik profilinde daha iyi ayırım sağlandığını, su/gliserol karışımının ısıtılmasıyla karışımın viskozitesinin önemli ölçüde azaldığı ve dolayısıyla ekstraksiyon veriminin arttığı bildirmişlerdir.

Blidi vd. (2015), kırmızı kabuklu elmalardan polifenollerin geri kazanımı için biyoçözücülerden etil alkol, 2,3-bütandiol ve gliserolün sulu karışımlarını kullanmışlardır. Tüm biyoçözücüler için % 10-90 aralığında solvent konsantrasyonunu, 20 ile 100 mL/g aralığında sıvı-katı oranını ve 50 ile 80°C aralığında ekstraksiyon sıcaklığını bağımsız değişken alıp ekstraksiyon koşullarını optimize etmişlerdir. En yüksek toplam polifenol verim için optimum noktaların % 50 etanol, % 50 bütandiol ve % 70 gliserol konsantrasyonunda, 100 mL/g sıvı-katı oranı ile 80°C ekstraksiyon sıcaklığı olduğunu belirlemişlerdir. Polifenollerin ekstraksiyonunda biyoçözücüler arasında istatistiksel bir fark olmadığını bildirmişlerdir. Ancak kinetik sonuçlarına göre % 50 bütandiol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda, hızı sabitinin ve difüzyon katsayısının daha yüksek olduğunu ve % 50 etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda ise indirgeme gücünün daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Optimize edilmiş koşullarda ekstraktların sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi ile belirledikleri fenolik bileşik profillerinde toplam 12 bireysel fenolik bileşik olduğunu, ancak gliserol ile elde edilen ekstraktta dört *p*-kumarat konjugatının bulunmadığını tespit etmişlerdir.

Karakashov vd. (2015 a), kurutulmuş *Hypericum triquetrifolium* Turra' dan polifenollerin ekstraksiyonunda yanıt yüzey yöntemini kullanarak su/gliserol karışımı ile su arasındaki ekstraksiyon verimliliğini karşılaştırmışlardır. Gliserol, suyla karşılaştırıldığında daha düşük bir dielektrik katsayısına sahip olduğunu ve böylece suyu daha az polar hale getirdiğini dolayısıyla polifenollerin ekstrakte etme kapasitesinin arttığını kaydetmişlerdir.

Karakashov vd. (2015 b), kurutulmuş *Hypericum perforatum*'dan su ve gliserolün sulu karışımı ile yanıt yüzey yöntemini kullanarak polifenollerini ekstrakte etmişlerdir. Bir önceki çalışmada olduğu gibi sulu karışımdan daha fazla ekstraksiyon verimi elde etmişlerdir. Ayrıca sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi analizleri ile her iki solventle elde edilen ekstraktların polifenolik profilini, klorojenik asitlerin ve kersetin glikozitlerin oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Michail vd. (2015), filtre kahve tortusundan polifenollerin geri kazanılmasını hedeflemişlerdir. Ultrasonikasyon destekli ekstraksiyonda gliserolün sulu karışımını kullanmışlar ve gliserol konsantrasyonu ile ekstraksiyon süresini açısından optimize etmişlerdir. Aynı zamanda gliserolün sulu karışımı ile suyun polifenol verimlerini de kıyaslamışlardır. Sonuç olarak % 3.6 gliserol konsantrasyonunda 175 dk boyunca gerçekleştirilen ekstraksiyonun optimum koşullar olduğunu belirlemişlerdir. Ekstraksiyonun sulu gliserolde suya göre daha yavaş gerçekleştiğini, ancak sulu gliserol ile daha yüksek bir verim sağlandığını bildirmişlerdir.

Shehata vd. (2015), *Artemisia arborescens* ve *Artemisia inculta* Delile bitkilerinden polifenollerin çevre dostu yöntemlerle geri kazanılması amacıyla gliserolün sulu çözeltisini kullanmışlar ve gliserol konsantrasyonu ve katı-sıvı oranı gibi ekstraksiyon koşullarını optimize etmişlerdir. *Artemisia arborescens* ve *Artemisia inculta*'da maksimum polifenol veriminin % 90 gliserol konsantrasyonunda ve 100 mL/g katı-sıvı oranında sırasıyla 48.45 ve 59.91 mg GAE/g olduğunu bulmuşlardır.

Radulescu vd. (2017), lavanta çiçeğinden (*Lavandula angustifolia*) aktif bileşenlerden olan fenolikleri ekstrakte etmişlerdir. Çalışmada, çeşitli basınç ve sıcaklık koşullarında lavanta çiçeklerinden fenoliklerin izolasyonunda en iyi koşulları karakterize etmek için organik çözücü olarak % 50 gliserol ile % 50 propilen glikol ve % 50 etil alkol kullanmışlardır. Ultrason destekli ekstraksiyon, 6.7 bar basınçta hızlı ekstraksiyon ve subkritik ekstraksiyonu olmak üzere 3 farklı yöntem uygulamışlardır. En yüksek toplam fenolik bileşiklerin konsantrasyonunu % 50 alkol ve subkritik ekstraksiyon ile belirlemişlerdir. Bunu, 6.7 bar basınçta hızlı ekstraksiyon takip etmiştir. Bu iki yöntem ile ultrason destekli ekstraksiyona kıyasla, lavanta ekstraktlarından fenoliklerin verimli bir şekilde izole edildiğini gözlemlemişlerdir. Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi ile birincil

fenolikler olarak klorojenik asit, gallik asit, umbelliferon, luteolin 7-O-glukozit, vitexin ve izokersitrositi tanımlamışlardır.

Limwachiranon vd. (2018), yüksek nişasta içeriğine sahip lotus çiçeği (*Nelumbo nucifera* G.) çekirdeğinden fenoliklerin ekstraksiyonunda gliserolün sulu karışımını kullanmışlardır. Bu amaçla yanıt yüzey metodolojisi ile ekstraksiyon sıcaklığı, süresi ve gliserol konsantrasyonunu optimize etmişlerdir. Aynı zamanda gliserolün nişasta ile reaksiyona girerek fenoliklerin ekstraksiyonunda olumlu bir etkiye sahip olduğuna dair öne sürülen hipotezi araştırmışlardır. Sonuç olarak optimize edilen koşullardan ekstraksiyon sıcaklığının diğer faktörlere kıyasla önemli derecede etkili olduğunu, seçilen optimum sıcaklık, nişasta granüllerinin parçalanmasını desteklediğinden dolayı amiloz/amilopektin-gliserol kompleksinin fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu teşvik ettiğini tespit etmişlerdir. Böylece ortaya atılan hipotezi de doğrulamışlardır.

Aalim vd. (2019), Asya pirinci (*Oryza sativa* L.) kepeğindeki polifenollerini sulu gliserol ile ekstrakte etmişler ve ekstraktların antidiyabetik ve antiglikasyon potansiyellerini incelemişlerdir. Gliserol konsantrasyonu, sıvı-katı oranı ve ekstraksiyon sıcaklığı gibi koşulları optimize etmek için Box-Behnken tasarımı kullanmışlardır. Toplam polifenollerde ve DPPH süpürme aktivitesinde tatmin edici sonuçları elde ettiklerini, optimum noktayı % 15.9 gliserol, 31.6 mL/g sıvı-katı oranı ve 90°C sıcaklıkta gerçekleştirilen ekstraksiyonda sağladıklarını rapor etmişlerdir. Gliserol ile elde ettikleri pirinç kepeği ekstraktlarının diyabet ve glikazasyona karşı, biyoaktif bileşikler bakımından zengin, doğal bir ilaç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Ciganovic vd. (2019), gliserol/su karışımını kullanarak, ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle meyan kökünden (*Glycyrrhiza glabra*) biyoaktif bileşiklerini ekstrakte etmişlerdir. Gliserol konsantrasyonu (% 10-90), sıcaklık (20-70°C) ve öğütülmüş meyan kökü miktarı (0.6-1 g) gibi ekstraksiyon parametrelerini optimize etmek için Box-Behnken tasarımı ve yanıt yüzey yöntemini kullanmışlardır. Bu bağımsız değişkenlerin; toplam fenol içeriği, toplam fenol ekstraksiyon verimliliği ve meyan kökü karakteristik bileşenlerinin içeriği (glabridin ve izoliquiritigenin) üzerine etkisini incelemişlerdir. Düşük gliserol konsantrasyonunun hem toplam fenol içeriğini hem de toplam fenolün ekstraksiyon verimini olumlu, ancak glabridin ve izoliquiritigenin konsantrasyonunu olumsuz yönde etkilediğini gözlemlemişlerdir.

Yaptıkları bu çalışmada, yüksek sıcaklıkta gliserolün viskozitesinin azalmasıyla *G. glabra* kökünden fenoliklerin ekstraksiyonunun daha başarılı bir şekilde gerçekleştiğini açıklamışlardır. Toplam fenolik madde içeriği ve toplam fenol ekstraksiyon verimliliği ile glabridin ve izoliquiritigenin içeriği için optimum koşulları sırasıyla % 20, 70°C, 0.93 g; % 30, 70°C, 0.7 g ve % 85, 70°C, 1 g olarak belirlemişlerdir. Hazırlanan ekstraktların mükemmel radikal süpürücü, Fe²⁺ şelatlayıcı ve antioksidan aktivite sergilediğini gözlemlemişlerdir.

Eyiz vd. (2019), fenolik asitler, flavonoidler ve antosiyaninler bakımından zengin bir yan ürün olan kırmızı üzüm posasından, bu fitokimyasalları homojenleştirme esasına dayalı olarak ekstrakte etmişlerdir. Etkili bir ekstraksiyon gerçekleştirmek amacıyla optimizasyon için bağımsız değişken olarak gliserol konsantrasyonu ve sıvı-katı oranını, yanıt olarak toplam fenol, toplam flavonoid, askorbik asit, toplam monomerik antosiyanin ve proantosiyanin içerikleri ile serbest radikal süpürme aktivitesini seçmişlerdir. Sonuç olarak her iki bağımsız değişkenin de önemli derecede etkili olduklarını gözlemlemişlerdir. Gliserol konsantrasyonu arttıkça ekstraktlardaki fitokimyasal içeriğinin arttığını belirlemişlerdir. Aynı zamanda sıvı-katı oranının flavonoid, proantosiyanin ve askorbik asit içeriği ile pozitif, fenolik madde içeriği ile negatif korelasyon içinde olduğunu bildirmişlerdir. Optimum koşulları % 50 gliserol konsantrasyonu ve 22.4 sıvı-katı oranı olarak kaydetmişlerdir.

El Kantar vd. (2019), greylift kabuklarından polifenollerini ekstrakte etmek için derin ötektik solventler (DES) (laktik asit: kolin klorid, laktik asit: sodyum asetat, laktik asit: glisin, laktik asit: amonyum asetat, laktik asit: glikoz, laktik asit: tartarik asit) ve % 20 sulu gliserol karışımı ile katı-sıvı ekstraksiyon yapmışlardır. Polifenollerin ekstraksiyon kinetiklerini ve verimlerini arttırmak amacıyla ön işlem olarak yüksek voltajlı elektrik deşarj (HVED) tekniği uygulamışlardır. Karşılaştırmada su ve % 50 sulu etanol karışımı kullanmışlardır. Greyfurt kabuklarından polifenollerin ve özellikle de naringinin ekstraksiyonunda; suya göre, kullanılan solventlerden önemli ölçüde verim alındığını belirlemişlerdir. Bu solventlerden sadece %20 sulu gliserol ve DES çözeltisinin (laktik asit: glikoz) polifenollerin ekstraksiyonunu sırasıyla 1.3 ve 1.4 kata kadar verim artışına yol açtığını, gliserol kullanımının HVED ön işlem enerjisini 6 kat azalttığı sonucuna varmışlardır.

Huang vd. (2019), lotus bitkisinin bir yan ürünü olan ve lotustan daha yüksek oranda fenolik bileşik içeren *Receptaculum nelumbinis*'den bu maddeleri ekstrakte etmede gliserol kullanmışlardır. Bağımsız değişken olarak ekstraksiyon süresi, sıcaklık ve gliserol konsantrasyonunu almışlardır. Reometre ile solvent viskozitesini incelemişler ve gliserolün ekstraksiyon kapasitesi ile ters orantılı olduğunu fark bildirmişlerdir. 97.8 dk ekstraksiyon süresi, 77.8°C ekstraksiyon sıcaklığı ve % 73.7 gliserol konsantrasyonunu, yüksek toplam polifenol ve düşük viskozite eldesi için optimum koşullar olarak belirlemişlerdir. Optimum koşullar altında kateşin, prosiyanidin, hiperosid, izokersitrin ve kersetin dahil olmak üzere toplam on yedi fenolik bileşiğin varlığını saptamışlardır. Sonuç olarak gliserolün, *Receptaculum nelumbinis*'den fenolik bileşikleri ekstrakte etmede etkili ve ideal bir solvent olabileceğini bildirmişlerdir.

Huamán-Castilla vd. (2020), şaraplık üzüm çeşitlerinden biri olan Carménère'nin posasından düşük molekül ağırlıklı polifenoller (fenolik asitler, flavanoller, flavonoller ve stilbenler) elde etmek için, farklı konsantrasyonlarda sulu gliserol karışımlarını (% 15, % 32.5 ve % 50) kullanarak, yüksek sıcaklıklarda (90°C, 120°C ve 150°C) basınçlı sıvı ekstraksiyonu (HPLE) yapmışlardır. Aynı ekstraksiyon koşullarını gliserol yerine etil alkol için de uygulamışlar ve gliserol ile daha yüksek verim elde etmişlerdir. En yüksek geri kazanımları, fenolik asitler, flavanoller ve stilbenler için % 50 gliserol ve flavonoller için % 32.5 gliserol ile 150°C'de sağlamışlardır. HPLE yöntemi ile ekstrakte ettikleri beş farklı fenolik asitten (gallik, klorojenik, vanilik, kafeik ve ferulik asit) en yüksek olan gallik asit olduğunu belirlemişlerdir. Flavanol veriminin, sıcaklık ve gliserol konsantrasyonunun artması ile önemli ölçüde yükseldiğini tespit etmişlerdir. Hemen hemen tüm ekstraksiyon koşulları altında, kamferole göre 10 kat daha fazla kersetin elde etmişlerdir.

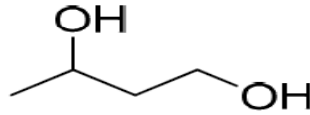
Momchev vd. (2020), soğuk algınlığı, cilt problemleri ve küçük yaraların tedavisinde kullanılan *Echinacea purpurea*'dan su, etanol, sulu etanol ve sulu gliserol karışımı kullanarak gerçekleştirdikleri maserasyonların verimlerini karşılaştırmışlardır. Ekstrakt kompozisyonu üzerine sürenin etkisini incelemek amacıyla maserasyonu 1 gün ve 3 gün süreyle uygulamışlardır. % 50 etanol, % 50 gliserol ve % 90 gliserolün istatistiksel olarak birbiriyle aynı verime sahip oldukları sonucuna varmışlardır. Bu nedenle yalnız gliserol kullanarak fenolik asitler için

ultrason destekli ekstraksiyon yöntemini kullanmışlardır. Bu amaçla bağımsız değişken olarak gliserol konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi, ultrason gücü, solvent miktarı ve askorbik asit konsantrasyonu seçmişlerdir. Kafeik asit ve türevleri başta olmak üzere fenolik asitlerin maksimum ekstraksiyonu için gerekli optimum koşulların; % 90 gliserol konsantrasyonu, 70°C sıcaklık, 72 W ultrason gücü, 40 dk süre, 0 mg/mL askorbik asit ve 30 g solvent miktarı olduğunu belirlemişlerdir.

Kowalska vd. (2021), siyah kuş kirazı ve mürver ağacı meyvelerinden su ve farklı konsantrasyonlarda gliserol (% 30, 50, 65 ve 80) ile etil alkol (% 50 ve 99.8) kullanarak katı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle antosiyaninleri ekstrakte etmişlerdir. Her bir konsantrasyondaki solventi farklı ekstraksiyon sıcaklıklarında (20, 50 ve 80°C), iki meyve için de uygulamışlardır. Sonuç olarak en yüksek konsantrasyonda antosiyanini; 20°C ve 50°C’de, % 50 gliserol ile siyah kuş kirazından elde etmişlerdir. Mürver ağacı meyvesinden ise 80°C’de, % 65 gliserol ile maksimum miktarda antosiyaninin verimi sağlamışlardır. Bu çalışma ile yaş veya sağlıkla ilgili sınırlamalardan dolayı gıda ürünlerinde her zaman kullanılmayan etanol yerine gliserolün, antosiyaninlerin ekstraksiyonunda alternatif bir çözücü olabileceğini kanıtlamışlardır.

2.4.2. 1,3-Bütandiol

1,3-bütandiol pratik olarak kokusuz, viskoz, tahriş edici olmayan bir çözücüdür. Antimikrobiyal etki gösterir ve çok düşük bir toksisiteye sahiptir. Yapısı Şekil 2.6.’da gösterilen 1,3-bütandiolün kimyasal formülü $CH_3 CH(OH) CH_2 CH_2 OH$ şeklindedir (Calvo-Flores vd., 2018).



Şekil 2.6. 1,3-bütandiolün kimyasal yapısı (Skarpalezos ve Detsi, 2019)

1,3-bütandiol pekmez gibi maddelerden hazırlanabilir (Şekil 2.7.). Antimikrobiyal özellikleri ile aroma ve koku gibi uçucu bileşikleri stabilize edebilme yeteneğinden dolayı 1,3-bütandiol çoğunlukla gıda aroma maddeleri ve kozmetik formülasyonlarında kullanılır (Calvo-Flores vd., 2018).

Pekmez → Etanol → Asetaldehit → 1,3-bütandiol

Şekil 2.7. 1,3-bütandiol üretimi (Calvo-Flores vd., 2018)

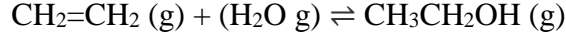
2.4.2.1. 1,3-Bütandiol İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Krisanti vd. (2019), kahve telvesinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda hidrojen bağı akseptörü olarak betain ile diollerin (1,2-propandiol, 1,3-propandiol, 1,2-bütandiol ve 1,3-bütandiol) ve hidrojen bağı donörleri olarak asitlerin (levulinik asit ve laktik asit) karışımını, yani betain bazlı yeşil solventleri kullanmışlardır. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda solventlerin yeteneklerinin betain-1,2-bütandiol > betain-1,3-bütandiol > betain-1,3-propandiol > betain-laktik asit > betain-1,2-propandiol > betain-levulinik asit > betain-1,4-bütandiol şeklinde sıralandığını bildirmişlerdir. Ayrıca betain-1,2-bütandiol, betain-1,3-bütandiol ve betain-laktik asit karışımlarının antioksidan aktivitesinin diğerlerinden daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.

Vieira vd. (2020), biyoaktif bileşikler bakımından zengin *Juglans regia* L. yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda gliserol ve bir dizi alkandiolün (1,2-etandiol, 1,2-propandiol, 1,3-propandiol, 1,3-bütandiol, 1,2-pentandiol, 1,5-pentandiol ve 1,2-hekzandiol) etkinliğini araştırmışlardır. Aynı zamanda hem ekstraktların hem de saf çözücülerin biyoaktivitesini, anti-enflamatuar ve sitotoksik aktivitelerini ölçerek değerlendirmişlerdir. Su ve etanol+su karışımlarını da karşılaştırmada kullanmışlardır. Sonuç olarak sulu çözücülerin (1,2-hekzandiol hariç), sudan daha yüksek ekstraksiyon verim sergilediğini, alkandioller arasında 1,2 ve 1,3-propandiolün öne çıktığını rapor etmişlerdir. Ayrıca propandiol izomerlerinin ekstraksiyon etkinliklerinin etanole yakın ve özütlerinin de benzer sitotoksikite gösterdiğini, sulu çözeltilerin hiçbirinin anti-enflamatuar aktivite göstermediğini kaydetmişlerdir.

2.4.3. Etil Alkol

Etanol, en popüler biyo bazlı malzemelerden biridir ve genellikle biyoetanol olarak adlandırılır. Şeker kamışı, şeker pancarı, mısır, pekmez, patates ile buğday, arpa, yulaf ve pirinç gibi nişastalı malzemelerden hatta tarımsal atıklar ve odunsu malzemeler gibi lignoselülozik malzemelerden hazırlanabilmektedir. Petrokimya endüstrisine göre etanol üretimi Şekil 2.8.'de gösterilmektedir (Calvo-Flores vd., 2018).



Şekil 2.8. Petrokimya endüstrisinde etanol sentezi (Calvo-Flores vd., 2018).

Alkol üretimi, genellikle bir ön işlem ardından hidroliz ve son olarak da bir fermantasyon gerektirir. Biyoetanol doğrudan yakıt, yakıt katkı maddesi veya çözücü olarak kullanılabilir ve kimya endüstrisindeki diğer birçok temel organik molekülün sentezi için başlangıç malzemesidir (Calvo-Flores vd., 2018). Biyoyakıt veya çözücü olarak etanolün en yaygın kullanım alanları, parfümler, gıda boyaları ve aromaları ile alkollü içecekler ve sentetik ilaçlardır (Oklu vd., 2019).

2.4.3.1. Etil Alkol İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Shi vd. (2003), kurutulmuş üzüm çekirdeğinden % 50 konsantrasyonda sulu etanol ile fenolik bileşikler üçer kez ekstrakte etmişlerdir. Ekstraksiyonda sıcaklık (25, 45 ve 65°C), süre (1, 1.5 ve 2 saat) ve sıvı-katı oranının (5:1, 7.5:1 ve 10:1) etkisini incelemişlerdir. Etanol, uçucu ve kaynama noktası düşük (78.5°C) bir alkol olduğu için, ekstraksiyon sıcaklığının artışıyla buharlaşıp konsantrasyonun değiştiğine dikkat çekmişler ve bunu önlemek için ekstraksiyon sıcaklığını 65°C olarak seçmişlerdir. Ayrıca uzun süreli ekstraksiyonun, hem istenen bileşiklerin oksidasyonuna ve bozunmasına, hem de proteinler ve polisakkaritler gibi istenmeyen bileşenlerin ekstraktlara geçmesine yol açtığını göz önüne alınıp süreyi 1.5 saat ve sıvı-katı oranını da 7.5:1 şeklinde optimum koşullar olarak belirlemişlerdir. Üç aşamada elde edilen toplam fenoliklerin % 90-97'sini, 1. ve 2. aşamada elde edilenlerin toplamı oluşturduğundan, iki aşamalı ekstraksiyonun daha uygun maliyetli olduğuna karar vermişlerdir.

Bucic'-Kojic' vd. (2007), şarap veya meyve suyu üretiminden sonra elde edilen bir yan ürün olan üzüm çekirdeğindeki toplam polifenollerin ekstraksiyon verimi üzerine, % 50 sulu etanol karışımını kullanarak, farklı sıcaklık ve katı-sıvı oranlarının etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla 10 mL/g, 20 mL/g, 30 mL/g ve 40 mL/g olarak farklı oranlar; 25°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C ve 80°C olarak da farklı sıcaklıklar denemişlerdir. Kurutulmuş üzüm çekirdeklerini kahve değirmeninde öğüttükten sonra >0.63 mm, 0.63-0.4 mm, 0.4-0.16 mm ve 0.16-0.125 mm olmak üzere 4 farklı boyuttaki elekten geçirerek farklı partikül boyutlarının da etkisini incelemişlerdir. Araştırılan tüm faktörlerin ekstraksiyon hızı ve miktarı üzerinde olumlu etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. 200 dk süreyle gerçekleştirilen

ekstraksiyon sonucunda; en yüksek verimi 40 mL/g katı-sıvı oranı, 80°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 0.16-0.125 mm partikül boyutunda elde etmişlerdir.

Jensen vd. (2007), *Vitis vinifera* türüne ait sekiz farklı kırmızı üzüm çeşidinden (Alicante, Merlot, Syrah, Cinsault, Grenache, Carignan, Cabernet Sauvignon ve Mourvedre) fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda çözücü temas süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı ile etanol ve HCl konsantrasyonu faktörlerinin etkisini incelemişlerdir. Bu amaçla % 0, % 25 ve % 50 etanol ve 0 M, 0.1 M ve 0,05 M HCl oranları ile 20, 40 ve 60°C ekstraksiyon sıcaklıklarını uygulamışlardır. Seçilen tüm faktörlerin, hem toplam fenollerin hem de antosiyaninlerin ekstraksiyonu üzerine olumlu etkileri olduğunu bildirmişlerdir. 40°C'de, 1:1 oranında ve 5 dk solvent temas süresi ile gerçekleştirilen ekstraksiyonu ve 0.1 M HCl ile asitlendirilmiş % 50 etanol/su karışımının kullanılmasını, optimum koşullar olarak bildirmişlerdir. Bu koşullarda, toplam fenollerin ortalama % 81.8'ini ve antosiyaninlerin % 91.5'ini ekstrakte etmişlerdir.

Makris vd. (2007), beyaz şarap üretimi sonucunda açığa çıkan katı atıklardan üzüm kabuklarında, tohumlarında ve saplarında bulunan antioksidan fenolik bileşiklerin geri kazanılmasını ve antioksidan, antiradikal aktivitesinin belirlenmesini hedeflemişlerdir. % 28.5, % 57 ve % 85.5 oranlarında etanol/su karışımı ve % 57 etanol/su karışımı sabit kalacak şekilde, % 0.1 HCl, % 1 asetik asit ve % 1 tartarik asit ile asitlendirdikleri çözücülerle ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Yan ürünleri polifenol içerikleri bakımından kıyasladıklarında; en yüksek içeriğe çekirdeklerin, ardından sap ve kabukların sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Tüm yan ürünlerde en yüksek antioksidan aktiviteyi, %57 etanol/su karışımının kullanıldığı ekstraktlarda elde etmişlerdir. Bu ortamı % 0.1 HCl ile asitlendirme işleminin, polifenol geri kazanımında ve özellikle de sap ekstraktlarının antiradikal aktivitesinin iyileştirilmesinde önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Ancak bu durumun çekirdek ekstraktları için elverişsiz olduğunu gözlemlemişlerdir.

Mylonaki vd. (2008), zeytin (*Olea europaea*) yaprağındaki fenolik bileşiklerin geri kazanımında su/etanol/sitrik asit karışımını kullanmışlardır. Yanıt yüzey metodolojisi ile pH, ekstraksiyon süresi ve etanol konsantrasyonunu açısından ekstraksiyon prosesini optimize etmişlerdir. Süre ve etanol konsantrasyonunun ekstraksiyon verimini etkileyen birincil faktörler olduğunu, artan pH'nın verimi olumsuz etkilediğini kaydetmişlerdir. Aynı zamanda optimum koşullar altında elde

edilen ekstraktlarda yapılan sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyonu kütle spektrometrisi analizinde, fenolik profili sekoiridoidlerden biri olan oleuropein, bir dizi flavon glikozit ve düşük miktarlarda da rutin (bir flavonol glikozit) oluşturduğunu belirlemiştir.

Khiari vd. (2009), soğanın katı atıklarından polifenollerin geri kazanımında asitlendirilmiş su/etanol karışımı kullanmışlardır. Bu amaçla ekstraksiyon süresi ve sıcaklığı ile etanol konsantrasyonunu optimize etmişlerdir. En yüksek toplam fenol veriminin, % 0.1 HCl içeren % 60 sulu etanol karışımıyla elde edildiğini belirlemiştir. Aynı zamanda ekstraksiyon süresinin artmasının, daha yüksek toplam fenol verimi elde etmek açısından olumlu, sıcaklığın artmasının ise ters etkiye sebep olduğunu gözlemlemiştir.

Bridgers vd. (2010), mor tatlı patateslerden antosiyaninlerin, fenolik bileşiklerin ve fermente edilebilir şekerlerin geri kazanımı için ekstraksiyon ve enzimatik hidroliz işlemleri araştırmışlardır. Hidroliz işlemini şeker üretimi için, antosiyaninlerin ekstraksiyonu sonucu arta kalan katı maddelere uygulamışlardır. Bu işlemler üzerine solvent türü (% 70 etanol, % 7 asetik asit ile asitlendirilmiş % 70 etanol, % 70 metanol, % 7 asetik asit ile asitlendirilmiş % 70 metanol), ekstraksiyon sıcaklığı (25, 50 ve 80°C) ve katı-sıvı oranı (% 3.3 ve 17) etkilerini araştırmışlardır. Optimum koşulların; % 3.3 katı-sıvı oranı ile asitlendirilmiş metanol kullanılarak 80°C'de gerçekleştirilen ekstraksiyon koşulları olduğunu belirlemiştir. Böylece 100 g yaş ağırlık başına 186.1 mg siyanidin-3-glikozit verimi sağlamışlardır. Sonuç olarak asitlendirilmemiş solventlere kıyasla asitlendirilmiş etanol ve metanolden sırasıyla % 10-45 ve % 16-46 daha fazla antosiyanin elde etmişlerdir. Şekerlerin geri kazanımı açısından, hidroliz işleminden sonra metanolla yapılan ekstraksiyondan kalan katı kalıntılara kıyasla; 50°C'de, % 17 katı-sıvı oranında ve asitlendirilmiş etanol ile yapılan ekstraksiyondan kalan katı kalıntılarda şeker üretiminin daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Jokić vd. (2010), öğütülmüş soya fasulyesi çeşitlerinden biri olan Ika'dan toplam polifenollerin ekstrakte edilmesi ve kinetiği üzerine solvent türünün, sıcaklığın ve ekstraksiyon süresinin etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla % 50, 60, 70 ve % 80 konsantrasyonda sulu etanol ile su kullanmışlardır. Toplam fenolik maddelerin maksimum ekstraksiyon derecesine, % 50 oranında sulu etanol konsantrasyonu, 80°C'de 120 dk sonunda ulaşmışlardır.

Dragovic-Uzelac vd. (2012), mikrodalga destekli ekstraksiyon ile kurutulmuş yabani adaçayından (*Salvia officinalis L.*) polifenollerinin ekstraksiyonu için en uygun koşulları ve mikrodalga gücünün fenoliklerin bileşimi ve konsantrasyonu üzerine etkisini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, değişken olarak ekstraksiyon solventi (su, % 30 sulu etanol ve % 30 sulu aseton), ekstraksiyon süresi (3, 5, 7, 9 ve 11 dk) ve mikrodalga gücünü (500, 600 ve 700 W) seçmişler ve geleneksel ekstraksiyon yöntemi sonuçları ile kıyaslamışlardır. Çalışma sonucunda geleneksel yöntemle göre mikrodalga destekli ekstraksiyon ile daha kısa sürede daha yüksek ekstraksiyon verimi elde etmişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşullarını 80°C, 9 dk ve 500 W olarak saptamışlardır. Çözücülerden % 30 etanol ve % 30 asetonun, suya göre daha yüksek ekstraksiyon kapasitesine sahip olduğunu, % 30 etanol ile daha çok fenolik bileşik içeren ekstraktlar elde edildiğini bildirmişlerdir. HPLC ile yaptıkları analizde, en yüksek rosmarinik asit ve luteolin glikozit bileşiklerini tanımlamışlardır.

Paleologou vd. (2015), gıda endüstrisinin önemli atıklarından biri olan patates (*Solanum tuberosum*) kabuklarından, etanol ve gliserolün sulu karışımlarını kullanarak fenolik antioksidanları geri kazanmayı amaçlamışlardır. Bu amaçla Box-Behnken deneme desenini kullanarak ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile solvent konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı ve katı-sıvı oranı değişkenleri açısından optimize etmişlerdir. Bu değişkenlerden yalnız solvent konsantrasyonunun önemli derecede etkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Optimum koşullarda etanolün sulu karışımının, gliserolün sulu karışımından daha hızlı bir difüzyon katsayısına sahip olduğunu, ancak her ikisinin de polifenollerin ekstraksiyonunda eşit derecede etkili olduklarını belirlemişlerdir. Ayrıca sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi analizi ile her iki solventle elde edilen ekstraktların hemen hemen aynı fenolik yapıya sahip olduklarını ve en major bileşiğin klorojenik asit olduğunu tespit etmişlerdir.

Philippi vd. (2016), patlıcan (*Solanum melongena*) kabuklarından, etanol ve gliserolün sulu karışımlarını kullanarak fenolik antioksidanların geri kazanımını amaçlamışlardır. Bu amaçla Box-Behnken deneme desenini kullanarak ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile solvent konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı ve katı-sıvı oranı değişkenlerini optimize etmişlerdir. Optimum koşullarda; etanolün sulu karışımının gliserolün sulu karışımından daha hızlı bir difüzyon katsayısına

sahip olduğunu ancak her ikisinin de polifenollerin ekstraksiyonunda eşit derecede etkili olduklarını belirlemişlerdir. Bu yüzden gliserolün etanole kıyasla toksik olmaması, kaynama noktasının yüksek, kolay ulaşılabilir ve ucuz olması gibi avantajlara sahip olması sebebiyle, etanolün kullanılmaması gereken proseslerde etanol yerine alternatif bir solvent olabileceği sonucuna ulaşmışlardır. Ayrıca sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi analizi ile her iki solventle elde edilen ekstraktların hemen hemen aynı fenolik yapıya sahip olduklarını ve en belirgin bileşiğin klorojenik asit olduğunu tespit etmişlerdir.

Meziant vd. (2018), Azenjer inciri (*Ficus carica L.*) kabuklarında bulunan monomerik antosiyaninlerin ekstraksiyonunu optimize etmişlerdir. Bu amaçla ekstraksiyonda kullanılan solvent türü (su, metanol, etanol ve aseton), ekstraksiyon işlemi sayısı, katı-sıvı oranı (1/25, 1/50, 1/100, 1/150 ve 1/200), ekstraksiyon süresi (30, 60, 90, 120, 180 ve 240 dk), metanol konsantrasyonu (% 0, 20, 40, 60, 80 ve 100), solventi asitlendirmede kullanılan asit türü (hidroklorik asit, asetik asit, sitrik asit ve tartarik asit) ve konsantrasyonu (% 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 ve 10) ile asit-solvent oranının (1/99, 5/95, 10/90, 15/85 ve 20/80) etkisini incelemişlerdir. Tüm faktörlerin ekstraksiyon veriminde etkili olduğunu kaydetmişlerdir. Optimum ekstraksiyon koşullarını; 1/100 katı-sıvı oranı, 180 dk'lık ekstraksiyon süresi, % 5 sitrik asit ile 10/90 oranında asitleştirilmiş % 90 metanol ile iki kere ekstraksiyon olarak tespit etmişlerdir. Bu şartlarda 100 g kuru incir kabuğunda 346.63 mg monomerik antosiyanin elde etmişlerdir.

Nayak vd. (2018), dondurarak kurutulmuş *Cabernet* üzüm posasından toplam fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda solvent türü, solvent konsantrasyonu, solvent-katı oranı, ekstraksiyon sıcaklığı ve teknikleri gibi faktörlerin verim üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla su, 1:1, 1:3 ve 3:1 konsantrasyonlarında sulu etanol karışımı, saf etanol, metanol ve etil asetat kullanmışlardır. 10:1, 20:1 ve 40:1 solvent-katı oranları ile 25, 35 ve 45°C ekstraksiyon sıcaklıklarını denemişlerdir. Çalkalama olmadan ultrason destekli su banyosu, geleneksel çalkalayıcı katı-sıvı ekstraksiyonu ve iki yöntemin de birlikte ardışık olarak kullanılması gibi farklı yöntemler uygulamışlardır. Sonuçta, en yüksek verimin iki ekstraksiyon yönteminin kombine edilmesi ile 1:1 oranında sulu etanol karışımı ve 40:1 solvent-katı oranı ve 45°C'de gerçekleştirilen ekstraksiyonla sağlandığını belirlemişlerdir.

Gunathilake vd. (2018), *Centella asiatica* yapraklarında bulunan toplam fenolik madde ve karotenoidler için yanıt yüzey metodolojisi ile etanol konsantrasyonu, ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi gibi bağımsız değişkenler açısından ekstraksiyon koşullarını optimize etmişlerdir. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda etanol konsantrasyonunun düşmesi, ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin artması; karotenoidlerin ekstraksiyonunda ise etanol konsantrasyonunun artması ve ekstraksiyon sıcaklığının düşmesi ile verimde artış kaydetmişlerdir. Fenolik bileşikler için optimum ekstraksiyon koşullarını % 37 etanol konsantrasyonu, 70.2°C'de 110.5 dk, karotenoidler için % 100 etanol konsantrasyonu, 70.2°C'de 110.5 dk süresince ekstraksiyon olarak belirlemişlerdir. Ayrıca tahmin edilen ile saptanan miktarlar arasında önemli bir fark olmadığını bildirmişlerdir.

Huamán-Castilla vd. (2019), şaraplık üzüm çeşitlerinden biri olan Carménère'nin posasından fenolik asitler, flavanoller, flavonoller ve stilbenlerinin geri kazanımında ekstraksiyon sıcaklığı (90-150°C) ve etanol konsantrasyonunun (% 15-50) etkisini incelemişlerdir. Yüksek sıcaklıklarda basınçlı sıvı ekstraksiyonu (HPLC) yapmışlardır. Sıcaklık arttıkça ve etanol konsantrasyonu azaldıkça geri kazanımın o kadar yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Dolayısıyla 150°C'de ve % 32.5 etanol ile ekstrakte edilenlerde en yüksek toplam fenolik madde ve antioksidan kapasiteyi kaydetmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Kırmızı renkli *Alcea apterocarpa* çiçeği, Haziran-Eylül ayları arasında Samsun'un Atakum ilçesinden (41°22'00.5"N, 36°13'38.8"E) doğadan toplanmıştır. Hızla laboratuvara getirilip ayıklanıp kurutulmuştur (Şekil 3.1.). Analiz edilinceye kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Taze ve kuru gülfatma çiçeklerinin görünümü

3.2. Yöntem

3.2.1. *Alcea apterocarpa*'nın Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Kurutulmadan önce taze çiçekte; renk, kuru madde ve pH analizi yapılmıştır. Kuru çiçeklerde ise sadece kuru madde analizi yapılmıştır.

3.2.1.1. Rengin Belirlenmesi

Alcea apterocarpa çiçeğinde renk ölçümü, renk ölçüm cihazıyla (Konica Minolta CR-400 renk ölçüm ve DP-400 veri işleme cihazı (Japonya)) yapılmıştır. Renk, L (aydınlık, 100: beyaz, 0: siyah), a (+: kırmızılık, -: yeşillik), b (+: sarılık, -: mavilik) olarak ifade edilmiştir.

3.2.1.2. Kuru Madde Tayini

Kuru madde analizi hem yaş hem de kuru numunede yapılmıştır. Bunun için darası alınan nikel kaplara belirli bir miktar numune tartılmıştır. Vakumlu etüvde (Nüve EV-018, Türkiye) 70°C'de sıcaklık 100 mm Hg basınçta sabit ağırlığa kadar

kurutulmuştur. Kurutma öncesi ve sonrası ağırlık farkı belirlenerek % kuru madde olarak hesaplanmıştır (AOAC, 2000).

3.2.1.3. pH Tayini

Pulp haline getirilen yaş örnekten 1 g tartılarak saf su ile 1:10 oranında seyreltilmiş, buzdolabı sıcaklığında 1 gece bekletilmiş ve oda sıcaklığına (21°C) getirilip bir pH metrede (Apera Instruments pH 1 Value marka) pH'sı ölçülmüştür (AOAC, 2000).

3.2.2. Antioksidan Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Analizi

Ekstraksiyonda etil alkol, gliserol ve 1,3-bütandiol kullanılmış, bağımsız değişken olarak sıcaklık ve çözücü konsantrasyonu seçilmiştir. Bu faktörlerin toplam fenolik madde, toplam antosiyanin, toplam flavonoid, DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi ve demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) üzerine etkileri belirlenmiştir.

3.2.2.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Alcea apterocarpa çiçeğinden gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkol ile elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı, alkali ortamda Folin-Ciocalteu çözültisi ile reaksiyon sonucunda oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi yoluyla belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Bu tayin için gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkolle ekstrakte edilen örnekler filtre edilip uygun oranda seyreltilmiştir. Bundan 150 µL alınıp üzerine 750 µL Folin-Ciocalteu ayracı eklenmiş 5 dk bekletildikten sonra % 7.5'lük Na₂CO₃ çözültisinden 600 µL eklenip karıştırılmıştır. Aynı şekilde tanık deneme de hazırlanmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat bekletilmiş ve UV-VIS spektrofotometresiyle (Thermospectronic-Helios Gamma, İngiltere) 760 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Kimyasal saf gallik asit ile çizilmiş standart kalibrasyon eğrisi yardımıyla toplam fenolik madde miktarı mg/kg cinsinden hesaplanmıştır.

3.2.2.2. Toplam Antosiyanin Tayini

Toplam monomerik antosiyanin miktarı, pH diferansiyel metodu kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar siyanidin-3-glikozitcinsinden hesaplanmıştır (Wrosta, 1976). Bu metoda göre, pH 1 ve pH 4.5 tampon çözültileriyle seyreltilmiş ekstraktlar, spektrofotometrede en yüksek absorbans gösterdikleri dalga boyu (gliserol ve etil

alkol için 520 nm; 1,3-bütandiol için 510 nm) ve 700 nm’de analiz edilmişlerdir. Aşağıdaki eşitlik yardımıyla toplam antosiyanin miktarı hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam Antosiyanin (mg/kg)} = A \times M_A \times SF / \varepsilon \times L$$

$$A = \text{Absorbans farkı} = (A_{510 \text{ veya } 520} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{510 \text{ veya } 520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

$$M_A = \text{Siyanidin-3-glikozit (449.2)}$$

$$SF = \text{Seyreltme faktörü}$$

$$\varepsilon = \text{Siyanidin-3-glikozitin molar absorpsansı (26900)}$$

$$L = \text{Okuma küvetinin tabaka kalınlığı (cm)}$$

3.2.2.3. Toplam Flavonoid Tayini

Toplam flavonoid içeriği, değiştirilmiş bir protokol kullanılarak belirlenmiştir (Hossain ve Shah, 2015; Lakka vd., 2019). Uygun oranlarda seyreltilen ekstraktlardan 1 mL alınıp üzerine sırasıyla % 5 NaNO₂’ten 0.3 mL, % 2 AlCl₃’ten 0.5 mL ve % 4 NaOH’ten 0.5 mL eklenmiş ve 510 nm dalga boyunda örneklerin absorpsansları okunmuştur. Değişik konsantrasyondaki epikateşin ile çizilen standart kalibrasyon eğri yardımıyla toplam flavonoid içeriği hesaplanmıştır.

3.2.2.4. DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) Serbest Radikalini Giderme Etkisinin Saptanması

Örneklerin DPPH radikalini indirgeme aktivitesini belirlemede Brand-Williams vd. (1995)’ nin bildirdiği yöntem kullanılmıştır. Uygun oranlardan seyreltilen ekstraktlardan 50 µL alınıp, 1 mL DPPH çözeltisi (% 0,0025) ile karıştırılmıştır. Aynı şekilde her bir çözücü ile tanık deneme de hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat bekletmenin ardından 517 nm dalga boyunda örneklerin tanık ile karşılaştırmalı şekilde absorpsansları okunmuştur. Daha sonra % inhibisyon değeri $[100 \times (\text{Tanığın absorpsansı} - \text{Örneğin absorpsansı})/\text{Tanığın absorpsansı}]$ belirlenmiştir. Son olarak troloks kalibrasyon eğrisi çizilerek hesaplama yapılmıştır.

3.2.2.5. Demir İndirgeme Antioksidan Gücünün (FRAP) Belirlenmesi

Demir (III)’ün, TPTZ ile oluşturduğu Fe(III)-TPTZ kompleksinin, Fe(II)-TPTZ kompleksine indirgenmesine dayanan FRAP yöntemiyle toplam antioksidan miktarı belirlenmiştir (Okan vd., 2013). Bu amaçla % 0.312 TPTZ, % 0.5407 FeCl₃ ve % 4.0824 CH₃COONa çözeltileri 1:1:10 (v:v:v) oranında karıştırılarak FRAP çözeltisi

elde edilmiştir. Uygun oranlarda seyreltmesi yapılan ekstraktlardan 50 µL alınıp, 950 µL FRAP çözeltisi ile karıştırılmıştır. Aynı şekilde tanık deneme de hazırlanmıştır. 5 dk inkubasyon süresi sonunda 593 nm dalga boyunda tanığa karşı ekstraktların absorbanları belirlenmiş, FeSO₄ ile çizilen kalibrasyon eğrisi yardımıyla hesaplama yapılmıştır.

3.2.3. Optimum Noktalarda Yapılan Analizler

3.2.3.1. Optimum Koşullarda Biyoçözücülerin Özelliklerinin Belirlenmesi

Tüm biyoçözücülerin optimum noktalarında kullanılan biyoçözücülerin viskozitesi ve FTIR spektrumları belirlenmiştir. Viskoziteyi belirlemede reometre cihazı (Buchi, CH-9230 Flawil 1, İsviçre), IR spektrumları için FTIR Spektroskopi (Perkin Elmer, Spectrum-Two, ABD, PEService 35) kullanılmıştır.

3.2.3.2. Optimum Koşullarda Biyoçözücülerle Elde Edilen Ekstraktların Özelliklerinin Belirlenmesi

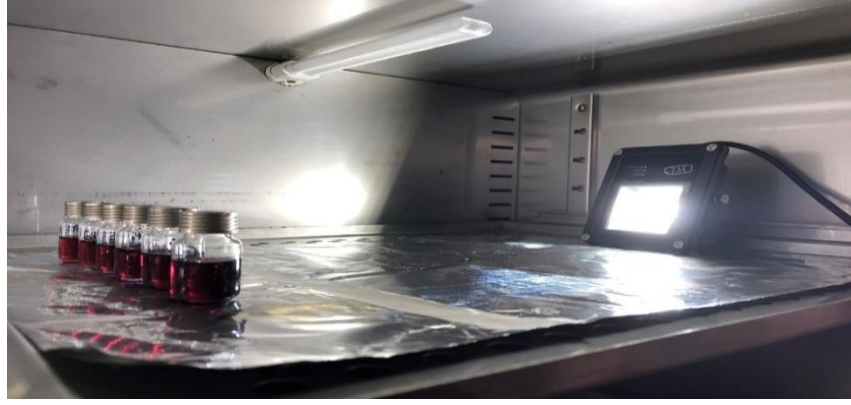
Merkezi kompozit deneme deseni uygulanarak elde edilen sonuçlardan elde edilen optimum koşullarda ekstrakte edilen örneklerde 3.2.2.1-5'te belirtilen toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanin ve antioksidan aktivite analizleri yanında stabilite testleri ve bireysel antosiyaninleri belirlenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında karanlık ve ışıkta depolama yapılmış ve toplam antosiyanindeki değişim incelenmiştir.

3.2.3.2.1. Depolama Stabilitesi

Tüm biyoçözücülerin belirlenen optimum noktalarında hazırlanan ekstraktlar; 7 hafta boyunca oda sıcaklığında karanlıkta depolamaya tabi tutulmuştur. Madde 3.2.2.2.'de verilen yöntemle göre toplam antosiyanin miktarları hesaplanmıştır.

3.2.3.2.2. Işık Stabilitesi

Tüm biyoçözücülerin belirlenen optimum noktalarında hazırlanan ekstraktlardan 1,3-bütandiol ve etil alkol ekstraktları 4 hafta, gliserol ekstraktları ise 9 hafta boyunca, oda sıcaklığına ayarlanmış bir inkübatörde (Nüve Soğutmalı ES 110 İnkübatör) ve 3000 Lux ışık şiddetinde depolamaya tabi tutulmuştur. Ekstraktlar, ışık kaynağından 30 cm uzaklığa yerleştirilmiştir (Şekil 3.2.). Depolama süresince pigmentteki değişimi belirlemek için 3.2.2.2.'de verilen yöntemle göre toplam antosiyanin tayini yapılmıştır.



Şekil 3.2. Işık stabilitesi testinin uygulaması

3.2.3.2.3. Bireysel Antosiyanin Dağılımının Belirlenmesi

Antosiyanin kompozisyonu analizi, optimum koşullarda ekstrakte edilen örneklerde, Bosiljkov vd. (2017)'nin bildirdiği metoda göre yapılmıştır. Analiz Shimadzu marka Agilent 1260; Agilent Technologies model yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile 1,3-bütandiolde 510 nm, gliserol ve etil alkolde ise 520 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Çalışma koşulları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Antosiyanin kompozisyonunu belirlemede kullanılan cihaz ve kolon özellikleri ile kromatografik koşullar

Özellikler	
Model	Shimadzu Agilent 1260
Kolon	Inertsil ODS-4 (3 µm, 4.6 x 50 mm; GL Sciences Kat No: 5020-0404)
Akış Hızı	1 mL/dk
Kolon Fırını Sıcaklığı	30°C
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Mobil Faz	(A) 2 mM sodyum asetat (% 94) (v/v) ve asetik asit (% 6) (v/v) (B) Asetonitril (% 100)
Solvent B'ye Göre Gradient Elüsyon Programı	0-20 dk., % 14-% 23 20-40 dk., % 23-35 40-50 dk., % 40 50-60 dk., % 60 60-65dk., % 95 65-80 dk., % 100

3.2.4. Deneme Deseni ve Yanıt Yüzey Yöntemi

Optimizasyon gliserol, 1,3 bütandiol ve etil alkol çözücüleri ile yapılmıştır. Optimizasyonda yanıt yüzeyi metodolojisi (RSM), merkezi kompozit tasarımı (Design Expert Software 9) kullanılarak iki bağımsız değişkenin etkisi belirlenmiştir. Bunlar A (sıcaklık) ve B (çözücü oranı, %) şeklindedir. Gerçek ve kodlanmış değerler Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Farklı çözücüler için merkezi kompozit deneysel tasarımı

Kodlu değerler	Gerçek değerler ^a		Gerçek değerler ^b		Yanıtlar
	A	B	A	B	
-1.41	24.6447	1.70963	20.6802	1.70963	TP,TF,TA, DPPH, FRAP
-1	35	16	30	16	
0	60	50.5	52.5	50.5	
+1	85	85	75	85	
+1.41	95.3553	99.2904	84.32198	99.2904	

A: Sıcaklık, °C; B: Çözücü oranı, %; a: Gliserol ve 1,3-bütandiol için deneysel tasarım; b: Etil alkol için deneysel tasarım

Bağımsız değişkenlerin kombinasyonu (sıcaklık ve çözücü oranı) ve merkezi noktada üç tekrarlı olarak 11 deney noktası çalışılmıştır. Yanıt (Y) olarak toplam fenolik madde, toplam flavonoid, toplam antosiyanin içeriği ve antioksidan aktivite alınmıştır. Deneysel veriler aşağıdaki ikinci dereceden polinom modeline uyarlanmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_{ii} + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Burada;

Y, yanıt; X, bağımsız değişken; β_0 , model katsayısı (intercept); β_i , β_{ii} , β_{ij} interaksiyon katsayısı; k, bağımsız faktörlerin sayısı ve ε deneysel hatadır. Bağımsız değişkenler ile yanıtlar arasındaki ilişki Design-Expert programında varyans analizi (ANOVA) testi kullanılarak incelenmiştir.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Farklı biyoçözücülerle hazırlanan ekstraktların arasında fark olup olmadığının belirlenmesinde SPSS 21.0 paket programı (ANOVA) kullanılmıştır. Biyoçözücülerle merkezi kompozit deney tasarımı kullanılarak yapılan sonuçlarının değerlendirilmesinde ve yanıt yüzey grafikleri için Design Expert 9 programından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Alcea apterocarpa*'nın Bazı Özellikleri

Kurutulmamış *Alcea apterocarpa*'da renk, kuru madde ve pH analizleri yapılmıştır. Yaş gülfatma örneklerinin L* değeri 40.63 ± 1.41 , +a* değeri 43.19 ± 2.44 ve +b* değeri 6.41 ± 1.60 olarak tespit edilmiştir. Daha öncede ifade edildiği gibi, “L” değeri parlaklık ve matlığı, “+a” değeri kırmızılık ve yeşilliği, “+b” değeri ise sarılık ve maviliği göstermektedir. Renk değerleri analiz edilen örneklerin koyu kırmızı renkte olduğunu göstermektedir.

Yapılan literatür çalışmasında, yaş gülfatma bitkisinin taç yapraklarına ait bir renk değerine rastlanmamıştır. Ancak Hosaka vd. (2012), aynı cinse dahil siyah *Alcea rosea* Nigra bitkisinden farklı solventlerle elde ettikleri ekstraktlarda renk analizi yapmışlardır. Dört farklı çözücü:kati oranında (60:1, 80:1, 100:1 ve 120:1) formik asit ve metil alkol karışımıyla hazırladıkları ekstraktlarda L* değerlerini sırasıyla 6.55 ± 0.18 , 12.95 ± 1.30 , 24.46 ± 2.07 ve 38.26 ± 3.11 şeklinde kaydetmişlerdir. Saptanan L değerleri bizim örneklerimizden daha düşüktür.

Yaş gülfatma örneklerinde kuru madde % 19.84 ± 0.69 olarak belirlenmiştir. Kurutulmuş örneklerde toplam kuru madde % 89.37 ± 0.06 olarak belirlenmiştir. Saıcı ve Yeşilada (2018), gölgede kurutulmuş 33 farklı hatmi örnekleri ve *Alcea* sp. cinsinde kurutmaya olan ağırlık kaybını araştırmışlardır. Kurutma kaybı testine göre 5 adet ticari hatmi numunesi *Alcea* sp.'nin toplam kati madde içeriğinin % 12.28 ile 13.25 arasında olduğunu, kalan 28'inde değerlerin bu oranların altında kaldığını tespit etmişlerdir. Bu değerler bizim örneklerimizden daha düşüktür.

Gülfatma çiçeklerinde belirlenen bir başka özellik pH değeridir. Örneklerin pH değeri 5.90 ± 0.1 olarak bulunmuştur. Bediz (2019), gelincik bitkisinin taç yapraklarında pH değerini 4.48 olarak kaydetmiştir. Bu değerler bizim örneklerimizden daha düşüktür.

4.2. Biyoçözücüler İle Yapılan Ekstraksiyon Sonuçları

Bu çalışmada gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkol olmak üzere 3 farklı biyosolventlerle antosiyaninler için optimizasyon yapılmıştır. Bağımsız değişken olarak sıcaklık ve biyoçözücü oranı seçilmiş, süre (60 dk) ve kati:çözücü oranı (1:50;

a:h) sabit tutulmuştur. Bağımsız değişkenlerin toplam fenolik madde, antosiyanin, flavonoid ve antioksidan aktivite üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

4.2.1. Gliserol İle Yapılan Ekstraksiyon Sonuçları

Gülfatma çiçeğinin toplam fenolik madde (TP), toplam flavonoid (TF), toplam antosiyanin (TA), DPPH serbest radikal giderme etkisi ve demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) üzerine bağımsız değişkenlerin (sıcaklık ve gliserol konsantrasyonu) etkisi Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Gliserol için bağımsız değişkenler ve yanıtlar

No	Bağımsız değişkenler		Yanıtlar				
	Sıcaklık (°C)	Oran (%)	TP, mg/g	TF, mg/g	TA, mg/g	DPPH, mmol/g	FRAP, mmol/g
1	24.6447	50.5	9.80	1.32	1.11	17.40	111.59
2	35	85	24.80	3.44	3.02	46.14	146.63
3	35	16	25.40	6.86	3.83	51.06	215.37
4	60	50.5	20.41	3.24	3.08	41.22	166.18
5	60	50.5	26.71	5.15	3.50	56.78	206.61
6	60	1.70963	50.04	13.84	5.06	75.62	232.89
7	60	99.2904	46.92	6.99	6.01	103.08	223.46
8	60	50.5	18.27	4.23	3.20	51.38	207.28
9	85	16	43.97	12.25	5.18	104.00	237.61
10	85	85	65.78	11.08	8.38	103.70	327.23
11	95.3553	50.5	61.07	9.86	4.55	105.54	364.97

Tablodan da görüldüğü gibi toplam fenolik madde 9.80-65.78 mg/g, toplam flavonoid 1.32-13.84 mg/g, toplam antosiyanin 1.11-8.38 mg/g, DPPH serbest radikali giderme etkisi 17.40-105.54 mmol/g ve FRAP 111.59-364.97 mmol/g arasında değişmiştir. Toplam fenolik madde ve antosiyanin en yüksek 85°C'de, flavonoid 60°C'de ekstrakte edilenlerde saptanırken en yüksek DPPH ve FRAP değerleri 95.35°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir. Sıcaklık arttıkça ekstrakte edilen madde miktarının arttığı görülmektedir. Bu durum, gliserol/su karışımını kullanarak, kurutulmuş zeytin (*Olea europaea*) yapraklarından polifenollerini ekstrakte eden Apostolakis vd. (2014) ile meyan kökünden (*Glycyrrhiza glabra*) biyoaktif bileşiklerini ekstrakte eden Ciganovic vd. (2019) tarafından da bildirilmiştir. Araştırmacılar, yüksek sıcaklıkta gliserolün viskozitesinin azalmasıyla fenoliklerin ekstraksiyonunun daha başarılı bir şekilde gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Huamán-Castilla vd. (2020), şaraplık bir üzüm çeşidinde gliserol konsantrasyonunun artması ile flavanollerin ekstraksiyonunun önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Ancak gliserol konsantrasyonu, Kowalska vd. (2021)'nin siyah kuş kirazı ve mürver ağacı meyvelerinden antosiyaninlerin ekstraksiyonu üzerine

yaptıkları çalışmada negatif bir etki göstermiştir. Bu çalışmada ise gliserol konsantrasyonunun çok belirgin bir etkisi olmamıştır.

Bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerindeki etkisine ait ANOVA sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

ANOVA varyans analizi sonuçları, bağımsız değişken olarak seçilen sıcaklık ve gliserol konsantrasyonun; lineer, kuadratik ve interaksiyon düzeyinde toplam fenolik madde, antosiyanin ve flavonoid miktarı ile antioksidan aktivite üzerine etkisini göstermektedir. Modelin önemini, tabloda yer alan F ve p değerleri gösterir. F değerlerinin yüksek, p değerlerinin ise düşük olması, modelin çok önemli olduğunu ifade etmektedir. Regrasyon analizi sonrasında p değeri 0.05'ten küçük olan etkiler; istatistiksel açıdan önemli, büyük olan etkiler ise önemsiz kabul edilmiştir (Bediz, 2019).

ANOVA sonuçlarına göre; toplam fenolik madde verimi için oluşturulan modelin 22.19 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 1.92 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu saptanmıştır. Toplam flavonoid için oluşturulan modelin 29.69 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 1.35 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Ekstrakt için toplam fenol miktarı, sıcaklıktan (A) etkilendiği ($p < 0.05$) ancak çözücü oranından (B) etkilenmediği ($p > 0.05$); sıcaklık (A^2) ve çözücü oranının (B^2) önemli derecede ($p < 0.05$) pozitif kuadratik etki gösterdiği kaydedilmiştir. Toplam flavonoid miktarında; sıcaklık, çözücü oranı ve çözücü oranının kuadratik etkisinin önemli ($p < 0.05$) olduğu kaydedilmiştir. Toplam antosiyanin için oluşturulan modelin 14.47 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 16.06 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu saptanmıştır. Toplam antosiyanin üzerine sıcaklığın (A), sıcaklık ile çözücü oranı interaksiyonunun (AB) ve çözücü oranının kuadratik etkisinin (B^2) önemli derecede ($p < 0.05$) etkili olduğu belirlenmiştir. DPPH için oluşturulan modelin 23.65 F-değeri önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 1.44 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$); FRAP için modelin 13.79 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 2.39 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

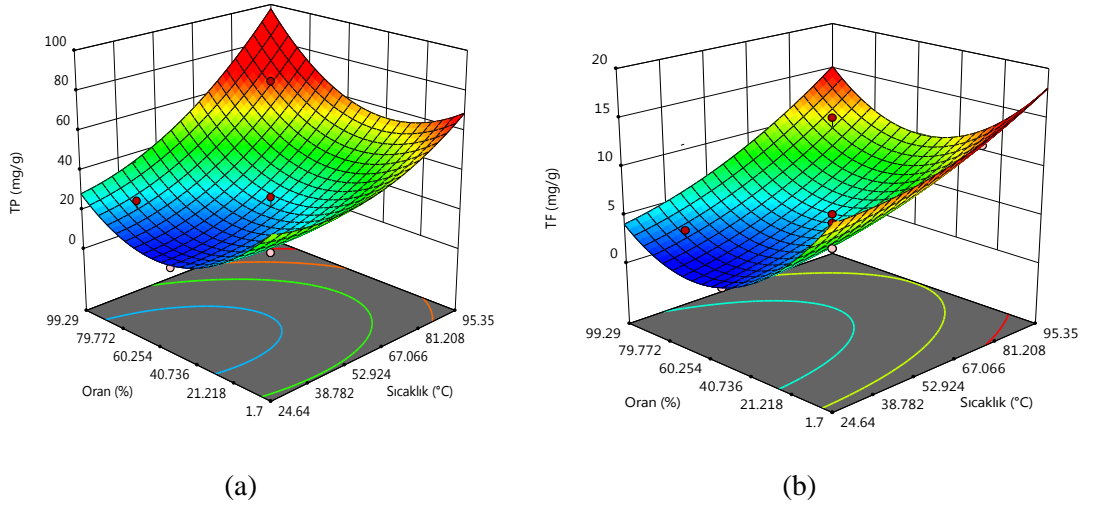
Tablo 4.2. Gliserol için ANOVA tablosu

	TP, mg/g			TF, mg/g			TA, mg/g			DPPH, mmol/g			FRAP, mmol/g		
	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri
Model	3313.15	22.19	0.0020	163.70	29.69	0.0010	34.00	14.47	0.0054	9313.39	23.65	0.0017	45641.04	13.79	0.0025
A	2179.87	73.00	0.0004	78.80	71.45	0.0004	16.75	35.65	0.0019	6911.87	87.76	0.0002	39364.45	35.69	0.0006
B	35.27	1.18	0.3267	25.48	23.10	0.0049	1.74	3.71	0.1121	141.24	1.79	0.2382	7.11	0.0064	0.9382
AB	125.55	4.20	0.0956	1.27	1.15	0.3330	4.02	8.56	0.0328	5.34	0.068	0.8050	6269.47	5.68	0.0486
A ²	226.03	7.57	0.0403	3.55	3.22	0.1327	0.0013	0.0027	0.9605	206.16	2.62	0.1666			
B ²	932.34	31.22	0.0025	58.02	52.61	0.0008	10.56	22.48	0.0051	2254.78	28.63	0.0031			
Kalıntı	149.31			5.51			2.35			393.78			7721.06		
Model uygunsuzluğu	110.81	1.92	0.3607	3.69	1.35	0.4527	2.26	16.06	0.0592	268.95	1.44	0.4356	6612.98	2.39	0.3211
Saf hata	38.50			1.82			0.094			124.83			1108.08		
Total	3462.46			169.22			36.35			9707.17			53362.10		
R ²	0.9569			0.9714			0.9354			0.9594			0.8553		
Düzeltilmiş R ²	0.9138			0.9428			0.8707			0.9189			0.7933		
Tahminlenen R ²	0.7474			0.8478			0.5530			0.7740			0.6032		
Adeq Precision	13.399			16.2753			12.48			13.771			10.959		
C.V. %	15.29			14.03			16.07			12.91			14.97		

Deneysel verinin model tarafından karşılanma derecesi; R^2 , düzeltilmiş R^2 ve C.V. ile ifade edilmektedir. Analiz sonucunda bulunan R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerleri sırasıyla; toplam fenolik madde için 0.9569 ve 0.9138, toplam flavonoid için 0.9714 ve 0.9428, toplam antosiyanin için 0.9354 ve 0.8707, DPPH için 0.9594 ve 0.9189, FRAP için ise 0.8553 ve 0.7933 olarak kaydedilmiştir. R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerinin 0 ile 1 arasında olması istenmektedir ve bu değerlerin birbirine ve 1'e yakın olması modelin uygunluğunu ifade etmektedir. Bağımlı değişkenlerde gözlemlenen bu değerler, modelin uygunluğu açısından anlamlı olarak kabul edilebilir.

Varyasyon katsayısı (C.V.), deneysel verilerin ortalamadan sapma derecelerini ve dağılımını ifade etmektedir. Varyasyon katsayısının düşük olması, yapılan işlemin güvenilirliğini göstermektedir. Bu nedenle bu değer % 10'un altında olması beklenmektedir (Bediz, 2019). Bu açıdan bakıldığında, tüm yanıtlar için bu değer istenilenden daha yüksektir.

Gliserol için toplam fenolik madde, antosiyanin ve flavonoid miktarı ile antioksidan aktiviteyi değerlendirmek amacıyla yanıt yüzey grafikleri çizilmiştir. Bağımsız değişkenlerin toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarı üzerine etkisini gösteren grafikler Şekil 4.1.'de verilmiştir.

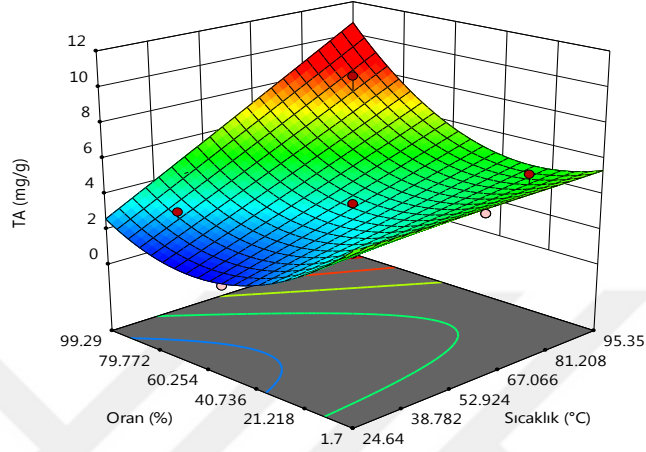


Şekil 4.1. Sıcaklık ve gliserol konsantrasyonunun a) toplam fenolik madde b) toplam flavonoid üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri

Şekiller incelendiğinde; gerek toplam fenolik madde gerekse toplam flavonoid üzerine sıcaklığın önemli etkisinin olduğu, sıcaklık arttıkça verimlerinin de arttığı ancak çözücü oranıyla toplam fenolik madde miktarının etkilenmediği flavonoid ise etkilendiği görülmektedir. Lotus çiçeği (*Nelumbo nucifera* G.) çekirdeğinden

fenoliklerin ekstraksiyonu yapan Limwachiranon vd. (2018), bu çalışmaya benzer olarak sıcaklık artışı ile beraber toplam fenolik madde ve flavonoid içeriğinin de arttığını rapor etmişlerdir.

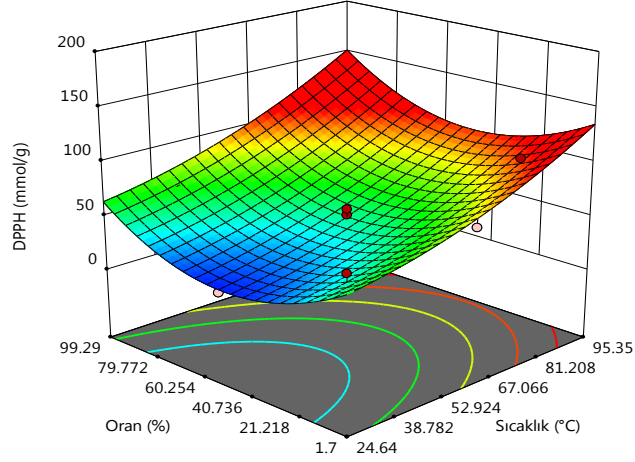
Bağımsız değişkenlerin toplam antosiyanin üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Sıcaklık ve gliserol konsantrasyonunun toplam antosiyanin üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi

Şekilden de görüldüğü gibi toplam fenolik madde ve flavonoidde olduğu gibi toplam antosiyanin üzerine sıcaklığın etkisinin önemli olduğu, sıcaklık arttıkça verimin arttığı ama çözücü oranıyla etkilenmediği görülmektedir. Soğan katı atıklarından antioksidan polifenollerin ve pigmentlerin geri kazanımı üzerine çalışan Katsampa vd. (2015), bu çalışmanın sonuçlarına zıt olarak gliserol konsantrasyonundaki artışın pigment artışına yol açtığını saptamışlardır. Bu çalışmada tek başına çözücü konsantrasyonun etkili olmadığı, sıcaklıkla birlikte uygulanması durumunda pozitif etki yaptığı kaydedilmiştir. Üzüm çekirdeğinden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin etkisini araştıran Spigno vd. (2007), verimi en üst düzeye çıkarmak için, 60°C'de daha uzun süre çalışmak yerine 45°C'de çalışmanın daha iyi olabileceğini veya 60°C'de daha kısa sürelerde (tercihen <8 saat) çalışmayı tavsiye etmiştir.

Bağımsız değişkenlerin antioksidan aktivite üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Sıcaklık ve gliserol konsantrasyonunun DPPH değerleri üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve eşyükseleli eğrisi

Şekilden görüldüğü gibi, DPPH serbest radikal giderme etkisi üzerine sıcaklığın önemli etkisi olurken, çözücü oranı etkisiz olmuştur.

İstatistik analiz sonucu elde edilen ikinci dereceden polinomiyal denkleme ait gerçek değişkenler cinsinden regresyon eşitlikleri Tablo 4.3.'te görülmektedir.

Tablo 4.3. Gliserol için deneysel veriler yardımıyla elde edilen formüller

Toplam fenol	$=21.80+16.51A+2.10B+5.60AB+6.33A^2+12.85B^2$
Toplam flavonoid	$=4.21+3.14A-1.78B+0.56AB+0.79A^2+3.21B^2$
Antosiyanin	$=3.26+1.45A+0.4667B+1.0AB+0.0150A^2+1.37B^2$
DPPH	$=49.79+29.39A+4.20B+1.16AB+6.04A^2+19.98B^2$
FRAP	$=221.80+70.15A+0.94B+39.59AB$

İstenilirlik fonksiyonundan yola çıkılarak 10 farklı nokta elde edilmiştir (Tablo 4.4.). Verilen noktaların istenilirlikleri en yüksek olanlarının değeri 0.892'dir. Programın ilk sırada verdiği bu nokta, optimum nokta olarak seçilmiştir. Buna göre gliserol için optimum ekstraksiyon koşulları % 85 konsantrasyonda ve 85°C sıcaklık olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.4. Gliserol için istenilirlik fonksiyonuna göre optimum şartlardaki tahmini değerler

No	Sıcaklık	Oran	TP	TF	TA	DPPH	FRAP	İstenilirlik	
1	85.000	85.000	65.182	10.121	7.559	110.568	332.481	0.892	Seçilen
2	85.000	84.351	64.558	10.025	7.480	109.722	341.750	0.884	
3	84.418	85.000	64.376	9.999	7.501	109.579	339.578	0.882	
4	85.000	80.191	60.776	9.460	6.999	104.639	333.081	0.839	
5	85.000	78.399	59.262	9.246	6.804	102.628	329.500	0.817	
6	85.000	16.000	49.777	12.566	4.620	99.854	262.082	0.703	
7	84.785	16.000	49.576	12.530	4.616	99.509	261.443	0.701	
8	84.311	16.000	49.133	12.451	4.607	98.747	260.039	0.695	
9	85.000	19.364	48.145	11.852	4.510	96.670	262.875	0.679	
10	85.000	19.993	47.867	11.725	4.492	96.117	263.060	0.675	

4.2.2. 1,3-Bütandiol İle Yapılan Ekstraksiyon Sonuçları

Gülfatma çiçeğinde yüksek verim koşullarının belirlenmesi amacıyla, sıcaklık ve 1,3 bütandiol konsantrasyonu değişken olarak alınıp; toplam fenolik madde (TP), toplam flavonoid (TF), toplam antosiyanin (TA), DPPH serbest radikal giderme etkisi ve demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) üzerine etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon süresi 60 dk ve çözücü:kati oranı 50:1 olarak sabit alınmıştır. Sonuçlar Tablo 4.5.'de verilmiştir.

Tablo 4.5. 1,3-bütandiol için bağımsız değişkenler ve yanıtlar

No	Bağımsız değişkenler		Yanıtlar				
	Sıcaklık (°C)	Oran (%)	TP, mg/g	TF, mg/g	TA, mg/g	DPPH, mmol/g	FRAP, mmol/g
1	24.6447	50.5	26.15	4.88	3.47	74.48	186.03
2	35	85	34.84	5.82	6.13	87.06	223.33
3	35	16	25.41	5.88	1.91	90.49	220.76
4	60	50.5	51.90	10.97	7.57	153.39	332.68
5	60	99.2904	29.83	4.63	5.77	85.91	205.32
6	60	50.5	56.65	12.35	8.10	179.70	357.20
7	60	50.5	66.23	10.28	7.48	143.10	331.40
8	60	1.70963	37.05	17.62	2.75	138.52	292.80
9	85	85	48.39	11.60	7.57	199.14	422.74
10	85	16	58.56	11.54	4.19	165.98	438.18
11	95.3553	50.5	54.44	11.03	6.13	135.10	524.37

Tablodan da görüldüğü gibi, toplam fenolik madde 25.41-66.23 mg/g, toplam flavonoid 4.63-17.62 mg/g, toplam antosiyanin 1.91-8.10 mg/g, DPPH serbest radikal giderme etkisi 74.48-199.14 mmol/g, FRAP 186.03-524.37 mmol/g arasında değişmiştir. En yüksek toplam fenolik madde, flavonoid ve antosiyanin madde miktarı 60°C'de, antioksidan aktivite verimi ise DPPH için 85°C'de, FRAP için 95.35°C'de gözlemlenmiştir. En düşük antioksidan aktivite verimi en düşük sıcaklıkta gerçekleşmiş, toplam fenolik madde ve antosiyanin miktarı ise 35°C olarak bulunmuştur. Bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerindeki etkisine ait ANOVA sonuçları Tablo 4.6.'da verilmiştir.

ANOVA sonuçlarına göre; toplam fenolik madde verimi için oluşturulan modelin 10.92 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 0.41 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu saptanmıştır. Toplam flavonoid için oluşturulan modelin 5.61 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 9.59 F-değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Ekstrakt için toplam fenol miktarı, çözücü oranından (B) etkilenmediği ($p > 0.05$); sıcaklık (A) ile sıcaklık (A^2) ve çözücü oranının (B^2) kuadratik etkilerinin önemli ($p < 0.05$) olduğu kaydedilmiştir.

Tablo 4.6. 1,3 bütandiol için ANOVA tablosu

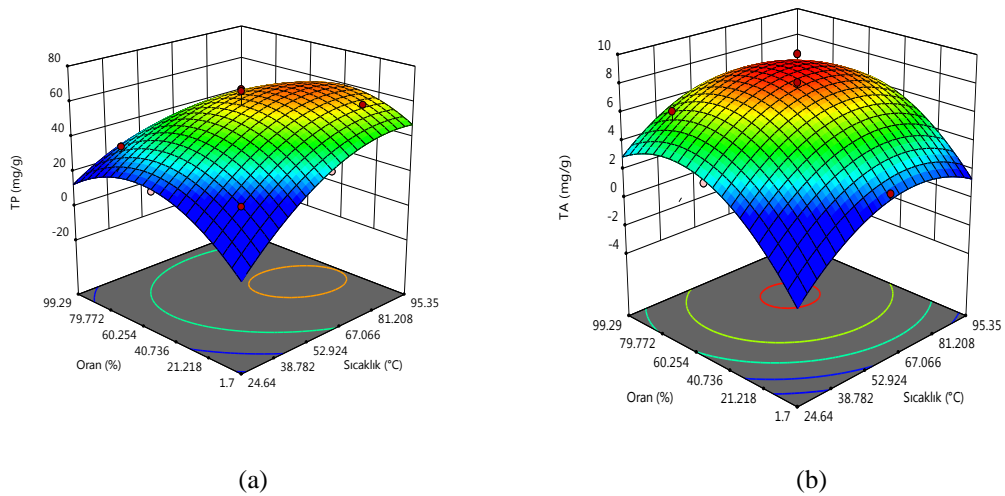
	TP, mg/g			TF, mg/g			TA, mg/g			DPPH, mmol/g			FRAP, mmol/g		
	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F-değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri
Model	1879.34	10.92	0.0101	92.87	5.61	0.0300	44.41	22.63	0.0019	9586.03	4.70	0.0447	115400	32.07	0.0008
A	939.79	27.31	0.0034	50.69	6.13	0.0384	7.00	17.82	0.0083	9336.59	9.15	0.0164	100200	139.26	<0.0001
B	14.99	0.44	0.5384	42.19	5.10	0.0539	17.61	44.87	0.0011	249.45	0.24	0.6342	2331.95	3.24	0.1317
AB	96.04	2.79	0.1556				0.18	0.45	0.5324				81.09	0.11	0.7507
A ²	339.12	9.86	0.0257				10.34	26.35	0.0037				1016.60	1.41	0.2880
B ²	705.44	20.50	0.0062				14.88	37.91	0.0016				8879.08	12.34	0.0170
Kalıntı	172.03			66.17			1.96			8159.99			3597.63		
Model uygunsuzluğu	65.47	0.41	0.7652	63.95	9.59	0.0974	1.74	5.16	0.1665	7447.44	3.48	0.2398	3174.80	5.01	0.1710
Saf hata	106.56			2.22			0.22			712.55			422.84		
Total	2051.37			159.05			46.37			17746.03			119000		
R ²	0.9161			0.5839			0.9577			0.5402			0.9698		
Düzeltilmiş R ²	0.8323			0.4799			0.9153			0.4252			0.9395		
Tahminlenen R ²	0.6562			0.1044			0.7226			0.1165			0.8022		
Adeq Precision	7.686			6.410			12.114			5.793			16.952		
C.V. %	13.18			29.68			11.29			24.18			8.35		

Toplam antosiyanin için oluşturulan modelin 22.63 F-değeri ile önemli ($p<0.05$) ve model uygunsuzluğunun 5.16 F değeri ile önemsiz ($p>0.05$) olduğu saptanmıştır. Toplam antosiyanin üzerine sıcaklık (A) ve çözücü oranı (B) ile bu iki faktörün kuadratik etkilerinin önemli derecede ($p<0.05$) etkili olduğu belirlenmiştir. DPPH için oluşturulan modelin 4.70 F-değeri ile önemli ($p<0.05$) ve model uygunsuzluğunun 3.48 F değeri ile önemsiz ($p>0.05$) olduğu belirlenmiştir. FRAP için oluşturulan modelin 32.07 F-değeri ile önemli ($p<0.05$) ve model uygunsuzluğunun 5.01 F değeri ile önemsiz ($p>0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Analiz sonucunda bulunan R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerleri sırasıyla; toplam fenolik madde için 0.9161 ve 0.8323, toplam flavonoid için 0.5839 ve 0.4799, toplam antosiyanin için 0.9577 ve 0.9153, DPPH için 0.5402 ve 0.4252, FRAP için ise 0.9698 ve 0.9395 olarak kaydedilmiştir. Bağımlı değişkenlerden TP, TA ve DPPH için gözlemlenen bu değerler, modelin uygunluğu açısından anlamlı olarak kabul edilebilir.

DeneySEL verilerin ortalamadan sapma derecelerini ve dağılımını ifade etmede kullanılan C.V. değeri, antioksidan gücünü belirleme yöntemlerinden biri olan FRAP analizi sonucunda % 8.35 olarak bulunmuş olup, istenen değer aralığındadır.

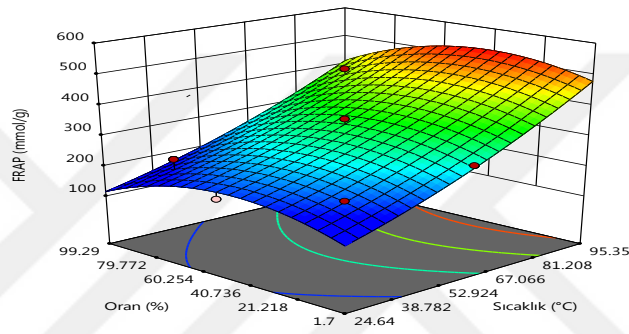
1,3 bütandiol için için toplam fenolik madde, antosiyanin ve FRAP değerlerini değerlendirmek amacıyla yanıt yüzey grafikleri çizilmiştir. Bu grafikler Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Sıcaklık ve 1,3 bütandiol konsantrasyonunun a) toplam fenolik madde b) toplam antosiyanin üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri

Şekiller incelendiğinde; gerek toplam fenolik madde gerekse antosiyanin üzerine sıcaklığın önemli etkisi vardır. Ayrıca antosiyanin üzerine çözücü konsantrasyonunun da etkisi önemlidir. Vieira vd. (2017), *Juglans regia* L. (ceviz) yapraklarından gliserol ve 1,3-bütandiol de dahil bir dizi alkol ile fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu üzerine yaptığı çalışmasıyla, bizim sonuçlarımız gibi sıcaklığın önemli etkisinin olduğunu gözlemlemiştir.

Bağımsız değişkenlerin antioksidan aktivitelerden FRAP demir indirgeme gücü üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.5.'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Sıcaklık ve 1,3 bütandiol konsantrasyonunun FRAP değerleri üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi

Toplam fenolik madde ve antosiyaninde olduğu gibi FRAP değerleri üzerine de sıcaklığın önemli etkisi bulunmakla birlikte çözücü konsantrasyonu çok etkili olmamıştır.

İstatistik analiz sonucu elde edilen ikinci dereceden polinomial denkleme ait gerçek değişkenler cinsinden regresyon eşitlikleri Tablo 4.7.'de görülmektedir.

Tablo 4.7. 1,3 bütandiol için deneysel veriler yardımıyla elde edilen formüller

Toplam fenol	$=58.26+10.84A-1.37B-4.90AB-7.75A^2-11.18B^2$
Toplam flavonoid	$=9.69+2.52A-2.30B$
Antosiyanin	$=7.72+0.94A+1.48B-0.21AB-1.35A^2-1.62B^2$
DPPH	$=132.08+34.16A-5.58B$
FRAP	$=340.43+111.91A-17.07B-4.50AB-13.42A^2-39.65B^2$

İstenilirlik fonksiyonundan yola çıkılarak 3 farklı nokta elde edilmiştir (Tablo 4.8.). Verilen noktaların istenilirlikleri en yüksek olanlarının değeri 0.859'dur. Programın ilk sırada verdiği bu nokta, optimum nokta olarak seçilmiştir. Buna göre 1,3 bütandiol için optimum ekstraksiyon koşulları % 50.184 konsantrasyonda ve 85°C sıcaklık olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.8. 1,3 bütandiol için istenilirlik fonksiyonuna göre optimum şartlardaki tahmini değerler

No	Sıcaklık	Oran	TP	TF	TA	DPPH	FRAP	İstenilirlik
1	85.000	50.184	61.406	12.229	7.287	166.293	465.953	0.859
2	84.993	49.853	61.464	12.250	7.275	166.336	466.108	0.859
3	84.998	49.435	61.532	12.279	7.258	166.411	466.374	0.859

4.2.3. Etil Alkol İle Yapılan Ekstraksiyon Sonuçları

Gülfatma çiçeğinde yüksek verim koşullarının belirlenmesi amacıyla, sıcaklık ve etil alkol konsantrasyonu değişken olarak alınıp; toplam fenolik madde (TP), toplam flavonoid (TF), toplam antosiyanin (TA), DPPH serbest radikal giderme etkisi ve demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon süresi 60 dk ve çözücü:kati oranı 50:1 olarak sabit alınmıştır. Çalışma sonuçları Tablo 4.9.'da verilmiştir.

Tablo 4.9. Etil alkol için bağımsız değişkenler ve yanıtlar

No	Bağımsız değişkenler		Yanıtlar				
	Sıcaklık (°C)	Oran (%)	TP, mg/g	TF, mg/g	TA, mg/g	DPPH, mmol/g	FRAP, mmol/g
1	20.6802	50.5	57.73	8.19	8.16	246.24	394.44
2	30	85	39.07	4.82	5.26	125.50	256.78
3	30	16	44.02	10.28	5.47	144.98	335.26
4	52.5	50.5	51.32	10.16	7.12	259.22	366.13
5	52.5	50.5	53.45	8.71	6.52	282.59	375.14
6	52.5	1.70963	18.62	6.41	2.51	106.03	260.64
7	52.5	99.2904	26.93	3.80	3.56	68.38	184.74
8	52.5	50.5	53.79	8.71	6.79	255.33	369.99
9	75	16	38.85	7.77	3.08	230.66	333.97
10	75	85	47.39	9.34	7.66	161.85	332.68
11	84.3198	50.5	50.98	10.41	6.88	238.45	402.16

Tablodan da görüldüğü gibi, toplam fenolik madde 18.62-57.73 mg/g, toplam flavonoid 3.80-10.41 mg/g, toplam antosiyanin 2.51-8.16 mg/g, DPPH serbest radikali giderme etkisi 68.38-282.59 mmol/g ve FRAP 184.74-402.16 mmol/g arasında değişmiştir. Toplam fenolik madde ve antosiyanin en yüksek 20.68°C'de, FRAP ve flavonoid 84.31°C'de ekstrakte edilenlerde saptanırken, en yüksek DPPH değeri 52.5°C sıcaklıkta gerçekleşmiştir. Sıcaklık arttıkça ekstrakte edilen madde miktarının azaldığı görülmektedir. Soğanın atıklarından polifenollerin geri kazanımı üzerine çalışma yapan Khiari vd. (2009)'nin bulguları bu çalışma sonuçlarıyla benzeşmektedir. Tersine, dondurularak kurutulmuş üzüm posasından toplam fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda sıcaklığın olumlu etkisini bildiren Nayak vd.

(2018)'nin bulgularıyla uyuşmamaktadır. Bu durum materyal farklılığından kaynaklanmaktadır.

Bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerindeki etkisine ait ANOVA sonuçları Tablo 4.10.'da verilmiştir.

ANOVA sonuçlarına göre; toplam fenolik madde verimi için oluşturulan modelin 23.38 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 10.58 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu saptanmıştır. Toplam flavonoid için oluşturulan modelin 15.20 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 0.77 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Toplam antosiyanin için oluşturulan modelin 21.42 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 5.43 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu saptanmıştır. DPPH için oluşturulan modelin 18.10 F değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 3.63 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$); FRAP için 66.26 F-değeri ile önemli ($p < 0.05$) ve model uygunsuzluğunun 10.39 F değeri ile önemsiz ($p > 0.05$) olduğu belirlenmiştir. Ekstrakt için toplam fenol miktarları, sıcaklık (A) ve alkol oranından (B) etkilenmediği ($p > 0.05$), alkol oranının (B^2) kuadratik etkisinden önemli derecede ($p < 0.05$) etkilendiği kaydedilmiştir. Toplam flavonoid ve antosiyanin miktarlarının ise alkol oranı (B) ve kuadratik etkisinden (B^2) önemli derecede ($p < 0.05$) etkilendiği görülmüştür. FRAP değerleri üzerine tüm bağımsız değişkenler ve kuadratik etkilerinin önemli derecede ($p < 0.05$) etkisi olmuştur.

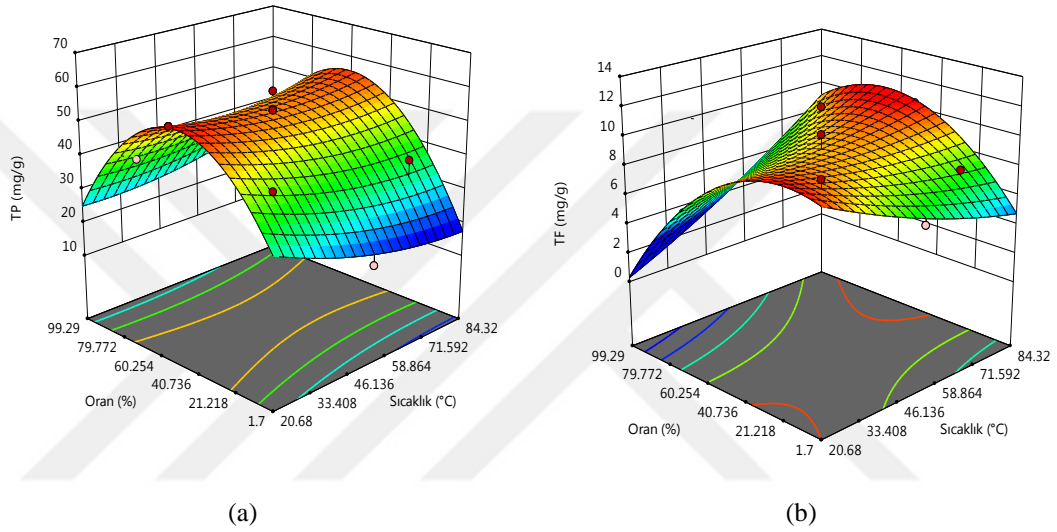
Analiz sonucunda bulunan R^2 ve düzeltilmiş R^2 değerleri sırasıyla; toplam fenolik madde için 0.9590 ve 0.9180, toplam flavonoid için 0.9383 ve 0.8766, toplam antosiyanin için 0.9554 ve 0.9108, DPPH için 0.9476 ve 0.8953, FRAP için 0.9851 ve 0.9703 olarak kaydedilmiştir. Bağımlı değişkenlerde gözlemlenen bu değerler, modelin uygunluğu açısından anlamlı olarak kabul edilebilir.

Tablo 4.10. Etil alkol için ANOVA tablosu

	TP, mg/g			TF, mg/g			TA, mg/g			DPPH, mmol/g			FRAP, mmol/g		
	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F-değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri	K.T	F değeri	p-değeri
Model	1413.05	23.38	0.0018	45.80	15.20	0.0048	35.37	21.42	0.0022	50736.16	18.10	0.0032	44917.28	66.26	0.0001
A	5.11	0.42	0.5442	3.31	5.50	0.0659	0.41	1.23	0.3185	1540.49	2.75	0.1583	914.37	6.74	0.0484
B	29.42	2.43	0.1795	7.18	11.92	0.0182	4.29	12.97	0.0155	2503.82	4.47	0.0882	4376.21	32.28	0.0024
AB	45.50	3.76	0.1101	12.35	20.51	0.0062	5.74	17.37	0.0088	608.36	1.09	0.3453	1489.57	10.99	0.0211
A ²	16.18	1.34	0.2996	0.40	0.66	0.4526	0.80	2.44	0.1793	739.22	1.32	0.3028	1267.94	9.35	0.0282
B ²	1122.26	92.83	0.0002	18.94	31.45	0.0025	19.64	59.47	0.0006	44740.70	79.81	0.0003	29945.47	220.88	<0.0001
Kalıntı	60.45			3.01			1.65			2802.93	18.10	0.0032	677.86		
Model uygunsuzluğu	56.86	10.58	0.0876	1.61	0.77	0.6091	1.47	5.43	0.1595	2368.13	3.63	0.2234	637.00	10.39	0.0891
Saf hata	3.58			1.40			0.18			434.80			40.87		
Total	1473.50			48.81			37.02			53539.09			45595.15		
R ²	0.9590			0.9383			0.9554			0.9476			0.9851		
Düzeltilmiş R ²	0.9180			0.8766			0.9108			0.8953			0.9703		
Tahminlenen R ²	0.7201			0.7008			0.7065			0.6672			0.8986		
Adeq Precision	13.794			11.244			13.755			11.611			26.026		
C.V. %	7.93			9.64			10.03			12.29			3.55		

Deneyisel verilerin ortalamadan sapma derecelerini ve dağılımını ifade etmede kullanılan C.V. değerleri, toplam fenolik madde ve flavonoid miktarı ile FRAP için analiz sonucunda sırasıyla % 7.93, 9.64 ve 3.55 olarak bulunmuş olup, istenen değer aralığındadırlar.

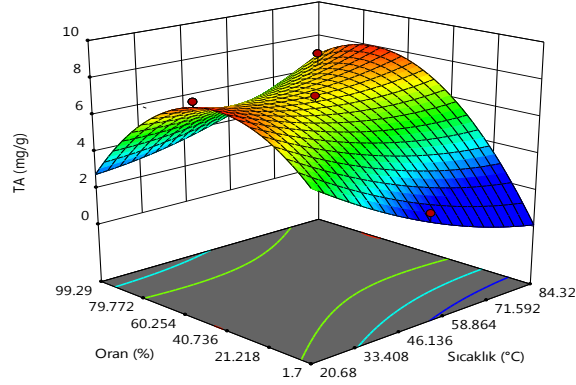
Etil alkol için toplam fenolik madde, antosiyanin ve flavonoid miktarı ile antioksidan aktiviteyi değerlendirmek amacıyla yanıt yüzey grafikleri çizilmiştir. Bağımsız değişkenlerin toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarı üzerine etkisini gösteren grafikler Şekil 4.6.'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Sıcaklık ve etil alkol konsantrasyonunun a) toplam fenolik madde b) toplam flavonoid üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri

Şekiller incelendiğinde; gerek toplam fenolik madde gerekse toplam flavonoid üzerine sıcaklığın önemli etkisinin olmadığı, ancak toplam flavonoid miktarının çözücü konsantrasyonundan etkilendiği görülmektedir. Ancak bizim çalışmamızın aksine Bucic'-Kojic' vd. (2007), üzüm çekirdeğinden toplam polifenollerin ekstraksiyonunda, yüksek ekstraksiyon sıcaklıklarını optimum nokta olarak belirlemişlerdir. Huamán-Castilla vd. (2019) *Carménère*'nin posasından ve Gunathilake vd. (2018) *Centella asiatica* bitkisinin yapraklarından polifenollerin geri kazanımında bizim çalışmamızla benzer olarak çözücü oranının etkisini gözlemlemişlerdir. Gunathilake vd. (2018) aynı zamanda sıcaklıktaki artışın pozitif etkisi olduğunu belirlemişlerdir.

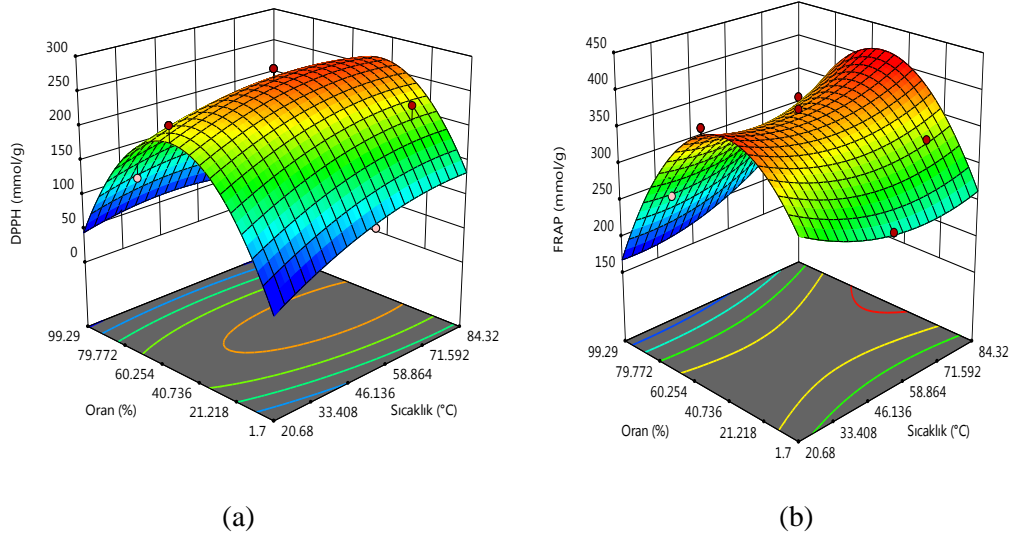
Bağımsız değişkenlerin toplam antosiyanin üzerine etkisini gösteren grafik Şekil 4.7.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Sıcaklık ve etil alkol konsantrasyonunun toplam antosiyanin üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafiği ve eşyükselti eğrisi

Şekilden de görüldüğü gibi toplam fenolik madde ve flavonoidde olduğu gibi toplam antosiyanin üzerine sıcaklığın etkisinin önemli olmadığı, sıcaklık arttıkça verimin azaldığı ama çözücü oranının etkili olduğu görülmektedir. Jensen vd. (2007), kırmızı üzüm çeşitlerinden antosiyaninlerin ekstraksiyonu üzerine çalışmalarında, düşük sıcaklık ve yüksek etanol konsantrasyonunun olumlu etkisi ile bizim çalışmamızı desteklemektedir.

Bağımsız değişkenlerin antioksidan aktivite üzerine etkisini gösteren grafikler Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Sıcaklık ve etil alkol konsantrasyonunun a) DPPH b) FRAP değerleri üzerine etkisini gösteren yanıt yüzey grafikleri ve eşyükselti eğrileri

Şekillerden görüldüğü gibi, DPPH serbest radikal giderme etkisi üzerine sıcaklık ve çözücü oranı etkisiz, FRAP demir indirgeme gücü üzerine her iki

faktörün de önemli etkisi olmuştur. Paleologou vd. (2015), patates kabuklarından polifenolik antioksidanların geri kazanımında bizim çalışmamız gibi solvent konsantrasyonunun önemli etkisi olduğunu gözlemlemişlerdir.

İstatistik analiz sonucu elde edilen ikinci dereceden polinomiyal denkleme ait gerçek değişkenler cinsinden regresyon eşitlikleri Tablo 4.11.'de görülmektedir.

Tablo 4.11. Etil alkol için deneysel veriler yardımıyla elde edilen formüller

Toplam fenol	=52.85-0.80A+1.92B+3.37AB+1.69A ² -14.10B ²
Toplam flavonoid	=9.19+0.64A-0.95B+1.76AB+0.27A ² -1.83B ²
Antosiyanin	=6.81-0.23A+0.73B+1.20AB+0.38A ² -1.87B ²
DPPH	=265.71+13.88A-17.69B- 12.33AB -11.44A ² -89.01B ²
FRAP	=370.42+10.69A- 23.39B+19.30AB+ 14.98A ² - 72.82B ²

İstenilirlik fonksiyonundan yola çıkılarak 9 farklı nokta elde edilmiştir (Tablo 4.12.). Verilen noktaların istenilirlikleri en yüksek olanlarının değeri 0.913'tür. Programın ilk sırada verdiği nokta, optimum nokta olarak seçilmiştir. Buna göre optimum ekstraksiyon koşulları % 55.180 etanol konsantrasyonu ve 75°C sıcaklık olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.12. Etil alkol için istenilirlik fonksiyonuna göre optimum şartlardaki tahmini değerler

No	Sıcaklık	Oran	TP	TF	TA	DPPH	FRAP	İstenilirlik	
1	75.000	55.180	54.205	10.179	7.190	262.437	394.200	0.913	Seçilen
2	75.000	55.710	54.224	10.183	7.211	261.586	393.817	0.913	
3	75.000	55.966	54.231	10.185	7.221	261.157	393.618	0.913	
4	75.000	53.751	54.120	10.163	7.128	264.530	395.063	0.912	
5	75.000	52.320	53.986	10.140	7.059	266.317	395.677	0.911	
6	30.000	42.921	54.985	9.321	7.425	237.277	380.576	0.863	
7	30.000	43.174	55.019	9.307	7.427	237.521	380.494	0.863	
8	30.001	42.286	54.892	9.356	7.418	236.627	380.747	0.863	
9	30.001	41.508	54.767	9.396	7.407	235.747	380.891	0.863	

4.3. Optimum Koşullarda Biyoçözücü ve Ekstraktların Özellikleri

Üç farklı biyoçözücüyle yapılan optimizasyon çalışmasında istenilirlik fonksiyonundan yola çıkılarak her çözücü için programın ilk sırada verdiği koşullarda ekstraksiyon yapılarak teorik ile pratik sonuçlar karşılaştırılmıştır. Optimum nokta olarak sıcaklık ve çözücü konsantrasyonu gliserol, 1,3 bütandiol ve etil alkol için sırasıyla 85°C'de % 85 konsantrasyon, 85°C'de % 50.184 ve 75°C'de % 55.180 belirlenmiştir. Optimum koşullarda hazırlanan biyoçözücülerin viskozite değerleri Tablo 4.13.'de verilmiştir. Görüldüğü gibi viskozitesi en yüksek gliseroldür

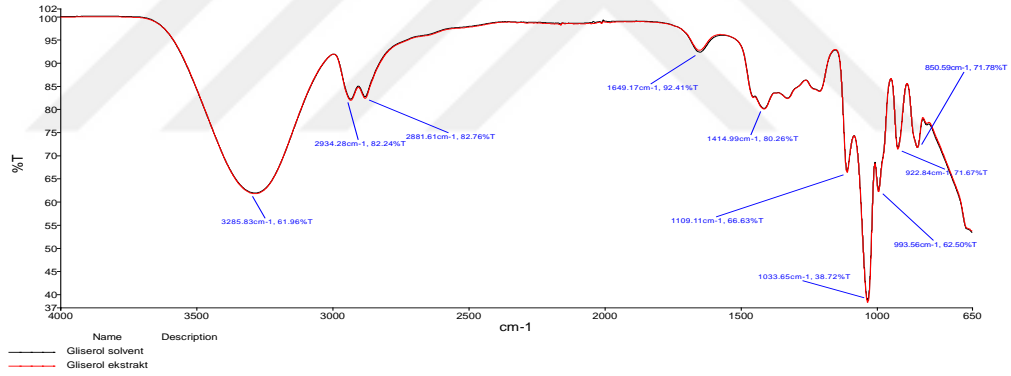
ki bu durum hücreden antioksidan bileşiklerin çıkarılmasının güç olacağını göstermektedir. Birçok araştırmacı gliserolun düşük sıcaklıklarda viskozitesinden dolayı ekstraksiyonun başarısını gölgelediğini, o nedenle sulandırma ve sıcaklık yoluyla viskozitesinin düşürülmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Aynı zamanda ultrason ve mikrodalga gibi işlemlerin tek başlarına veya beraber kullanılması, viskoziteden kaynaklı ekstraksiyon problemlerini gidermede başka bir çıkar yol olarak bildirilmiştir (Özkan ve Koca, 2021).

Tablo 4.13. Optimum koşullarda elde edilen solventlerin viskozite değerleri

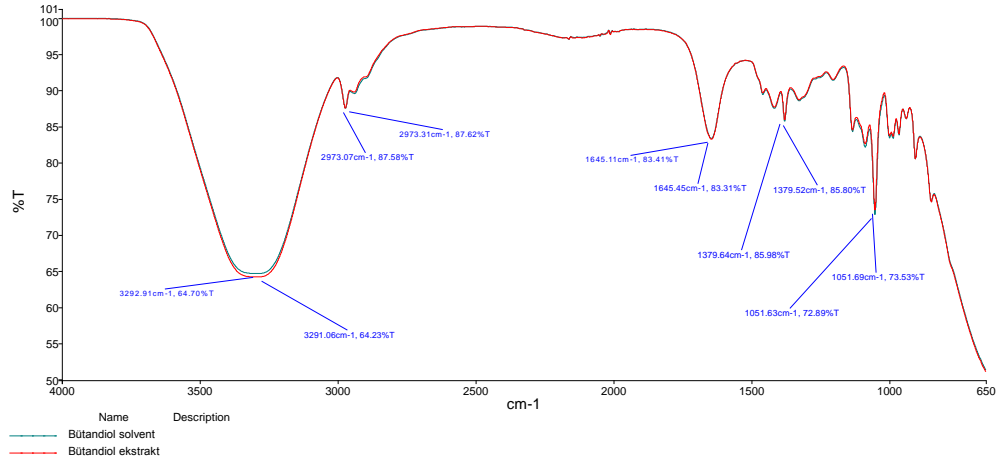
	Viskozite, Pa s
Gliserol	0.0799 ± 0.0001a
1,3-Bütandiol	0.0166 ± 0.0001b
Etil Alkol	0.0013 ± 0.0001c

* Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p > 0.05$).

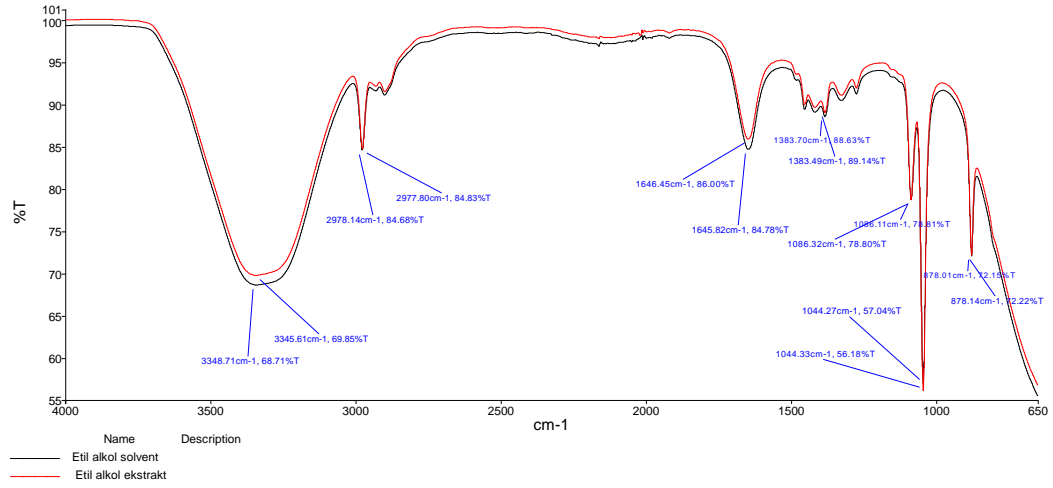
Optimum noktada kullanılan çözücüler ve ekstraktların FTIR spektrumları Şekil 4.9-12’de verilmiştir.



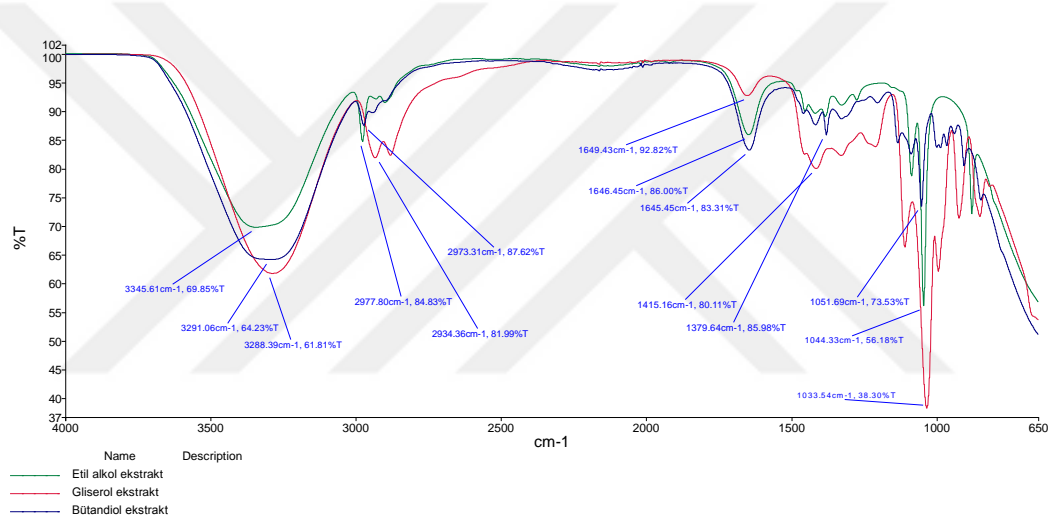
Şekil 4.9. Gliserol optimum nokta çözeltisi ve bu çözeltiyle elde edilen ekstrakta ait spektrum



Şekil 4.10. 1,3-bütandiol optimum nokta çözeltisi ve bu çözeltiyle elde edilen ekstrakta ait spektrum



Şekil 4.11. Etil alkol optimum nokta çözeltisi ve bu çözeltiyle elde edilen ekstrakta ait spektrum



Şekil 4.12. 3 biyoçözücüyle optimum noktada elde edilen ekstraktlara ait spektrumlar

Şekiller incelendiğinde, tüm spektrumların aynı eğilim gösterdiği görülmektedir. 3700-3100 cm⁻¹'deki pik, çeşitli hidroksil (OH) germe bantlarıyla ilişkilendirilebilir. 3700-3100 cm⁻¹'de OH germe bandının varlığı, alkol ve suyun varlığını işaret etmektedir (Ghaedi vd., 2017). 3700-3100 cm⁻¹'de, OH germe bandının en yüksek yoğunluğu etanol için bulunmuş, bunu 1,3-bütandiol ve gliserol izlemiştir. 2900-2750 cm⁻¹'deki dalga sayısı, C-H germe bantlarına aittir, bu gliserolde daha zayıftı. 1660-1600 cm⁻¹'deki dalga sayısı, gliserolde en yüksek yoğunluğa sahip incelenen çözücülerin C=C alil germe titreşimini temsil etmektedir. 1450-1420 cm⁻¹, 1410-1400 cm⁻¹ ve 1370-1320 cm⁻¹'deki pikler sırasıyla CH₂ makaslama titreşimi, C-OH bükme titreşimi ve =CH₂ bükme ile ilgilidir (Ghaedi vd., 2017). 1450 cm⁻¹ ve 1200 cm⁻¹ pik aralıklarında, gliserol etanol ve bütandiolden daha

zayıftır. 1100-900 cm^{-1} bölgesindeki pik noktaları, C-O germe titreşimini, C-O-C germe titreşimini, C=C alil sallanma titreşimini =CH₂ sallanma titreşimini gösterir. Çözücülerin ve ekstraktların FTIR spektrumları birlikte incelendiğinde, ekstraktların FTIR spektrumları çözücülerin kopyası gibi görünmektedir. Ekstraktlarda 3400-3100 cm^{-1} (OH), 2900-2840 cm^{-1} (C-H alifatik), 1660 cm^{-1} (C=C aromatik) ve 870-675 cm^{-1} (CH aromatik) pikleri özellikle antosiyaninlerle ilişkili olabilir (Wahyuningsih vd., 2017).

Optimum koşullardaki yanıtlara ait verim, istenilirlik fonksiyonu ile tahmin edilmiştir. Bunlar daha öncede ifade edilmişti. Burada tekrar hatırlayacak olursak (Tablo 4.14.); en yüksek toplam fenolik madde ve antosiyanin verimi gliserolle; toplam flavonoid ve FRAP verimi 1,3 bütandiolle, en yüksek DPPH verimi ise etil alkolle elde edileceği tahmin edilmiştir.

Tablo 4.14. Biyoçözücülere göre tahmini verimler

Çözücü	TP, mg/g	TF, mg/g	TA, mg/g	DPPH, mmol/g	FRAP, mmol/g
Gliserol	65.182	10.121	7.559	110.568	332.481
1,3- Bütandiol	61.406	12.229	7.287	166.293	465.953
Etil alkol	54.205	10.179	7.190	262.437	394.200

Tahmini verilerin gerçek değerlere yakınlığını tespit etmek için optimum koşullarda analizler tekrarlanmış ve sonuçlar Tablo 4.15'te verilmiştir.

Tablo 4.15. Optimum koşullarda elde edilen ekstraktların antioksidan özellikleri

Çözücü	TP, mg/g	TF, mg/g	TA, mg/g	DPPH, mmol/g	FRAP mmol/g
Gliserol	65.78±1.85a	11.08±0.25	8.38±1.08	103.70±7.87c	327.23±16.51b
Bütandiol	48.85±0.45c	11.95±1.09	7.46±0.01	188.55±6.79b	437.54±4.50a
Etil alkol	59.94±3.00b	12.16±0.25	8.04±0.47	206.99±6.00a	265.79±30.87c

* Aynı sütunda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p>0.05$).

Tahmini değerlerle gerçek değerler karşılaştırıldığında; gliserol ve etil alkol ekstraktlarının gerçek toplam fenolik madde, flavonoid ve antosiyanin içeriğinin daha yüksek, 1,3-bütandiol ekstraktlarının ise toplam fenolik madde ve flavonoid içeriğinin daha düşük olduğu görülmektedir. Farklı biyoçözücülerle saptanan toplam fenolik madde içeriği en yüksek gliserolde belirlenmiş ve diğerlerinden istatistiksel açıdan farklı olduğu görülmüştür. Bu çalışmada pigment eldesi ana hedeftir ki 3 çözücüde istatistiksel açıdan benzer antosiyanin verimine yol açmıştır.

Shehata vd. (2015), *Artemisia arborescens* ve *Artemisia inculta* Delile bitkilerinden polifenollerin geri kazanımında % 90 gliserol konsantrasyonunu optimum nokta seçerek, ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarları bizim çalışma sonuçlarımıza yakın değerler olmuştur. Aalim vd. (2019)'nin de Asya pirinci kepeğinden polifenolik antioksidanları ekstrakte ederken seçtikleri optimum ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraktlarımızinkine yakın olup, 90°C'dir. Kırmızı kabuklu elmalardan polifenollerin geri kazanımında biyoçözümleri kullanan Blidi vd. (2015), en yüksek verimi % 50 etanol, % 50 bütandiol ve % 70 gliserol konsantrasyonunda, 100 mL/g sıvı-katı oranı ile 80°C ekstraksiyon sıcaklığında belirlemişlerdir. Huang vd. (2019), *Receptaculum nelumbinis* bitkisinden fenoliklerin ekstraksiyonunda, gliserol viskozitesinden dolayı optimum koşulları yüksek ekstraksiyon sıcaklık ve konsantrasyonunda belirlemişlerdir. Bu bulgular, çalışma sonuçlarıyla uyumludur.

Gliserol konsantrasyonunun sabit tutulduğu bir çalışmada; patates ve patlıcan kabukları ve kahveden % 80 gliserol, % 50 sulu metanol ve % 50 sulu etanol ile yapılan ekstraksiyonda toplam polifenol veriminin eşit olduğu kaydedilmiştir (Manousaki vd., 2016). Philippi vd. (2016), polifenollerin ekstraksiyonunda etanol ve gliserolle aynı verimi sağlandığını rapor etmişlerdir. Etanolün gliserol ekstraktlarına göre daha yüksek bir difüzyon katsayısına sahip olduğunu kaydetmişlerdir. Karakashov vd. (2015 a ve b), suya kıyasla su/gliserol karışımı ile görülen daha yavaş ekstraksiyon hızına rağmen daha yüksek toplam polifenol ekstraksiyon verimleri elde etmede su/gliserolün üstünlüğünü bildirmişlerdir. Bu, bizim sonuçlarımıza paraleldir. Athanasiadis vd. (2017), zeytin (*Olea europaea*) yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonunda gliserol bazlı derin ötektik solventlerle % 60 etanol ve % 60 metanolü kıyaslamışlardır. Sonuç olarak derin ötektik solvent haliyle de gliserolden etanole göre % 18, metanole göre % 24 daha fazla verim elde etmişlerdir. Bizim sonuçlarımız araştırmacıların bulgularıyla uyumludur.

Etil alkol için bu çalışmada belirlenen optimum koşullar (75°C, % 55.180), Jokić vd. (2010)'nin Ika'dan etil alkol ile toplam polifenollerin ekstrakte edilmesinde seçtikleri optimum noktayla birbirine yakındır.

Radulescu vd. (2017), lavanta çiçeğinden fenoliklerin eldesinde, en yüksek toplam fenol içeriğini etil alkolle sağlamışlardır. Optimum noktayı ise bizim sonuçlarımıza yakın olarak belirlemişlerdir. Eyiz vd. (2019), kırmızı üzüm

posasındaki çalışmalarında, bizim optimum gliserol konsantrasyonumuzdan daha düşük konsantrasyonla optimum verim elde etmişlerdir. Bu durum hem materyalin hem de ekstraktların sıvı-katı oranlarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır.

Filtre kahve tortusundan fenolik bileşenlerin geri kazanımını hedefleyen Michail vd. (2015), bu çalışmanın aksine daha uzun sürede ve daha düşük gliserol konsantrasyonu ile yüksek verim elde etmişlerdir. Dragovic-Uzelac vd. (2012), kurutulmuş yabani adaçayından polifenollerin ekstraksiyonunda optimum etil alkol konsantrasyonunu % 30 olarak belirlemişlerdir. Yapılan çalışmalardaki optimum nokta farklılıkları, ekstraksiyon yöntemi ile materyal farklılığından kaynaklanmaktadır.

4.3.1. Antosiyanin Profilinin Belirlenmesi

Gülfatma çiçeğinden merkezi kompozit yöntemi istenilirlik fonksiyonuna göre her bir biyoçözücü için belirlenen optimum noktalarda elde edilen ekstraktlarda HPLC ile antosiyanin bileşikleri belirlenmiştir. Elde edilen kromatogramlar Şekil 4.13., Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.'te, sonuçlar ise Tablo 4.16.'da verilmiştir. Ekstraktlarda siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-rutinozit, pelargonidin-3-glukozit ve siyanidin klorit tanımlanabilmiştir.

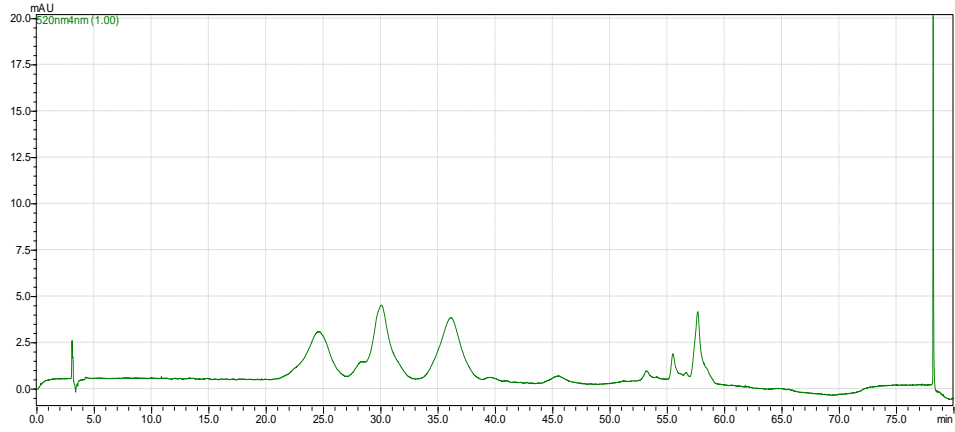
Tablo 4.16. Biyoçözücülerle hazırlanan ekstraktların antosiyanin profili

		Gliserol	1,3 bütandiol	Etil alkol
CYN-3-GLU	RT	24.506	24.753	24.682
	Miktar, mg/g	0.99±0.00b	0.82±0.00c	1.36±0.03a
CYN-3-RUT	RT	30.032	30.149	30.212
	Miktar, mg/g	2.20±0.03	2.28±0.01	3.04±0.02a
PLG-3-GLU	RT	36.124	36.148	36.228
	Miktar, mg/g	2.40±0.00b	2.23±0.00c	2.84±0.03a
CYN-CL	RT	39.462	39.484	39.769
	Miktar, mg/g	0.02±0.00b	0.03±0.00b	0.04±0.01a

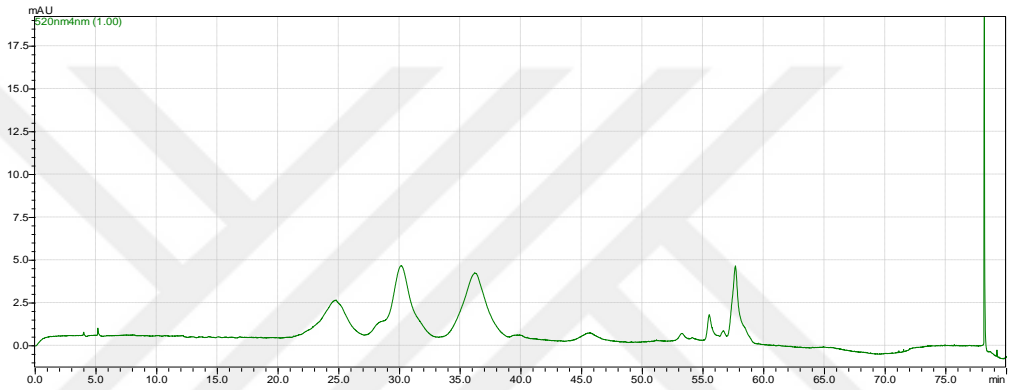
RT: Alıkonma zamanı (dk); CYN-3-GLU: Siyanidin-3-glukozit; CYN-3-RUT: Siyanidin-3-rutinozit; PLG-3-GLU: Pelargonidin-3-glukozit; CYN-CL: Siyanidin klorit

**Aynı satırda aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark yoktur (p>0.05).*

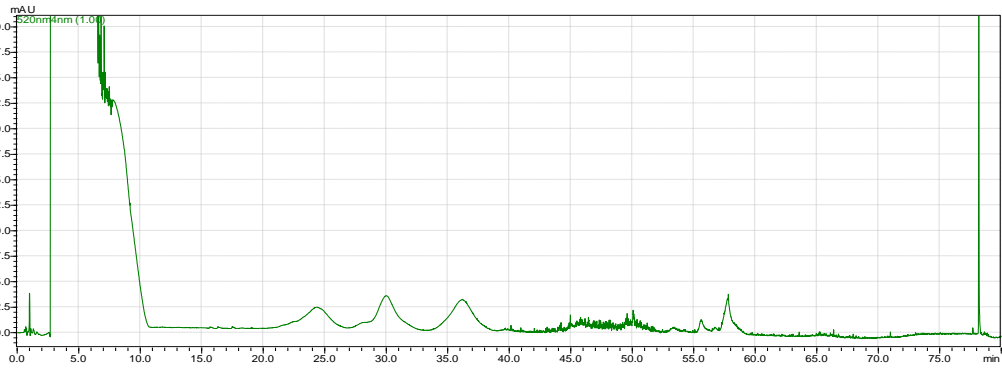
Tablodan da görüldüğü gibi siyanidin-3-rutinozit ve pelargonidin 3-glikozit tüm çözücüler için dominant antosiyanindir. Etil alkolle yapılan ekstraksiyon tüm antosiyaninlerde daha fazla bir verime yol açmıştır ki bu durum istatistiksel olarak da farklıdır (p<0.05).



Şekil 4.13. Gliserol ekstraktlarındaki antosiyaninlere ait kromatogram



Şekil 4.14. 1,3-bütandiol ekstraktlarındaki antosiyaninlere ait kromatogram



Şekil 4.15. Etil alkol ekstraktlarındaki antosiyaninlere ait kromatogram

Literatürde gülfatma çiçeğinden yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile antosiyaninlerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar bulunmamaktadır ancak farklı fenolik bileşiklerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. Ertas vd. (2016), *Alcea apterocarpa* ve *Alcea pallida*'nın metil alkol ekstraktlarında HPLC ile askorbik asit, kafeik asit, salisilik asit, p-hidroksibenzoik asit ve kersetin varlığını tespit etmişlerdir. Aybastier (2021), bizim çalışmamıza benzer olarak karadutun

içeriğinde siyanidin-3-glukozit, siyanidin-3-rutinozit ve pelargonidin-3-glukozit varlığını gözlemlemiştir. Chen vd. (2007), ahudududan ultrason destekli ekstraksiyonuyla, Cheok vd. (2013) ise Mangosteen kabuğundan metanol kullanarak ultrason destekli ekstraksiyon ile siyanidin-3-glukozit ekstraksiyonu yapmışlardır. Rao (2010), liçi meyvesinin kabuğundan etanol kullanarak ultrases destekli ekstraksiyon ile siyanidin-3-rutinozit elde etmiştir.

Yapılan bu çalışma sonucunda gülfatma çiçeğinin yüksek miktarda siyanidin-3-rutinozit ve pelargonidin-3-glukozit içerdiği saptanmıştır. Siyanidin ve pelargonidin, bitkilerde en fazla bulunan antosiyanidinler arasında yer almaktadır. Çalışmada belirlenen bu bileşikler, sahip oldukları antioksidan etkileri bakımından ön plana çıkmaktadırlar.

4.3.2. Optimum Koşullarda Elde Edilen Ekstraktların Pigment İçeriği Üzerine Depolamanın Etkisi

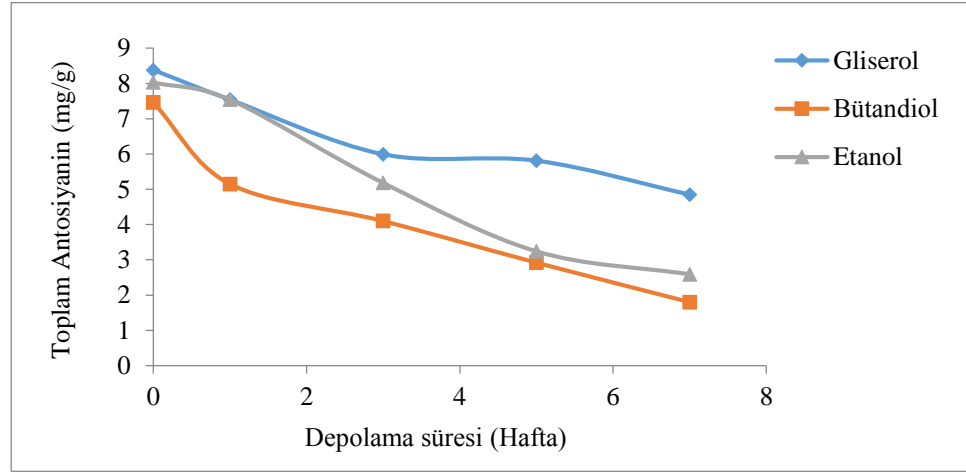
Tüm biyoçözücülerin belirlenen optimum noktalarında ekstraktlar tekrar hazırlanmış; 7 hafta boyunca, oda sıcaklığında depolamaya tabi tutulmuştur. Her bir solventte toplam antosiyanin miktarı üzerine, oda sıcaklığının etkisi belli periyotta incelenmiştir. Gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkol ekstraktlarının antosiyanin analizlerine ait ortalamaları Tablo 4.17.'de verilmiştir.

Tablo 4.17. Oda sıcaklığı ve depolama süresinin biyoçözücü ekstraktlarının toplam antosiyanin değerleri (mg/g) üzerine etkisi

	Süre (Hafta)				
	0	1	3	5	7
Gliserol	8.38±1.08	7.54±0.05	5.99±0.91	5.81±0.10	4.85±0.33
1,3-Bütandiol	7.46±0.02	5.15±0.26	4.10±0.22	2.92±0.62	1.80±0.12
Etil alkol	8.03±0.47	7.54±0.14	5.18±0.52	3.24±0.02	2.59±0.42

Tablodan da görüldüğü gibi oda sıcaklığında depolanan ekstraktların depolama süresince antosiyanin değerlerinde önemli derecede azalma olduğu görülmektedir. 7. haftanın sonunda en yüksek antosiyanin miktarı gliserol ekstraktlarında belirlenmiştir. Diğer biyoçözücülere kıyasla gliserol ekstraktlarında antosiyanin değerinin daha yüksek olması, gliserol ile gülfatma çiçek ekstraktlarının renginin daha iyi korunduğunu göstermektedir. Diğer haftalara kıyasla bir önceki haftaya göre en çok azalış gliserol ve etil alkolde 3. haftada, 1-3 bütandiolde ise 1. haftada gözlemlenmiştir.

Biyoçözücü ekstraktlarının, oda sıcaklığında depolama sürecinde toplam antosiyanindeki değişim Şekil 4.16.'da verilmiştir.



Şekil 4.16. Oda sıcaklığında depolanan biyoçözücü ekstraktlarının toplam antosiyanin miktarındaki değişimi

Şekil 4.16.'da görüldüğü gibi oda sıcaklığında depolanan ekstraktların toplam antosiyanin miktarında depolama süresince sürekli azalış saptanmıştır. Oda sıcaklığında 7 hafta depolanan gliserol ekstraktlarında 0. haftaya göre 1., 3., 5. ve 7. haftadaki antosiyanin kayıpları sırasıyla % 10.02, 28.52, 30.67 ve % 42.12'dir. 1,3-bütandiol ekstraktlarında 0. haftaya göre 1., 3., 5. ve 7. haftadaki antosiyanin kayıpları sırasıyla % 30.96, 45.04, 60.86 ve % 75.87'dir. Etil alkol ekstraktlarında 0. haftaya göre 1., 3., 5. ve 7. haftadaki antosiyanin kayıpları sırasıyla % 6.10, 35.49, 59.65 ve % 67.74'dir.

4.3.3. Optimum Koşullarda Elde Edilen Ekstraktların Antosiyanin İçeriği Üzerine Işığın Etkisi

Tüm biyoçözücülerin belirlenen optimum noktalarında ekstraktlar tekrar hazırlanmış; 1,3-bütandiol ve etil alkol ekstraktları 4 hafta, gliserol ekstraktları ise 9 hafta boyunca, 3000 Lux şiddetindeki bir ışık kaynağından 30 cm uzaklıkta ve sabit bir sıcaklıktaki inkübatörde (25°C) depolamaya tabi tutulmuştur. Her bir solventte toplam antosiyanin miktarı üzerine, uygulanan ışığın etkisi birer hafta sıklıkla incelenmiştir.

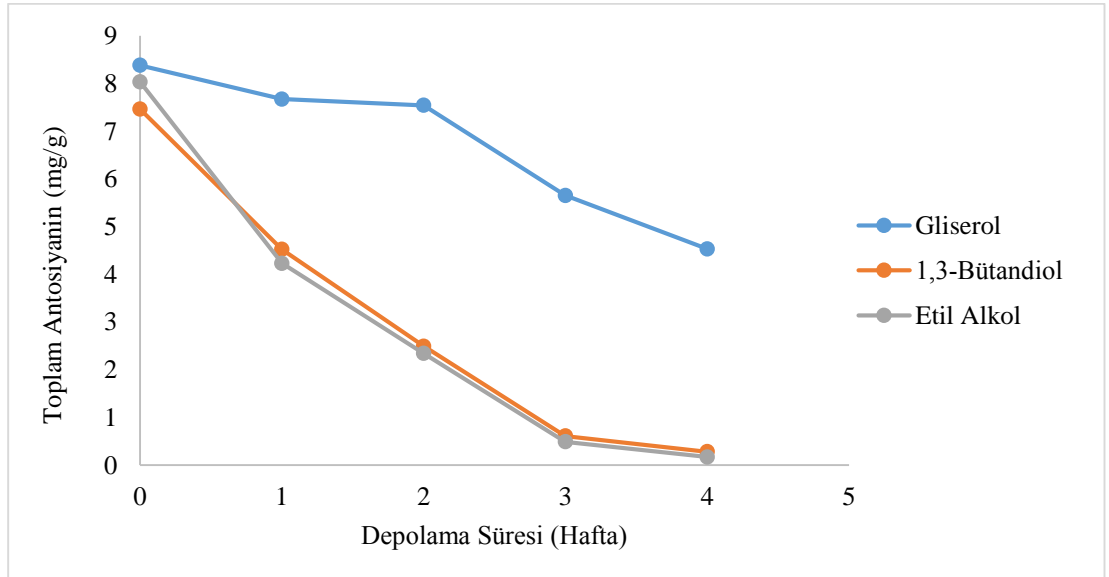
1,3-bütandiol ve etil alkol ekstraktlarında Şekil 4.17.'de de görüldüğü gibi antosiyaninlerdeki kayıplar nedeniyle gözlemlenen renk açılması sonucunda, ışık

karşısında depolamaya 4. haftadan sonra son verilmiş, 5. haftadan itibaren depolamaya yalnızca gliserol ekstraktları ile devam edilmiştir.



Şekil 4.17. Işıktaki depolanan ekstraktların 4. hafta sonundaki görünüşleri

Işıktaki 9 hafta boyunca depolamaya tabi tutulan gliserol ekstraktlarında 0. haftaya göre 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. ve 9. haftadaki antosiyanin kayıpları sırasıyla % 8.47, 10.02, 32.58, 45.94, 54.77, 56.56, 72.91, 79.00 ve % 86.51'dir. 0. haftaya göre 1., 2., 3. ve 4. haftadaki antosiyanin kayıpları sırasıyla 1,3-bütandiol ekstraktlarında % 39.41, 66.62, 91.82 ve 96.25; etil alkol ekstraktlarında % 47.32, 70.86, 93.90 ve 97.88 olmuştur. İlk 4 haftadaki değişim ele alınacak olursa (Şekil 4.18.) ışığa karşı en dayanıklı olan ekstraktın gliserol ile özütlenenler olduğu görülmektedir.



Şekil 4.18. Işıktaki depolanan ekstraktların toplam antosiyanin içeriklerindeki değişim

Bakhshayeshi vd. (2006), asitlendirilmiş etanol ile dört farklı *Malus* türünden antosiyanin pigmentlerini ekstrakte etmişlerdir. Ekstrakte edilen antosiyanin pigmentlerini daha sonra 3 ay boyunca farklı pH (1, 2.5 ve 4), sıcaklık (5, 20, 30 ve 40°C) ve ışığın varlığı/yokluğu gibi çevresel faktöre maruz bırakmışlardır. Çevre koşulları nedeniyle en fazla tahribata uğrayan türün *M. domestica* cv. red starking olduğunu belirlemişlerdir. Elde ettikleri pH etkisi sonuçlarına göre 2.5 ile 4 arasındaki pH değişimi sonucu meydana gelen antosiyanin yıkımı, 1 ile 2.5 arasındaki pH değişimine kıyasla daha fazladır. Tüm türlerin ekstraktlarında artan pH, sıcaklık ve ışığın antosiyanin pigmentlerinde kayba sebebiyet verdiğini gözlemlemişlerdir. Işıkla ilgili bildirilenler bizim kaydettiklerimizle paraleldir.

Laleh vd. (2006), dört farklı *Berberis* türünden (*B. khorasanica*, *B. integerrima*, *B. orthobotrys* ve *B. vulgaris*) antosiyanin pigmentlerini asitlendirilmiş etanol ile ekstrakte etmişler ve 84 gün boyunca depolamışlardır. Bu süreçte ekstraktlar üzerine pH (0, 1.5 ve 3), sıcaklık (5, 15, 25 ve 35°C) ve ışığın etkisini incelemişlerdir. Depolamanın sonunda en kararlı antosiyanin formunu *B. khorasanica* türünde, en az kararlı antosiyanin formunu *B. integerrima* türünde tespit etmişlerdir. Artan pH ve sıcaklık, ekstraktlarda antosiyaninlerin daha fazla kaybına neden olmuştur. Bu nedenle en fazla kayıp % 94 ile pH 3'de *B. integerrima* türünde ve % 89.42 ile 35°C'de *B. integerrima* türünde belirlemişlerdir. Işığın etkisinin antosiyanin kaybını hızlandırdığını gözlemlemişlerdir. En fazla kayıp ışık varlığında % 96.61 ile *B. orthobotrys* türünde belirlemişlerdir. Bu kadar büyük kayıp bizim etil alkol ve bütandiol ile elde edilen ekstraktlarımızda da olmuştur.

Ferreira Ozela vd. (2007), HCl ile pH'ı 2'ye ayarlanmış metanol kullanarak ıspanak asmasından pigment ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Ekstraktların antosiyanin stabilitesini, reaksiyon hızı sabitini ve yarı ömür süresini; pH 4.0, 5.0 ve 6.0'da, hem 40°C hem de 60°C'de, ışık varlığında ve yokluğunda test etmişlerdir. Sonuçlar, pH değerlerinden bağımsız olarak ortalama yarı ömür süresinin, karanlıkta yer alan numunelerde ışığa maruz bırakılana kıyasla daha büyük olduğunu göstermektedir ki bu bizim bulgularımızla da paraleldir. Işık varlığında antosiyanin pigmentinin bozunmasının, artan sıcaklıkla arttığını gözlemlemişlerdir. Ekstraktlar, ışığın hem varlığı hem de yokluğunda pH 5.0 ve 6.0'da pH 4.0'e göre daha stabil olduğunu belirlemişlerdir.

Devi vd. (2012), kırmızı sorgum kepeğinden elde edilen antosiyaninlerin stabilitesi üzerine aydınlık ve karanlık ortamlarda sıcaklık (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70°C) ve pH'nın (1.1-10.5) etkisini incelemiştir. Ekstraksiyonu metanol ve asitlendirilmiş metanol ile yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre sorgum antosiyaninlerinin ışık varlığında yarı ömrü her iki ekstraktta da karanlıktan daha düşüktür. Bu durum bizim sonuçlarla uyumludur. Sıcaklığın hem ışıktaki hem de karanlıkta antosiyanin pigmentinin stabilitesi üzerine büyük bir etkisi olduğunu gözlemlemiştir. Sorgum antosiyaninlerinin, aydınlık ve karanlık koşullara maruz kaldıklarında bile 0°C'de stabil olduğunu tespit etmişlerdir. Sıcaklık gibi pH da antosiyanin pigmentinin stabilitesi üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Sorgum antosiyaninlerinin hem metanol hem de asitlendirilmiş metanol ekstraktlarında pH 1.1, 8.0, 8.9 ve 9.9'da daha stabil olduğunu belirlemiştir.

Rakkimuthu vd. (2016), genellikle atık olarak değerlendirilen *Cocculus hirsutus* (L) Diels'in meyvesinin asitlendirilmiş metanol ekstraksiyonunu kullanarak, doğal renklendirici olarak kullanılma olasılığını araştırmışlardır. Ekstrakte edilen antosiyanin pigmentlerini daha sonra antosiyanin moleküllerini kararsızlaştırabilecek bir dizi çevresel koşula maruz bırakmışlardır. Bu çevresel koşullar, pH (1, 3, 5, 7 ve 9), sıcaklık (4, 37, 50 ve 100°C) ve ışığın varlığı şeklindedir. pH'daki artışın numunelerin antosiyanin kaybını gözlemlemiştir. Dolayısıyla antosiyaninlerin düşük pH değerleri (<5.0) altında kararlı olduğunu ve alkali koşullar altında kararsız olduğunu kanıtlamışlardır. *Cocculus hirsutus* meyvesi ekstraktlarındaki antosiyaninlerin pH 1 ve 3'de daha kararlı olduğunu belirlemiştir. Ekstraktlardaki antosiyaninler yüksek sıcaklıkta ve karanlık ortamda hızlı bir şekilde bozunmuştur. Işık varlığında 50 ve 100°C'de daha yüksek antosiyanin bozunma seviyesi gözlemlemiştir. Işık etkisini tek başına değerlendirdiklerinde nispeten, karanlık koşullarda antosiyanin bozunmasının, ışık altında bozunmadan çok düşük ve yavaş yavaş olduğunu belirlemiştir. Bu sonuçlar bizim bulgularımıza paraleldir.

Ali vd. (2018), % 79 etanol ile ultrason destekli ekstraksiyon yöntemini kullanarak kurutulmuş *Piper betle*'nin ekstraktlarını hazırlamışlardır. Ekstraktları 5°C ve 25°C'de aydınlık ve karanlık ortamda 6 ay boyunca depolamaya tabi tutmuşlardır. Depolamanın ardından toplam fenolik bileşiklerin ve antioksidan aktivitenin stabilitesini kontrol etmişlerdir. Sonuçlar hem ışığın hem de sıcaklığın, zaman içinde toplam fenol konsantrasyonunu ve buna karşılık gelen antioksidan

aktiviteyi önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. En iyi stabiliteyi 5°C’de karanlık ortamda depolana ekstraktlardan elde etmişlerdir. Bu koşullarda toplam fenolik bileşiklerin % 95’ten fazlasının, DPPH antioksidan aktivitesinin % 99.98’inin korunduğunu gözlemlemişlerdir. Bireysel fenolik bileşenlerden elde ettikleri sonuçlara göre hidrosikavikol, bozunma olmadan en iyi stabiliteyi gösterirken, öjenol ve izoöjenol 5°C’de ve karanlık koşullarda orta düzeyde stabilite göstermiştir. 4-allil-1,2-diasetoksibenzen, tam bozunmaya uğrayan tek bileşiktir. Yeni bir bileşik olan 2,4-di-tert-bütilfenolü, yalnızca ışığa maruz kalan ekstraktlarda beş haftalık depolamadan sonra tespit etmişlerdir. Araştırmacıların bulguları bu çalışmayla uyumludur.

Esparza vd. (2020), bir üzüm çeşidi olan Mazuelo sapslarıyla hazırlanan etil alkol ekstraktlarının 25 ve 40°C’de, amber renkli ve şeffaf şişelerde olmak üzere 2 farklı ışık koşulları altında antioksidan stabilitesini incelemişlerdir. Ekstraktları 6 ay boyunca floresan lamba altında depolamaya tabi tutmuşlar ve 2 ayda bir antioksidanların kapasitesini ve antosiyaninlerin durumunu incelemişlerdir. Ekstraktların farklı koşullar altında saklanması sırasında, özellikle 6 aylık depolamadan sonra toplam polifenol içeriğinin zamanla önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir. 40°C’de saklanan numunelerin, 25°C’de depolanana göre önemli ölçüde daha düşük polifenol içeriğine ve antioksidan kapasitesine sahip olduğunu belirlemişlerdir. Gallik asit ve kersetin türevi konsantrasyonu, depolama süresi boyunca stabil kalmıştır. Buna karşılık, kateşin, sadece iki aylık depolamada tüm ekstraktlardan kaybolmuştur. Yapılan bu çalışmada antosiyaninler, sıcaklıktan önemli ölçüde etkilenmiş, ışık ve 40°C’de depolama ekstraktların bozunmasını arttırmıştır ki ışığın etkisi tarafımızdan kaydedilenle uyumludur.

Tüm bu çalışmalardan da görüldüğü gibi depolamada ışığın varlığı ve sıcaklık antosiyanin kaybını artırmaktadır. Bu çalışmada da biyoçözücülere bağlı olarak depolama stabilitesi değişmiştir. Gliserol hem karanlık hem de ışıkta depolanana daha iyi korunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, *Alcea apterocarpa* bitkisinin taç yapraklarından fenolik bileşikler merkezi kompozit deneysel tasarım planına göre katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile biyosolventlerden gliserol, 1,3-bütandiol ve etil alkol kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde, antosiyanin ve flavonoid miktarı ile antioksidan aktivite (DPPH ve FRAP) analizleri yapılmıştır. Her bir yöntem için faktörler ile yanıtlar arasındaki ilişkiler incelenmiştir.

Farklı ekstraksiyon koşullarında gliserol için toplam fenolik madde 9.80-65.78 mg/g, toplam flavonoid 1.32-13.84 mg/g, toplam antosiyanin 1.11-8.38 mg/g, DPPH serbest radikali giderme etkisi 17.40-105.54 mmol/g ve FRAP 111.59-364.97 mmol; 1,3-bütandiol için toplam fenolik madde 25.41-66.23 mg/g, toplam flavonoid 4.63-17.62 mg/g, toplam antosiyanin 1.91-8.10 mg/g, DPPH serbest radikal giderme etkisi 74.48-199.14 mmol/g, FRAP 186.03-524.37 mmol/g; etil alkol için toplam fenolik madde 18.62-57.73 mg/g, toplam flavonoid 3.80-10.41 mg/g, toplam antosiyanin 2.51-8.16 mg/g, DPPH serbest radikali giderme etkisi 68.38-282.59 mmol/g ve FRAP 184.74-402.16 mmol/g arasında değişmiştir. İstenilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla optimum ekstraksiyon koşulları gliserol için 85°C ekstraksiyon sıcaklığı ve % 85 gliserol konsantrasyonu, 1,3-bütandiol için 85°C ekstraksiyon sıcaklığı ve % 50.184 1,3-bütandiol konsantrasyonu, etil alkol için 75°C ekstraksiyon sıcaklığı ve % 55.180 etil alkol konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Oluşturulan modele göre bu koşullarda tahmini verimler; gliserol için toplam fenolik madde ve antosiyanin değerleri sırasıyla 65.182 mg GAE/g ve 7.559 mg/g, 1,3-bütandiol için 61.406 mg GAE/g ve 7.287 mg/g, etil alkol için 54.205 mg GAE/g ve 7.190 mg/g olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde ve antosiyanin değerlerinde gerçek verimler ise sırasıyla gliserol için ortalama 65.78 mg GAE/g ve 8.38 mg/g, 1,3-bütandiol için 48.85 mg GAE/g ve 7.46 mg/g, etil alkol için 59.94 mg GAE/g ve 8.04 mg/g olarak belirlenmiştir. Verimler değerlendirildiğinde gliserol ve etil alkol, tahmin edilenin aksine toplam fenolik bileşikler bakımından daha zengin ekstraktlar sunmuştur.

Optimum noktalarda elde edilen ekstraktlarda yapılan HPLC analizinde antosiyanin bileşiklerinden siyanidin-3-rutinozit ve pelargonidin-3-glukozit bakımından zengin olduğu saptanmıştır.

Optimum nokta örneklerinin pigment stabilitesi üzerine oda sıcaklığında ve ışık altında depolamanın etkisini incelemek amacıyla ekstraktlar, 7 hafta boyunca oda sıcaklığında ve 9 hafta boyunca ışık altında depolamaya tabi tutulmuş ve oda sıcaklığında depolanan ekstraktlarda iki haftada bir, ışık altında depolanan ekstraktlarda ise haftada bir sıklıkla antosiyanin içeriği belirlenmiştir. Periyodik analizler sonucunda oda sıcaklığında ve ışıkta depolanan ekstraktlarda antosiyaninler bakımından önemli derecede kayıplar gözlenmekle birlikte en az kayıp gliserol ekstraktlarında meydana gelmiştir. Bu da diğer biyosolventlere kıyasla gliserolün renk korunumu konusunda daha güçlü bir kaynak olduğunu göstermektedir.

Farklı biyosolventlerle pigment ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bu çalışmada, özellikle koyu renkli çiçekleri olan ve Malvaceae familyasına ait olan *Alcea apterocarpa* 'dan çeşitli yörelerde farklı hastalıkların tedavisi amacıyla halk tıbbında yararlanılmaktadır. Geleneksel kullanımı yanında pigment kaynağı olarak da yararlanılması mümkün olan bu çiçekten en verimli olarak gliserol ile ekstraksiyon yapılabilir ve gıda sanayinde renklendirici olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Aalim, H., Belwal, T., Jiang, L., Huang, H., Meng, X. and Luo, Z. (2019). *Extraction optimization, antidiabetic and antiglycation potentials of aqueous glycerol extract from rice (Oryza sativa L.) bran*. LWT - Food Science and Technology. 103: 147-154. doi: 10.1016/j.lwt.2019.01.006.
- Aksoy, A., Çelik, J. ve Tunay, H. (2016). *Gazipaşa (Antalya) ilçe pazarında satılan ve halk tarafından kullanılan bazı bitkiler ve kullanım amaçları*. Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi. 9 (2): 55-60.
- Al Mamari, H. H. (2021). "Phenolic compounds: Classification, chemistry and updated techniques of analysis and synthesis". F. A. Badria (ed.). Phenolic compounds chemistry, synthesis, diversity, non-conventional industrial, pharmaceutical and therapeutic applications. (s.1-21). UK: IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen/98958.
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L. and Ferreira, I. C. F. R. (2020). *Phenolic compounds: current industrial applications, limitations and future challenges*. Food & Function. 1-41. doi: 10.1039/D0FO02324H.
- Ali, A., Chong, C., Mah, S., Abdullah, L., Choong, T., and Chua, B. (2018). *Impact of storage conditions on the stability of predominant phenolic constituents and antioxidant activity of dried Piper betle extracts*. Molecules. 23 (2): 1-15.
- Anlas, C., Ustuner, O., Ustun Alkan, F., Bakirel, T. Aydogan, M. N. and Baykan Erel, S. (2017). *A comparative study on the antioxidant activities and phenolic contents of different extracts of Achillea nobilis Subsp. Sipylea and Alcea apterocarpa (Fenzl) Boiss, endemic plants in Turkey*. Fresenius Environmental Bulletin. 26 (2a): 1423-1430.
- AOAC, (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analysis Chemists (17th ed). AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Apostolakis, A., Grigorakis, S. and Makris, D. P. (2014). *Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (Olea europaea) using heated water/glycerol mixtures*. Separation and Purification Technology. 1-24. doi: 10.1016/j.seppur.2014.03.010.
- Aslan, S., Akan, H. ve Pekmez, H. (2020). *The ethnobotanical investigation of Yaslıca town and Arıkök neighborhood (Şanlıurfa/Turkey)*. Biological Diversity and Conservation. 13 (1): 44-61. doi: 10.46309/biodicon.2020.730293.
- Athanasiadis, V., Grigorakis, S., Lalas, S. and Makris, D. P. (2017). *Highly efficient extraction of antioxidant polyphenols from Olea europaea leaves using an eco-friendly glycerol/glycine deep eutectic solvent*. Waste and Biomass Valorization. 9: 1985-1992. doi: 10.1007/s12649-017-9997-7.
- Aybastier, Ö. (2021). *Karaduttan (Morus nigra L.) antioksidan bileşiklerin kromatografik yöntemlerle izolasyonu ve tayini*. The Journal of Food. 46 (1): 32-41. doi: 10.15237/gida.GD20114.
- Aydin, S., Öztürk, Y., Başer, K. H. C., Kırimer, N. and Kurtar Öztürk, N. (1992). *Effects of Alcea pallida L. (A.) and Tilia argentea desf. ex dc infusions on swimming performance in mice*. Phytotherapy Research. 6: 219-220. doi: 10.1002/ptr.2650060411.
- Azab, A. (2016). *Alcea: Traditional medicine, current research and future opportunities*. European Chemical Bulletin. 5 (12): 505-514. doi: 10.17628/ECB.2016.5.505.
- Aztekin, F. ve Kasım, R. (2017). *Ultraviyole ışık ve çevresel stres şartlarında meyve ve sebzelerde antosiyaninlerin oluşumu ve değişimi. VII. Bahçe Ürünlerinde Muhafaza ve Pazarlama Sempozyumu*. 2. 181-187.

- Bakhshayeshi, M. A., Khayami, M., Heidari, R. and Jamei, R. (2006). *The effects of light, storage temperature, ph and variety on stability of anthocyanin pigments in four Malus varieties*. Pakistan Journal of Biological Sciences. 9 (3): 428-433.
- Bediz, G. (2019). *Gelincik bitkisinin (Papaver rhoeas L.) taç yapraklarından ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle fenolik bileşiklerin eldesinin optimizasyonu*. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 85, Samsun.
- Benli, M., Güney, K., Bingöl, Ü., Geven, F. and Yiğit, N. (2007). *Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey*. African Journal of Biotechnology. 6 (15): 1774-1778. doi: 10.5897/AJB2007.000-2260.
- Bliidi, S., Bikaki, M., Grigorakis, S., Loupassaki, S. and Makris, D. P. (2015). *A comparative evaluation of bio-solvents for the efficient extraction of polyphenolic phytochemicals: Apple waste peels as a case study*. Waste and Biomass Valorization. 6 (6): 1125-1133. doi: 10.1007/s12649-015-9410-3.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Cvjetko Bubalo, M., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Redovniković, I. R. and Jokić, S. (2017). *Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction: green approaches for extraction of wine lees anthocyanins*. Food and Bioprocess Technology. 102: 195-203. doi: 10.1016/j.fbp.2016.12.005.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Lwt - Food Science and Technology. 28: (1). 25-30. doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Bridgers, E. N., Chinn, M. S. and Truong, V. D. (2010). *Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweet potatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars*. Industrial Crops and Products. 32 (3): 613-620. doi: 10.1016/j.indcrop.2010.07.020.
- Bucic'-Kojic', A., Planinic', M., Tomas, S., Bilic', M. and Velic', D. (2007). *Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds*. Journal of Food Engineering. 81: 236-242. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027.
- Büyükbayram, F. (2019). *Diyarbakır iline ait bazı Alcea L. türlerinin morfolojik ve anatomik özellikleri*. Yüksek Lisans Tezi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 37, Diyarbakır.
- Calvo-Flores, F. G., Monteagudo- Arrebola, M. J., Dobado, J. A. and Isac- Garcia, J. (2018). *Green and bio - based solvents*. Topics in Current Chemistry (Z). 376 (18): 1-40. doi: 10.1007/s41061-018-0191-6.
- Cañadas, R., González-Miquel, M., J. González, E., Díaz, I. and Rodríguez, M. (2021). *Evaluation of bio-based solvents for phenolic acids extraction from aqueous matrices*. Journal of Molecular Liquids. 338: 1-10. doi: 10.1016/j.molliq.2021.116930.
- Chemat, F., Vian, M. A., Ravi, H. K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S. and Fabiano Tixier, A. S. (2019). *Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: panorama, principles, applications and prospects*. Molecules. 24 (16): 1-27. doi: 10.3390/molecules24163007.
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J. and Wang, Z. (2007). *Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. Ultrasonics Sonochemistry. 14 (6): 767-778. doi: 10.1016/j.ultsonch.2006.12.011.
- Cheok, C. Y., Chin, N. L., Yusof, Y. A., Talib, R. A. and Law, C. L. (2013). *Optimization of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) extractions*

- from mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) hull using ultrasonic treatments. *Industrial Crops and Products*. 50: 1-7. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.07.024.
- Ciganovic, P., Jakimiuk, K., Tomczyk, M. and Končić, M. Z. (2019). *Glycerolic licorice extracts as active cosmeceutical ingredients: Extraction optimization, chemical characterization and biological activity*. *Antioxidants*. 8 (445): 1-14. doi: 10.3390/antiox8100445.
- Cooper-Driver, G. A. (2001). *Contributions of jeffrey harbore and co-workers to the study of anthocyanins*. *Phytochemistry*. 56 (3): 229-236. doi: 10.1016/S0031-9422(00)00455-6.
- Demir, E., Sürmen, B., Özer, H. ve Kutbay, H. G. (2017). *Salıpazarı ve çevresinde (Samsun/Türkiye) doğal olarak yetişen bitkilerin etnobotanik özellikleri*. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*. 7 (2): 68-78. doi: 10.31466/kfbd.321940.
- Devi, P. S., Saravanakumar, M. and Mohandas, S. (2012). *The effects of temperature and pH on stability of anthocyanins from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran*. *African Journal of Food Science*. 6 (24): 567-573. doi: 10.5897/AJFS12.052.
- Díaz-Álvarez, A. E. and Cadierno V. (2013). *Glycerol: A promising green solvent and reducing agent for metal-catalyzed transfer hydrogenation reactions and nanoparticles formation*. *Applied Sciences*. 3 (1): 55-69. doi: 10.3390/app3010055.
- Dragovic-Uzelac, V., Garofulic, I. E., Jukic, M., Penic, M. and Dent, M. (2012). *The influence of microwave-assisted extraction on the isolation of sage (*Salvia officinalis* L.) polyphenols*. *Food Technology Biotechnology*. 50 (3): 377-383.
- Ekici, L. (2011). *Üzüm kabuğu, siyah havuç ve kırmızı lahanadan ekstrakte edilen antosiyanin bazlı renk maddelerinin biyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve bazı gıda maddelerinde renklendirici olarak kullanımı*. Doktora Tezi. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 110, Kayseri.
- El Kantar, S., Rajha, H. N., Boussetta, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G. and Louka, N. (2019). *Green extraction of polyphenols from grapefruit peels using high voltage electrical discharges, deep eutectic solvents and aqueous glycerol*. *Food Chemistry*. 295: 165-171. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.05.111.
- Erarslan, Z. B. and Koçyiğit, M. (2019). *The important taxonomic characteristics of the family Malvaceae and the herbarium specimens in ISTE*. *Turkish Journal of Bioscience and Collections*. 3 (1): 1-7. doi: 10.26650/tjbc.20190001.
- Ertas, A., Boga, M., Gazioglu, I., Yesil, Y., Hasimi, N., Ozaslan, C., Yilmaz, H. and Kaplan, M. (2016). *Fatty acid, essential oil and phenolic compositions of *Alcea pallida* and *Alcea apterocarpa* with antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities*. *Chiang Mai Journal of Science*. 43 (1): 1143-1153.
- Esparza, I., Cimminelli, M. J., Moler, J. A., Jiménez-Moreno, N. and Ancín-Azpilicueta, C. (2020). *Stability of phenolic compounds in grape stem extracts*. *Antioxidants*. 9 (8): 720. 1-14. doi: 10.3390/antiox9080720.
- Eyiz, V., Tontul, I. and Turker, S. (2019). *Optimization of green extraction of phytochemicals from red grape pomace by homogenizer assisted extraction*. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 14: 39-47. doi: 10.1007/s11694-019-00265-7.
- Ezer, N. and Mumcu Arisan, Ö. (2006). *Folk medicines in Merzifon (Amasya, Turkey)*. *Turkish Journal of Botany*. 30 (3): 223-230.
- Ferreira Ozela, E., Stringheta, P. C. and Chauca, M. C. (2007). *Stability of anthocyanin in spinach vine (*basella rubra*) fruits*. *Ciencia e Investigación Agraria*. 34 (2): 115-120. doi: 10.4067/S0718-16202007000200004.

- Fersahoğlu, H. (2016). *Farklı renklerdeki gülhatmi çiçeklerinin biyoaktif özellikleri*. Yüksek Lisans Tezi. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 41, İstanbul.
- García, P. E., Pakravan, M., Schönswetter, P., Aguilar, J. F. and Schneeweiss, G. M. (2012). *Phylogenetic relationships in the species-rich Irano-Turanian genus Alcea (Malvaceae)*. *Taxon*. 61 (2): 324-332. doi: 10.1002/tax.612004.
- García, J. I., García-Marín, H. and Pires, E. (2014). *Glycerol based solvents: Synthesis, properties and applications*. *Green Chemistry*. 16 (3): 1007-1033. doi: 10.1039/c3gc41857j.
- Ghaedi, H., Ayoub, M., Sufian, S., Lal, B. and Uemura, Y. (2017). *Thermal stability and ft-ir analysis of phosphonium-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond donors*. *Journal of Molecular Liquids*. 242. 395-403. doi: 10.1016/j.molliq.2017.07.016.
- Gu, Y. and Jérôme, F. (2013). *Bio-based solvents: An emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry*. *Chemical Society Reviews*. 42: 9550-9570. doi: 10.1039/C3CS60241A.
- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S. and Rupasinghe, H. P. V. (2018). *Response surface optimization for recovery of polyphenols and carotenoids from leaves of Centella asiatica using an ethanol-based solvent system*. *Food Science Nutrition*. 7: 528-536. doi: 10.1002/fsn3.832.
- Hepsağ, F., Hayoğlu, İ. ve Hepsağ, B. (2012). *Karadut meyvesinin antosiyanin içeriği antosiyaninlerin gıda sanayinde renk maddesi olarak kullanım olanakları*. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 7 (1): 9-19.
- Hernáiz, M. J., Alcantara, A. R., Garcia, J. I. and Sinisterra J. V. (2010). *Applied biotransformations in green solvents*. *Chemistry A European Journal*. 16 (31): 9422-9437. doi: 10.1002/chem.201000798.
- Ho, C. T. (1992). "Phenolic compounds in food an overview". American Chemical Society. (s. 2-7). New Jersey.
- Hosaka, H., Mizuno, T. and Iwashina, T. (2012). *Flavonoid pigments and color expression in the flowers of black hollyhock (Alcea rosea Nigra)*. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science*. 38 (2): 69-75.
- Hossain, M. A. and Shah, M. D. (2015). *A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant Merremia borneensis*. *Arabian Journal Chemistry*. 8: 66-71. doi: 10.1016/j.arabjc.2011.01.007.
- Huamán-Castilla, N. L., Martínez-Cifuentes, M., Camilo, C., Pedreschi, F., Mariotti-Celis, M. and Pérez-Correa, J. R. (2019). *The impact of temperature and ethanol concentration on the global recovery of specific polyphenols in an integrated HPLC/RP process on Carménère pomace extracts*. *Molecules*. 24 (17): 1-16. doi: 10.3390/molecules24173145.
- Huamán-Castilla, N. L., Mariotti-Celis, M. S., Martínez-Cifuentes, M. and Pérez-Correa, J. R. (2020). *Glycerol as alternative co-solvent for water extraction of polyphenols from Carménère pomace: Hot pressurized liquid extraction and computational chemistry calculations*. *Biomolecules*. 10 (474): 1-14. doi: 10.3390/biom10030474.
- Huang, H., Wang, Z., Aalim, H., Limwachiranon, J., Li, L., Duan, Z., Ren, G. and Luo, Z. (2018). *Green recovery of phenolic compounds from rice byproduct (rice bran) using glycerol based on viscosity, conductivity and density*. *International Journal of Food Science & Technology*. 54 (4): 1363-1371. doi: 10.1111/ijfs.14026.

- Huang, H., Belwal, T., Jiang, L., Hu, J., Limwachiranon, J., Li, L., Ren, G., Zhang, X. and Luo, Z. (2019). *Valorization of lotus byproduct (Receptaculum nelumbinis) under green extraction condition*. Food and Bioproducts Processing. 115: 110-117. doi: 10.1016/j.fbp.2019.03.006.
- Jahromi, S. G. (2019). "Extraction techniques of phenolic compounds from plants". M. Soto-Hernández, R. García-Mateos and M. Palma-Tenango (eds.). *Plant physiological aspects of phenolic compounds*. (s.1-18). UK: IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.84705.
- Jensen, J. S., Blachez, B., Egebo, M. and Meyer, A. S. (2007). *Rapid extraction of polyphenols from red grapes*. American Journal of Enology and Viticulture. 58 (4): 451-461.
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M. and Tomas, S. (2010). *Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans*. Czech Journal of Food Sciences. 28 (3): 206-212.
- Karakashov, B., Grigorakis, S., Loupassaki, S., Mourtzinou, I. and Makris, D. P. (2015 a). *Optimisation of organic solvent-free polyphenol extraction from Hypericum triquetrifolium turra using box-behnken experimental design and kinetics*. International Journal of Industrial Chemistry. 6 (2): 85-92. doi: 10.1007/s40090-015-0034-z.
- Karakashov, B., Grigorakis, S., Loupassaki, S. and Makris, D. P. (2015 b). *Optimisation of polyphenol extraction from Hypericum perforatum (St. John's Wort) using aqueous glycerol and response surface methodology*. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 2 (1): 1-8. doi: 10.1016/j.jarmap.2014.11.002.
- Katsampa, P., Valsamedou, E., Grigorakis, S. and Makris, D. P. (2015). *A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using box-behnken experimental design and kinetics*. Industrial Crops and Products. 77: 535-543. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.09.039.
- Khiari, Z., Makris, D. P. and 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. doi: 10.1007/s11947-007-0044-8.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T. and Lim, S. M. (2017). *Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits*. Food & Nutrition Research. 61 (1): 1-21. doi: 10.1080/16546628.2017.1361779.
- Kowalska, G., Wyrostek, J., Kowalski, R. and Pankiewicz, U. (2021). *Evaluation of glycerol usage for the extraction of anthocyanins from black chokeberry and elderberry fruits*. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants. 22: 1-5. doi: 10.1016/j.jarmap.2021.100296.
- Krisanti, E. A., Saputra, K., Arif M. M. and Mulia, K. (2019). Formulation and characterization of betaine-based deep eutectic solvent for extraction phenolic compound from spent coffee grounds. *Proceedings of the 5 th International Symposium on Applied Chemistry*. 1-7. doi: 10.1063/1.5134604.
- Kumar, N. and Srivastava V. C. (2019). "Glycerol as a green solvent in organic reactions". Inamuddin, R. Mobin and A. M. Asiri (eds.). *Industrial Applications of Green Solvents*. (s. 202-223). USA: Materials Research Forum LLC. doi: 10.21741/9781644900314-9.
- Lakka, A., Grigorakis, S., Karageorgou, I., Batra, G., Kaltsa, O., Bozinou, E., Lalas, S. and Makris, D. P. (2019). *Saffron processing wastes as a bioresource of high-value added compounds: development of a green extraction process for polyphenol recovery using*

- a natural deep eutectic solvent*. *Antioxidants*. 8 (12): 586. 1-15. doi: 10.3390/antiox8120586.
- Laleh, G. H., Frydoonfar, H. Heidary, R. Jameei, R. and Zare, S. (2006). *The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigment in four Berberis species*. *Pakistan Journal of Nutrition*. 5 (1): 90-92. doi: 10.3923/pjn.2006.90.92.
- Limwachiranon, J., Jiang, L., Huang, H., Sun, J. and Luo, Z. (2018). *Improvement of phenolic compounds extraction from high-starch lotus (Nelumbo nucifera G.) seed kernels using glycerol: New insights to amylose/amylopectin–phenolic relationships*. *Food Chemistry*. 274: 933-941. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.022.
- Makris, D. P., Boskou, G. P. and Andrikopoulos, N. K. (2007). *Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures*. *Bioresource Technology*. 98 (15): 2963-2967. doi: 10.1016/j.biortech.2006.10.003.
- Makris, D. P. and Lalas, S. (2020). *Glycerol and glycerol-based deep eutectic mixtures as emerging green solvents for polyphenol extraction: the evidence so far*. *Molecules*. 25 (24): 1-15. doi: 10.3390/molecules25245842.
- Manousaki, A., Jancheva, M., Grigorakis, S. and Makris, D. P. (2016). *Extraction of antioxidant phenolics from agri-food waste biomass using a newly designed glycerol-based natural low-transition temperature mixture: A comparison with conventional eco-friendly solvents*. *Recycling*. 1 (1): 194-204. doi: 10.3390/recycling1010194.
- Mart, S. and Türkmen, N. (2018). *A survey on wild plants with ethnobotanical use in the Bahçe and Hasanbeyli districts of Osmaniye, Turkey*. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 5 (3): 28-35. doi: 10.30574/gscbps.2018.5.3.0133.
- Mattioli, R., Francioso, A., Mosca, L. and Silva, P. (2020). *Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases*. *Molecules*. 25 (3809): 1-42 doi: 10.3390/molecules25173809.
- Meziant, L., Boutiche, M., Bachir Bey, M., Saci, F. and Louaileche, H. (2018). *Standardization of monomeric anthocyanins extraction from fig fruit peels (Ficus carica L.) using single factor methodology*. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12: 2865-2873. doi: 10.1007/s11694-018-9901-6.
- Michail, A., Sigala, P., Grigorakis, S. and Makris, D. P. (2015). *Kinetics of ultrasound-assisted polyphenol extraction from spent filter coffee using aqueous glycerol*. *Chemical Engineering Communications*. 203 (3): 407-413. doi: 10.1080/00986445.2015.1004667.
- Momchev, P., Ciganović, P., Jug, M., Marguí, E., Jablan, J. and Zovko Končić, M. (2020). *Comparison of maceration and ultrasonication for green extraction of phenolic acids from Echinacea purpurea aerial parts*. *Molecules*. 25 (21): 1-16. doi: 10.3390/molecules25215142.
- Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D. P. and Kefalas, P. (2008). *Optimisation of the extraction of olive (Olea europaea) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 392: 977-985. doi: 10.1007/s00216-008-2353-9.
- Nayak, A., Bhushan, B., Rosales, A., Turienzo, L. R. and Cortina, J. L. (2018). *Valorisation potential of Cabernet grape pomace for the recovery of polyphenols: Process intensification, optimisation and study of kinetics*. *Food and Bioproducts Processing*. 109: 74-85. doi: 10.1016/j.fbp.2018.03.004.
- Okan, O. T., Varlıbaş, H., Öz, M. ve Deniz, İ. (2013). *Antioksidan analiz yöntemleri ve Doğu Karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir odun dışı bazı bitkisel ürünler*. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*. 13 (1): 48-59.

- Oklu, N. K., Matsinha, L. C. and Makhubela, B. C. E. (2019). "Bio-Solvents: Synthesis, industrial production and applications". D. Glossman-Mitnik and M. Maciejewska (eds.). *Solvents, Ionic Liquids and Solvent Effects*. (s. 3-25). UK: IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.84705.
- Özen, G. ve Akbulut, M. (2008). Dut suyu antosiyanin içeriğinin belirlenmesi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*. 37. 279-282.
- Özkan, A. ve Koca, İ. (2021). Biyoçözücü olarak gliserol. *12. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi*. 19. 269-277.
- Paleologou, I., Vasiliou, A., Grigorakis, S. and Makris, D. P. (2015). *Optimisation of a green ultrasound-assisted extraction process for potato peel (Solanum tuberosum) polyphenols using bio-solvents and response surface methodology*. Biomass Conversion and Biorefinery. 6 (3): 289-299. doi: 10.1007/s13399-015-0181-7.
- Pazmiño-Durán, E. A., Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., Beatriz, M. and Glória, A. (2001). *Anthocyanins from Oxalis triangularis as potential food colorants*. Food Chemistry. 75 (2): 211-216. doi: 10.1016/S0308-8146(01)00201-1.
- Philippi, K., Tsamandouras, N., Grigorakis, S. and Makris, D. P. (2016). *Ultrasound-assisted green extraction of eggplant peel (Solanum melongena) polyphenols using aqueous mixtures of glycerol and ethanol: optimisation and kinetics*. Environmental Processes. 3 (2): 369-386. doi: 10.1007/s40710-016-0140-8.
- Radulescu, C., Stih, C., Ilie, M., Lazurcă, D., Gruia, R., Olaru, O. T., Bute, O., Dulama, I. D., Stirbescu, M., Teodorescu, S. and Florescu, M. (2017). *Characterization of phenolics in Lavandula angustifolia*. Analytical Letters. 50 (17): 2839-2850. doi: 10.1080/00032719.2016.1264409.
- Rakkimuthu, R., Palmuragan, S. and Shanmugapriya, A. (2016). *Effect of temperature, light, pH on the stability of anthocyanin pigments in cocculus Hirsutus fruits*. International Journal of Multidisciplinary Research and Modern Education. 2 (2): 91-96.
- Ramos, P., Herrera, R. and Moya-León, M. A. (2014). "Anthocyanins: Food sources and benefits to consumer's health". (s.1-22).
- Rao, G. (2010). *Optimization of ultrasound-assisted extraction of cyanidin 3-rutinoside from litchi (Lichi chinensis Sonn.) fruit pericarp*. Analytical Methods. 2 (8): 1166-1170. doi: 10.1039/c0ay00203h.
- Reis Giada, M. de L. (2013). "Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power". J. A. Morales-Gonzalez (ed.). *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases: A Role for Antioxidants*.(s. 87-112). UK: IntechOpen. doi: 10.5772/51687.
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M. C. and Durand, E. (2017). *Application of deep eutectic solvents (des) for phenolic compounds extraction: overview, challenges, and opportunities*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 65 (18): 3591-3601. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01054.
- Saçıcı, E. and Yeşilada, E. (2018). *Proposal for an "Althaeae flos (Marshmallow flower)" monograph set-up based on European pharmacopoeia template and quality evaluation of commercial samples*. ACTA Pharmaceutica Scientia. 56 (1): 37-61. doi: 10.23893/1307-2080.APS.05603.
- Shehata, E., Grigorakis, S., Loupassaki, S. and Makris, D. P. (2015). *Extraction optimisation using water/glycerol for the efficient recovery of polyphenolic antioxidants from two Artemisia species*. Separation and Purification Technology. 149: 462-469. doi: 10.1016/j.seppur.2015.06.017.

- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J., Young, J. C., Bryan, M. and Wu, Y. (2003). *Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution*. Journal of Food Agriculture and Environment. 1 (2): 42-47.
- Singleton, V. and Rossi, J. (1965) *Colorimetry of total phenolic compounds with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal of Enology and Viticulture. 16 (3): 144-158.
- Skarpalezos, D. and Detsi, A. (2019). *Deep eutectic solvents as extraction media for valuable flavonoids from natural sources*. Applied Sciences. 9 (4169): 1-23. doi: 10.3390/app9194169.
- Spigno, G., Tramelli, L. and De Faveri, D. M. (2007). *Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics*. Journal of Food Engineering. 81 (1): 200-208. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021.
- Sürmen, B., Kutbay, H. G., Çakmak, A. and Yılmaz, H. (2016). *Comparison of leaf traits (SLA and LMA) on different populations of Alcea apterocarpa*. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry. 2 (44): 125-131. doi: 10.15671/HJBC.20164417630.
- Şen, C. (2011). *Hibiscus sabdariffa L. bitkisinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesinin araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 57, Edirne.
- Şenkul, Ç. ve Kaya, S. (2017). *Türkiye endemik bitkilerinin coğrafi dağılışı*. Türk Coğrafya Dergisi. 69: 109-120. doi: 10.17211/tcd.322515.
- Tobiszewski, M. (2019). *Analytical chemistry with biosolvents*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 411 (24): 1-6. doi: 10.1007/s00216-019-01732-2.
- Turhan, S. ve Üstün, N. Ş. (2006). Doğal antioksidanlar ve gıdalarda kullanımları. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*. 33. 273-276.
- Uzunhisarcıklı, M. E. (2008). *Türkiye'nin Alcea L. ve Althaea L. (Malvaceae) cinslerinin revizyonu*. Doktora Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 278, Ankara.
- Vieira, V., Prieto, M. A., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreir, I. C. F. R. and Ferreira, O. (2017). Polyols based solvents for the extraction of phenolic compounds from *Juglans regia* L. leaves. *10º Encontro Nacional de Cromatografia*. 37. 54.
- Vieira, V., Calhelha, R. C., Barros, L., Coutinho, J. A. P., Ferreira, I. C. F. R. and Ferreira, O. (2020). *Insights on the extraction performance of alkanediols and glycerol: using Juglans regia L. leaves as a source of bioactive compounds*. Molecules. 25 (11): 1-13. doi: 10.3390/molecules25112497.
- Vovers, J., Smith, K. H. and Stevens, G. W. (2017). "Bio-based molecular solvents". F. Pena-Pereira and M. Tobiszewski (eds.). *The application of green solvents in separation processes*. (s. 91-110). doi: 10.1016/B978-0-12-805297-6.00004-8.
- Wahyuningsih, S., Wulandari, L., Wartono, M. W., Munawaroh, H. and Ramelan, A. H. (2017). *The effect of pH and color stability of anthocyanin on food colorant*. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 193: 012047. 1-9. doi: 10.1088/1757-899x/193/1/012047.
- Wrostand, R. E., (1976). *Color and Pigment Analyses in Fruit Products*. Agric. Exp. Stn., Corvallis, Oregon State University, Station Bulletin 624, 17 p.
- Wu, Y., Li, W., Vovers, J., Thuan Lu, T., Stevens, W. G. and Mumford, K. A. (2022). *Investigation of green solvents for the extraction of phenol and natural alkaloids: Solvent and extractant selection*. Chemical Engineering Journal. 442 (1): 1-11. doi: 10.1016/j.cej.2022.136054.

- Yeşil, Y. and Akalın, E. (2009). *Folk medicinal plants in Kürecik area (Akçadağ/Malatya-Turkey)*. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. 6: 207-220.
- Yeşilören Akal, V. (2019). *Siyah havuç posasından antosiyanin ekstraksiyonu*. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 205, Ankara.
- Yıldırım, H., Özdöl, T. ve Yaşayacak, H. (2019). *Türkiye için yeni bir istilacı tür kaydı: Malvastrum coromandelianum (L.) gracke (Ebegümecigiller/Malvaceae Juss.)*. Bağbahçe Bilim Dergisi. 6 (1): 40-44.



ÖZ GEÇMİŞ

Ayşegül ÖZKAN, Samsun Ondokuz Mayıs (Anadolu) Lisesi'ni bitirdikten sonra Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği bölümünden 28.05.2018 tarihinde mezun oldu. 2019 yılında OMÜ LEE Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi. Mezuniyetinden bu yana yüksek lisans öğrencisi olarak görev yapan Ayşegül ÖZKAN, orta derecede İngilizce bilmektedir (YÖKDİL: 68.75) (16.06.2022).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0001-8352-8190

Yayınlar:

1. Özkan, A. ve Koca, İ. (2021). Biyoçözücü olarak gliserol. *12. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi*. 19. 269-277.
2. Özkan, A., Zannou, O. and Koca, İ. (2021). The use of biosolvents for the extraction of phenolic compounds. *International Online Conferences on Engineering and Natural Sciences*. 47. 350.
3. Özkan, A., Zannou, O., Pashazadeh, H. and Koca, İ. (2021). Marshmallow and human health. *International Online Conferences on Engineering and Natural Sciences*. 47. 352.